

УДК 631.465 : 631.416.8

ШВАКОВА Элла Валерьевна, кандидат педагогических наук, доцент кафедры химии института естественных наук и биомедицины Северного (Арктического) федерального университета имени М.В. Ломоносова. Автор 24 научных публикаций

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ УРЕАЗЫ ПРИ ПОВЫШЕННЫХ СОДЕРЖАНИЯХ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ (Pb, Zn, Cu) В ПОЧВЕ

В статье представлены результаты модельного опыта по изучению влияния подвижных форм свинца, цинка и меди на активность почвенной уреазы. Исследовалась активность уреазы в загрязненной почве разными количествами тяжелых металлов и продолжительность их токсического действия.

Ключевые слова: уреазы, свинец, цинк, медь, почва, активность ферментов, ингибирование, предельно допустимая концентрация.

Введение. Важнейшим фактором почвообразования является ферментативная активность почв. Почвенные ферменты катализируют многочисленные реакции превращения органического вещества почвы: гидролиз, расщепление, окисление и другие реакции, в результате которых почвы обогащаются доступными для растений и микроорганизмов питательными веществами [11].

Ферменты являются обязательной частью биологической составляющей почвы. Главные источники почвенных ферментов – это почвенные микроорганизмы, в меньшей степени корни растений и почвенные животные. Ферменты попадают в почву путем выделения их живыми организмами и после их смерти. Любая почва характеризуется определенным уровнем ферментативной активности и обусловлена многообразием и количествен-

ным содержанием ферментов, которое выражается их индивидуальной активностью. При этом интенсивность ферментативных процессов определяется конкретными условиями: температурой, влажностью, pH почвы, количеством гумуса, органического вещества как питательного субстрата для микроорганизмов, а также содержанием и количеством различных ингибиторов ферментов, прежде всего тяжелых металлов [5, 11, 12].

Большие количества тяжелых металлов поступают в окружающую среду в процессе человеческой деятельности. Главными их источниками являются горнодобывающая, металлургическая, химическая промышленности. Тяжелые металлы поступают в почву со сточными водами промышленных предприятий, со свалок, от эксплуатации автотранспорта, с минеральными удобрениями [2].

Ингибирующее воздействие на ферменты тяжелых металлов обусловлено их активным комплексообразованием с белками. Их катионы имеют высокую степень сродства к сульфгидрильным группам белков, координируются с имидазольными атомами азота остатков гистидина, карбонильными и карбоксильными атомами кислорода и образуют прочные биокластеры хелатного типа. Для катиона свинца к тому же свойственно вытеснение металла из активного центра металлофермента [7].

Поведение наиболее распространенных почвенных ферментов при загрязнении почвы тяжелыми металлами может служить показателем степени загрязнения почвы. К тому же такие изменения активности ферментов служат показателем ранней диагностики негативных изменений свойств почв [3, 13]. Уреазы являются одним из наиболее изученных почвенных ферментов. Она играет важную роль в превращениях азота почвы. Наличие уреазы в бактериях дает им возможность использовать в качестве источника аммония мочевины, так как уреазы катализируют ее гидролиз. Но кроме внутриклеточной микробной уреазы в почве имеется внеклеточная уреазы, адсорбированная почвенными коллоидами, имеющими высокое сродство к ней. Связь с почвенными коллоидами предохраняет фермент от разложения микроорганизмами и способствует ее аккумуляции в почве. Каждая почва имеет свой стабильный уровень уреазной активности, определяемый способностью почвенных коллоидов, главным образом органических, проявлять защитные свойства [12]. Уреазная активность почвы отличается следующими характеристиками: высокая информативность показателя (тесная корреляция между показателем и антропогенным фактором), достаточно высокая чувствительность показателя, высокая специфичность, хорошая воспроизводимость результатов, незначительное варьирование показателя; небольшая ошибка опыта, простота, малая трудоемкость и высокая скорость метода определения, широкая распространенность метода [10].

Объекты и методы исследования. Для изучения характера и степени изменения активности почвенной уреазы от количества подвижных форм свинца, цинка и меди были поставлены модельные опыты. В модельном опыте с медью почва – песчаная, слабокислая (рН 6,3), со свинцом – легкий суглинок, слабокислая (рН 6,3), с цинком – средний суглинок, слабокислая (рН 6,6). Кислотность (рН) почвы определялась в водной вытяжке. Все почвы городские, относятся к типу урбанозем [8]. В ходе эксперимента загрязненные тяжелыми металлами и незагрязненная почвы компостировались в стабильных лабораторных условиях при температуре 20–22 °С в течение 6 месяцев при условии поддержания естественной влажности почвы. В качестве загрязнителей в почвы вносились растворы солей (нитрата свинца, ацетата цинка и ацетата меди соответственно) в расчете на 1, 5, 10 и 100 ПДК металла. ПДК подвижных форм меди 3 мг/кг, ПДК валовых форм свинца, 32 мг/кг, ПДК валовых форм цинка, 100 мг/кг [4, 6]. Образцы почв для анализа отбирались через 3 дня, 1, 3 и 6 месяцев компостирования, высушивались до воздушно-сухого состояния, измельчались и просеивались. Все анализы проводились в трехкратной повторности.

Активность уреазы определялась по методике И.Н. Ромейко и С.М. Малинской [9]. В основе метода лежит фотометрическое измерение количества аммиака (аммонийного азота), образующегося при гидролизе мочевины под действием уреазы, путем образования окрашенных комплексов с реактивом Несслера. Концентрацию аммонийного азота в растворе определяли по калибровочному графику, построенному по серии растворов хлорида аммония, а активность уреазы рассчитывали по формуле, в которой обязательно учитывали контрольное измерение количества аммиака, имеющегося в почве, в том числе образующегося неферментативным путем.

Результаты исследования и их обсуждение. Активность уреазы в загрязненной тяже-

АКТИВНОСТЬ УРЕАЗЫ В ЗАГРЯЗНЕННОЙ И НЕЗАГРЯЗНЕННОЙ ПОЧВЕ,
МГ N-NH₄⁺ НА 100 г СУХОЙ ПОЧВЫ ЗА 3 ЧАСА

Периодичность	Контроль	Уровень загрязнения почвы			
		1 ПДК	5 ПДК	10 ПДК	100 ПДК
Загрязнитель Pb(NO ₃) ₂					
3 дня	10,34±0,24	7,88±0,35	5,86±0,35	4,77±0,44	3,16±0,41
1 месяц	9,78±0,54	7,82±0,33	3,30±0,44	1,79±0,24	0,96±0,07
3 месяца	9,72±0,29	6,81±0,23	2,81±0,48	1,21±0,12	0,53±0,07
6 месяцев	9,76±0,07	6,59±0,07	1,71±0,07	0,73±0,07	0,29±0,02
Загрязнитель Zn(CH ₃ COO) ₂					
3 дня	21,72±0,04	18,00±0,26	14,28±0,14	11,82±0,05	6,16±0,04
1 месяц	21,55±0,16	17,76±0,28	12,86±0,04	10,15±0,05	5,60±0,12
3 месяца	21,62±0,09	17,41±0,07	12,62±0,07	10,04±0,04	4,90±0,02
6 месяцев	21,13±0,05	16,20±0,05	10,36±0,16	8,17±0,05	3,62±0,04
Загрязнитель Cu(CH ₃ COO) ₂					
3 дня	4,29±0,10	2,82±0,06	1,88±0,10	1,05±0,05
1 месяц	4,10±0,06	2,29±0,06	1,63±0,03	0,75±0,04
3 месяца	3,61±0,15	1,79±0,15	1,09±0,10	0,60±0,04
6 месяцев	3,41±0,06	1,31±0,10	0,93±0,06	0,56±0,05

Примечание: активность уреазы в загрязненной ацетатом меди на уровне 5 ПДК почве не определялась

лыми металлами и незагрязненной (контроль) почвах представлена в *таблице*.

По результатам модельных опытов установлено, что при внесении в почву растворов солей свинца, цинка и меди активность уреазы сразу снизилась примерно одинаково: при загрязнении свинцом, цинком, медью на уровне 1 ПДК – примерно в 1,3, 1,2, 1,5 раза соответственно; при загрязнении свинцом, цинком, медью на уровне 10 ПДК – в 2,2, 1,8, 2,3 раза соответственно; при загрязнении свинцом, цинком, медью на уровне 100 ПДК – в 3,3, 3,5, 4,1 раза соответственно. Это свидетельствует о наличии зависимости степени ингибирования уреазы от количества токсиканта.

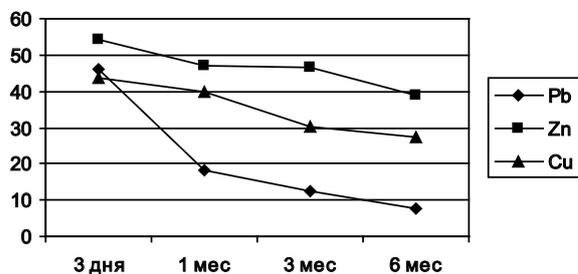
В процессе ингибирования уреазы катионом тяжелого металла можно выделить 2 фазы: первоначальное ингибирование, наблюдаемое сразу после внесения токсиканта, которое показывает степень инактивации имеющегося в почве количества уреазы (быстрый ответ фер-

мента на загрязнение), и пролонгированное ингибирование в течение 6 месяцев, которое отражает совокупность ряда процессов, протекающих в почве, таких как связывание катионов металла почвенными частицами, в том числе молекулами питательного субстрата микроорганизмов, угнетение микробиологической фракции почвы и др.

На второй фазе ингибирования активность уреазы продолжала снижаться в каждом из вариантов опыта. Однако при загрязнении почвы медью активность уреазы за 6 месяцев снизилась примерно одинаково во всех инкубационных сосудах, т. е. независимо от количества внесенного токсиканта, в среднем на 50,1 % в сравнении с первоначальным снижением. При загрязнении почвы цинком на уровне 1 ПДК активность уреазы слабо продолжала снижаться и уменьшилась за 6 месяцев на 7,5 %, однако при более сильном загрязнении (5 ПДК, 10 ПДК и 100 ПДК) активность уре-

азы падала более интенсивно, соответственно на 25,3 %, 28,9 % и 41,2 %. При загрязнении почвы свинцом снижение активности уреазы более четко соотносится с количеством внесенного металла: при внесении свинца на уровне 1 ПДК снижение активности уреазы составило 16,4 %, на уровне 5 ПДК – 70,8 %, на уровне 10 ПДК – 84,7 %, а на уровне 100 ПДК – 90,8 %.

Различна и динамика снижения активности уреазы под действием свинца, цинка и меди. Медь и цинк «плавно» ингибируют уреазу на протяжении всего эксперимента (см. рисунок).



Снижение активности уреазы (%) в зависимости от продолжительности компостирования (загрязнение почвы на уровне 10 ПДК)

При этом с течением времени уменьшается воздействие токсиканта на фермент.

Эффективность ингибирования цинком за последние 3 месяца по сравнению с первыми 3 месяцами эксперимента снизилась в среднем в 2,75 раза вне зависимости от количества токсиканта. Эффективность ингибирования медью снизилась в 1,9 раза на уровне загрязнения в 1 ПДК, в 4,7 раза на уровне загрязнения в 10 ПДК и в 12,4 раза на уровне загрязнения в 100 ПДК. Чем выше концентрация меди в почве, тем меньше ее пролонгированное ингибирующее действие. Свинец же резко ингибирует уреазу на начальном этапе эксперимента (см. рисунок). Особенно ярко это прослеживается при высоких количествах токсиканта (10, 100 ПДК), через 3 месяца инкубации актив-

ность уреазы упала в 8 и 18 раз соответственно, последующее снижение активности менее существенно, эффективность ингибирования за последующие 3 месяца упала примерно в 2 раза.

Замедление ингибирования уреазы тяжелыми металлами можно объяснить их способностью связываться почвой, что в целом снижает концентрацию подвижных катионов. Кроме того, медь и цинк могут поглощаться живыми организмами. Они, в отличие от свинца, имеют определенное биологическое значение: являются микроэлементами, участвуют в метаболических процессах в составе некоторых ферментов (например, медь – в цитохромоксидазе, супероксиддисмутазе, аскорбатоксидазе, цинк еще более активно участвует в ферментативном катализе, он входит в состав более 40 металлоферментов: алкогольдегидрогеназы, карбоангидразы и др.). Свинец не участвует в ферментативных реакциях, его биологическая роль не выявлена. В литературе отмечается его высокое токсичное воздействие на живые организмы [1, 4, 7, 13]. Этим и можно объяснить более «стремительное» и глубокое ингибирующее воздействие свинца на активность почвенной уреазы.

Заключение. Таким образом, активность почвенной уреазы как одного из показателей биологической активности почвы, зависит от содержания в почве тяжелых металлов (свинца, цинка, меди). Ферменты, в том числе уреазы, очень чувствительны к внешнему молекулярному и ионному окружению. Тяжелые металлы ингибируют фермент, снижая тем самым уреазную активность почвы. Чем больше содержание токсиканта, тем больше снижается уреазная активность. Поскольку фермент быстро реагирует на катион тяжелого металла, изменение уреазной активности почвы может служить начальным показателем негативного воздействия тяжелых металлов на почву.

Список литературы

1. Безуглова О.С., Орлов Д.С. Биогеохимия. Ростов н/Д, 2000.
2. Водяницкий Ю.Н. Тяжелые металлы и металлоиды в почвах. М., 2008.
3. Гришина Л.А., Коцик Г.Н., Моргунов Л.В. Организация и проведение почвенных исследований для экологического мониторинга. М., 1991.
4. Лозановская И.Н., Орлов Д.С., Садовникова Л.К. Экология и охрана биосферы при химическом загрязнении. М., 1998.
5. Методы почвенной микробиологии и биохимии / под ред. Д.Г. Звягинцева. М., 1991.
6. Наквасина Е.Н., Пермгородская Ю.М., Попова Л.Ф. Почвы Архангельска. Структурно-функциональные особенности, свойства, экологическая оценка. Архангельск, 2006.
7. Общая химия. Биофизическая химия. Химия биогенных элементов / под ред. Ю.А. Ершова. М., 2005.
8. Почва. Город. Экология / под общ. ред. Г.В. Добровольского. М., 1997.
9. Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии. М., 2005.
10. Хазиев Ф.Х. Системно-экологический анализ ферментативной активности почв. М., 1990.
11. Хазиев Ф.Х. Ферментативная активность почв. М., 1976.
12. Шербакова Т.А. Ферментативная активность почв и трансформация органического вещества. Минск, 1983.
13. Sardar K. Soil Enzymatic Activities and Microbial Community Structure with Different Application Rates of Cd and Pb. *Journal of Environmental Sciences*. 2007. 19 (7): P. 834–840

References:

1. Bezuglova O.S., Orlov D.S. *Biogeochemiya* [Biogeochemistry]. Rostov-on-Don, 2000.
2. Vodyanitskiy Yu.N. *Tyazhelye metally i metalloidy v pochvakh* [Heavy Metals and Metalloids in the Soils]. Moscow, 2008.
3. Grishina L.A., Koptsik G.N., Morgun L.V. *Organizatsiya i provedenie pochvennykh issledovaniy dlya ekologicheskogo monitoringa* [Organization and Implementation of Soil Research for Environmental Monitoring]. Moscow, 1991.
4. Lozanovskaya I.N., Orlov D.S., Sadovnikova L.K. *Ekologiya i okhrana biosfery pri khimicheskoy zagryaznenii* [Ecology and Protection of the Biosphere under Chemical Pollution]. Moscow, 1998.
5. *Metody pochvennoy mikrobiologii i biokhimii* [Methods of Soil Microbiology and Biochemistry]. Ed. by Zvyagintsev D.G. Moscow, 1991.
6. Nakvasina E.N., Permogorskaya Yu.M., Popova L.F. *Pochvy Arkhangel'ska. Strukturno-funktsional'nye osobennosti, svoystva, ekologicheskaya otsenka* [Soils of Arkhangelsk. Structural and Functional Features, Properties, and Environmental Assessment]. Arkhangelsk, 2006.
7. *Obshchaya khimiya. Biofizicheskaya khimiya. Khimiya biogennykh elementov* [General Chemistry. Biophysical Chemistry. Chemistry of Biogenic Elements]. Ed. by Ershov Yu.A. Moscow, 2005.
8. *Pochva. Gorod. Ekologiya* [Soil. City. Ecology]. Ed. by Dobrovolskiy G.V. Moscow, 1997.
9. Khaziev F.Kh. *Metody pochvennoy enzimologii* [Methods of Soil Enzymology]. Moscow, 2005.
10. Khaziev F.Kh. *Sistemno-ekologicheskii analiz fermentativnoy aktivnosti pochv* [System-Ecological Analysis of the Enzymatic Activity of Soils]. Moscow, 1990.
11. Khaziev F.Kh. *Fermentativnaya aktivnost' pochv* [Enzymatic Activity of Soils]. Moscow, 1976.
12. Shcherbakova T.A. *Fermentativnaya aktivnost' pochv i transformatsiya organicheskogo veshchestva* [Enzymatic Activity of Soil and Organic Matter Transformation]. Minsk, 1983.
13. Sardar K. Soil Enzymatic Activities and Microbial Community Structure with Different Application Rates of Cd and Pb. *Journal of Environmental Sciences*, 2007, 19 (7), pp. 834–840.

Shvakova Ella Valeryevna

Institute of Natural Sciences and Biomedicine,
Northern (Arctic) Federal University named after M.V. Lomonosov (Arkhangelsk, Russia)

CHANGES IN UREASE ACTIVITY WITH HIGH CONTENT OF HEAVY METALS (PB, ZN, CU) IN THE SOIL

The article presents the results of a model experiment studying the effect of mobile forms of lead, zinc and copper on the activity of soil urease. Urease activity in the soils contaminated by various amounts of heavy metals and the duration of their toxic effect were investigated.

Keywords: *urease, lead, zinc, copper, soil, enzyme activity, inhibition, maximum permissible concentration.*

Контактная информация:

Швакова Элла Валерьевна

адрес: 163002, г. Архангельск, просп. Ломоносова, д. 4

e-mail: eshvakova@yandex.ru

Рецензент – *Наквасина Е.Н.*, доктор сельскохозяйственных наук, профессор кафедры лесоводства и почвоведения лесотехнического института Северного (Арктического) федерального университета имени М.В. Ломоносова