

Ферментативная диагностика почвы и ее применение для нормирования нагрузки по удобрениям

В. В. Лапа, доктор с.-х. наук, Н. А. Михайловская, кандидат с.-х. наук,
Т. В. Погирницкая, младший научный сотрудник
Институт почвоведения и агрохимии

(Дата поступления статьи в редакцию 20.02.2018 г.)

Ферментативная диагностика — важный элемент экологического менеджмента почв для количественной оценки влияния антропогенных факторов, в том числе удобрений, на их биологический статус. Цель ферментативной диагностики — определение активности ключевых гидролитических и окислительных ферментов, ответственных за процессы гумификации и минерализации, формирующие плодородие почв, для их сравнения, выявления дисбаланса с целью сохранения плодородия почв.

Введение

Сохранение плодородия пахотных почв республики, основную часть которых составляют дерново-подзолистые почвы, — приоритетная экологическая задача [1–3]. Для ее решения требуется диагностика потенциальных рисков снижения их плодородия при интенсивной антропогенной нагрузке, прежде всего по удобрениям, которые существенно влияют на агрохимические, агрофизические и биологические свойства почв. В связи с этим возрастает экологическая значимость исследований биологического статуса почв, как основного критерия оценки изменений плодородия под влиянием антропогенных факторов [4–6].

Для исследований биологического состояния почв используется широкий спектр показателей. Однако для диагностических целей наиболее важны данные по активности ключевых биохимических процессов, регулирующих плодородие — минерализации и гумификации органических веществ [4–6]. При интенсивной антропогенной нагрузке необходимо контролировать способность почвы поддерживать эти функции. Учитывая то, что процессы минерализации и гумификации являются биохимическими по природе, для такого контроля наиболее приемлема ферментативная диагностика.

Главные источники поступления ферментов в почву — микроорганизмы и растения [7]. В почвах обнаружены представители всех известных классов ферментов, но решающую роль играют два класса — гидролитические и окислительные ферменты, выполняющие критические функции — минерализацию и гумификацию органических веществ [4, 5, 6].

Веским аргументом в пользу ферментативной диагностики является быстрая реакция на антропогенное воздействие, что позволяет своевременно регистрировать негативные экологические тенденции [6]. Преимущество состоит также в большей стабильности ферментативных показателей по сравнению с другими биологическими характеристиками [4, 6]. Значительную часть ферментного пула почвы составляют внеклеточные ферменты, находящиеся в стабилизированном состоянии за счет прочных связей с ее минеральными и органическими компонентами [5, 8]. Стабилизированные ферменты устойчивы к протеолизу, защищены от инактивации, длительно сохраняют активность и функционируют при неблагоприятных условиях.

Цель работы — показать потенциальные возможности ферментативной диагностики на примере исследований, проведенных на дерново-подзолистых почвах легкосуглинистого гранулометрического состава.

Enzyme diagnostics is an important element of ecological soil management for the quantitative estimation of anthropogenic factors (including fertilizers) effect on soil biological status. Main purpose of enzyme diagnostics is the measurement of key hydrolytic and oxidation enzymes activities responsible for humification and mineralization of organic substances, compartment and detection of their imbalance in order to save soil fertility status.

Объекты и методы исследований

Биохимические исследования были проведены в длительном стационарном опыте Института почвоведения и агрохимии на дерново-подзолистой легкосуглинистой почве (Щемяслица) в зернотравяном севообороте.

Схема опыта включала одностороннее применение трех доз азота N_{18} , N_{36} и N_{54} , парные комбинации элементов питания $N_{36}P_{30}$, $N_{36}K_{66}$ и $P_{30}K_{66}$, полное минеральное удобрение $N_{54}P_{60}K_{132}$ и вариант с дробным внесением азота — $*N_{54}P_{60}K_{132}$. Органические удобрения внесены общим фоном — 8 т/га севооборотной площади. Севооборот зернотравяной: пелюшко-овсяная смесь — озимое тритикале с подсевом клевера — клевер луговой первого г. п. — клевер луговой второго г. п. — яровая пшеница. Повторность — 4-кратная. Общая площадь делянки — 69 м², учетная — 43 м².

Ферментативная диагностика почвы проведена по гидролитическим (инвертаза и уреазы) и окислительным (полифенолоксидаза и пероксидаза) ферментам. Активность ферментов определяли в воздушно-сухих почвенных образцах. Для определения активности инвертазы применяли колориметрический метод Т. А. Щербаковой (субстрат сахараза) [5]. Уреазную активность почвы определяли по методу Т. А. Щербаковой (субстрат мочевины) [5]. Для определения активности почвенных оксидаз, полифенолоксидазы и пероксидазы использован колориметрический метод Л. А. Карягиной, Н. А. Михайловской (субстрат гидрохинон) [9].

Результаты исследований и их обсуждение

Для диагностических целей целесообразно использовать ферментативные показатели, тесно связанные с органическим веществом — основополагающим фактором плодородия почвы, определяющим ее физические, химические и биологические свойства. Необходимо учитывать, что для объективной характеристики биологического статуса следует базироваться на универсальных и агрономически значимых биохимических процессах, регулирующих минерализацию и гумификацию в циклах биогенных элементов.

Известно, что наиболее масштабные минерализационные процессы, формирующие плодородие почвы, — это аммонификация в цикле азота и разложение целлюлозы в цикле углерода [4]. Наиболее значимый процесс, ведущий к образованию органического вещества, — гумификация лигнинов растительных остатков в цикле углерода [4, 11–14].

Активность фермента — количественная характеристика скорости протекания конкретного биохимического

процесса, которая выражается количеством превращенного субстрата за единицу времени на единицу массы почвы. Соотношение скоростей протекания минерализационных и гумификационных процессов показывает направленность трансформации органических веществ и позволяет определять тенденции изменения плодородия под влиянием антропогенных факторов.

Ферментативные показатели скорости минерализации. Одним из широко применяемых тестов ферментативной диагностики для характеристики биологического состояния почвы является ее *инвертазная активность*. Основание для использования активности инвертазы – ее критическая роль в высвобождении низкомолекулярных сахаров. По данным Д. Г. Звягинцева, для диагностики способности почвы накапливать усвояемые структурные единицы наиболее целесообразно использовать активность ферментов завершающих стадий гидролиза, когда образуются конечные продукты [4, 10]. Инвертаза – один из немногих ферментов, определение активности которого в лабораторных условиях проводится с ее естественным субстратом. Инвертазная активность тесно положительно коррелирует с содержанием органического вещества в почве. По средним данным, ее связь с гумусом характеризуется $R^2 = 0,90$, с активным органическим веществом – $R^2 = 0,92$ ($P \leq 0,05$) [5].

Количественным показателем скорости минерализации азотсодержащих органических соединений (аммонификации) и накопления минерального азота, доступного для питания растений, служит *уреазная активность*. Азот, входящий в состав белков и их производных, в результате аммонификации переходит в минеральную форму и становится доступным для растений. На завершающих стадиях аммонификации, обеспечивающих непосредственное поступление аммония в почву, действуют амидогидролазы, к которым относится уреаз. Основанием для использования активности уреазы является ее критическая роль в высвобождении аммония из органических азотсодержащих соединений. В пользу выбора уреазной активности в качестве диагностического показателя способности почвы к минерализации органического азота свидетельствует и то, что в лабораторных условиях активность фермента определяют с его естественным субстратом. Корреляционно-регрессионный анализ указывает на тесную положительную корреляцию активности уреазы с содержанием активной и инертной фракций органического вещества. По средним данным, связь активности уреазы с гумусом характеризуется $R^2 = 0,75$, с активным органическим веществом – $R^2 = 0,79$ ($P \leq 0,05$) [5].

Ферментативные показатели скорости гумификации. Наиболее универсальным и масштабным процессом, ведущим к синтезу органических веществ, является гумификация лигнинов растительных остатков [4, 11–14]. По современным представлениям, начальные стадии гумификации лигнинов носят окислительный характер [12–14], что обусловлено их трудной гидролизуемостью. Катализаторами окисления лигнина признаны оксидазы – *полифенолоксидазы* (ПФО) и *пероксидазы* (ПО), окисляющие ароматические соединения до хиноидных структур [5, 6, 11–14], способных вступать в реакции конденсации (окислительной полимеризации) с азотсодержащими соединениями (аминокислотами и пептидами) с образованием гуминовых кислот [11, 13, 14].

В почве окислительная полимеризация ароматических соединений протекает двумя путями: при участии кислорода воздуха (ПФО) и за счет кислорода перекиси водорода (ПО). Основанием для использования активности оксидаз в качестве диагностических показателей служит их тесная положительная корреляция с содержанием гумуса. По средним данным, коэффициенты детерминации

R^2 составили: для пероксидазы – 0,90, для полифенолоксидазы – 0,82 ($P \leq 0,05$) [6].

Биохимическая оценка направленности трансформации органических веществ почвы. При изучении влияния антропогенных факторов на плодородие почв решающую роль играет оценка соотношения скоростей гумификации и минерализации, которая выявляет их баланс или дисбаланс и способствует определению приемов экологически оптимального воздействия на почвы. Для этого энзиматические показатели группируют по направленности действия ферментов. Относительную скорость минерализации (%) рассчитывают по активности гидролитических ферментов циклов С и N (инвертазы и уреазы), скорость гумификации (%) – по активности окислительных ферментов (полифенолоксидазы и пероксидазы). Для сравнительного анализа энзиматических показателей, выраженных в разных единицах измерения, изучаемые характеристики оцениваются в относительных единицах (%) по отношению к контрольному варианту [15].

В длительном стационарном опыте проведена ферментативная диагностика дерново-подзолистых почв легкосуглинистого гранулометрического состава по ключевым гидролитическим и окислительным ферментам (таблица 1), установлены биохимические показатели скорости минерализации и гумификации (таблица 2). Для интерпретации данных ферментативной диагностики использован биохимический коэффициент (K_6), представляющий собой соотношение скоростей протекания гумификационных (Г) и минерализационных (М) процессов. Расчеты биохимических коэффициентов позволяют устанавливать направленность изменения плодородия почвы под действием антропогенных факторов. Снижение биохимического коэффициента ($K_6 < 1$) указывает на преобладание минерализационных процессов (сдвиг в сторону минерализации органических веществ), его повышение ($K_6 > 1$) свидетельствует о более активном протекании гумификации (сдвиг в сторону гумификации органических веществ). Относительный баланс гумификации и минерализации наблюдается при значениях K_6 близких к единице (таблица 2).

Сравнительный анализ данных ферментативной диагностики по результирующему показателю – биохимическому коэффициенту K_6 и продуктивности севооборота позволил сделать следующие заключения:

- сбалансированность процессов гумификации и минерализации отмечена на фоне внесения навоза – 8 т/га севооборотной площади ($K_6 = 0,98$);
- одностороннее применение азотных удобрений на фонах навоза приводило к сдвигу в сторону преобладания минерализации, скорость которой повышалась с увеличением дозы азота; при внесении N_{18} , N_{36} и N_{54} биохимические коэффициенты снижались до 0,92, 0,86 и 0,82 соответственно;
- парные комбинации элементов питания в разной степени снижали биохимический коэффициент; экологически наиболее приемлемо сочетание $P_{30}K_{66}$ ($K_6 = 0,92$); комбинация $N_{36}K_{66}$ резко активизировала минерализацию ($K_6 = 0,77$);
- применение N_{54} в полном минеральном удобрении $N_{54}P_{60}K_{132}$ приводило к дальнейшему снижению биохимического коэффициента K_6 до 0,74;
- дробное внесение азота $*N_{54}P_{60}K_{132}$ экологически более целесообразно, при этом отмечался сберегающий уровень минерализации, а биохимический коэффициент K_6 возрастал до 0,85.

Заключение

Ферментативная диагностика служит важным элементом экологического менеджмента почв, позволяющим количественно оценивать влияние антропогенных

Таблица 1 – Влияние удобрений на ферментативную активность дерново-подзолистой легкосуглинистой почвы (Щемяслица, 2011–2013 гг.)

Вариант	Продуктивность, ц/га к. ед.	Уреаза, мг N-NH ₄ ⁺ /кг	Инвертаза, мг глюкозы/кг	ПФО, мг хинона/кг	ПО, мг хинона/кг
Без удобрений	93,4	149,1	1279	34,0	32,4
Навоз, 8 т/га – фон	103,9	158,9	1504	37,7	35,6
N ₁₈	113,6	165,2	1589	36,7	35,3
N ₃₆	116,3	168,0	1842	37,4	36,2
N ₅₄	115,0	169,4	1917	40,3	37,2
N ₃₆ P ₃₀	119,1	168,0	2218	38,9	36,7
N ₃₆ K ₆₆	120,7	190,8	2238	40,1	37,6
P ₃₀ K ₆₆	118,1	170,3	2110	43,2	42,8
N ₅₄ P ₆₀ K ₁₃₂	123,8	210,0	2929	47,9	42,0
*N ₅₄ P ₆₀ K ₁₃₂	126,2	193,2	1995	43,8	36,6
HCP ₀₅	6,25	18,51	283,4	2,92	4,64

Таблица 2 – Влияние удобрений на активность минерализации (М) и гумификации (Г) в дерново-подзолистой легкосуглинистой почве (Щемяслица, 2011–2013 гг.)

Вариант	Минерализация, %			Гумификация, %			K _{бх} = (Г %/М %))
	уреаза	инвертаза	М, %	ПФО	ПО	Г, %	
Без удобрений	100	100	100	100	100	100	1,00
Навоз, 8 т/га – фон	107	118	113	111	110	111	0,98
N ₁₈	111	124	118	108	109	109	0,92
N ₃₆	113	144	129	110	112	111	0,86
N ₅₄	114	150	132	119	115	117	0,82
N ₃₆ P ₃₀	113	173	143	114	113	114	0,87
N ₃₆ K ₆₆	128	175	152	118	116	117	0,77
P ₃₀ K ₆₆	115	165	140	127	132	130	0,92
N ₅₄ P ₆₀ K ₁₃₂	141	229	185	141	130	136	0,74
*N ₅₄ P ₆₀ K ₁₃₂	130	156	143	129	113	121	0,85

факторов, в том числе удобрений, на их биологический статус. Данные ферментативной диагностики позволяют сравнивать скорости протекания гумификационных и минерализационных процессов, формирующих плодородие почв.

Для интерпретации данных ферментативной диагностики предлагается результирующий показатель – биохимический коэффициент K_{бх}, выявляющий дисбаланс ключевых биохимических процессов, гумификации и минерализации органических веществ, что позволяет своевременно регистрировать потенциальные риски снижения плодородия почв.

На основании выполнения ферментативной диагностики и расчета биохимических коэффициентов можно заключить, что на дерново-подзолистой легкосуглинистой почве экологически наиболее обоснована система удобрения, ориентированная на поддержание баланса фосфора и калия с дробным внесением азота N₅₄ на фоне P₆₀K₁₃₂, которая обеспечивала наиболее высокую продуктивность зернотравяного севооборота (126,2 ц/га к. ед.) при сберегающем уровне минерализации органических веществ и K_{бх} = 0,85.

Литература

1. Агрохимическая характеристика почв сельскохозяйственных земель Республики Беларусь (2013–2016) / Институт почвоведения и агрохимии // Под общ. ред. И. М. Богdevича. – Минск, 2017. – 275 с.
2. Лапа, В. В. Плодородие почв Республики Беларусь, проблемы и перспективы / В. В. Лапа // Почвоведение и агрохимия. – 2010. – № 1(44). – С. 7–14.

3. Лапа, В. В. Активность процессов минерализации и гумификации в высокоокультурной дерново-подзолистой легкосуглинистой почве в зависимости от применения удобрений / В. В. Лапа, Н. А. Михайловская // Доклады НАН Беларуси. – 2015. – Том 59. – № 5. – С. 122–128.
4. Звягинцев, Д. Г. Биология почв / Д. Г. Звягинцев, И. Л. Бабьева, Г. М. Зеннова. – М.: МГУ, 2005. – 445 с.
5. Щербакова, Т. А. Ферментативная активность почв и трансформация органического вещества / Т. А. Щербакова. – Минск: Наука и техника, 1983. – 221 с.
6. Биохимические и микробиологические критерии оценки плодородия почв и нормирования антропогенной нагрузки: метод. рекомендации / РУП «Институт почвоведения и агрохимии»; В. В. Лапа [и др.]. – Минск, 2015. – 40 с.
7. Ladd, J. N. Origin and range of enzymes in soil / J. N. Ladd // Soil Enzymes / Ed. R. G. Burns. – Academic Press; London, 1978. – P. 51–96.
8. Boyd, S. A. Enzyme interactions with clays and clay-organic matter complexes / S. A. Boyd, M. M. Mortland // Soil Biochemistry. – New York: Marcel Dekker, 1990. – P. 1–28.
9. Карагіна, Л. А. Вызначэнне актыўнасці поліфенолакідазы і пераксідазы ў глебе / Л. А. Карагіна, Н. А. Міхайлоўская // Весці АН БССР. Сер. с/г навук. – 1986. – № 2. – С. 40–41.
10. Звягинцев, Д. Г. Биологическая активность почв и шкалы для оценки некоторых ее показателей / Д. Г. Звягинцев // Почвоведение. – 1978. – № 6. – С. 48–52.
11. Александрова, Л. Н. Органическое вещество почвы и процессы его трансформации. / Л. Н. Александрова. – Л.: Наука, 1980. – С. 122–133.
12. Kirk, T. K. Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin / T. K. Kirk, R. L. Ferrell // Annu. Rev. Microbiol. – 1987. – V. 41. – P. 465–505.
13. Гулько, А. Е. Фенолоксидазы почв: продуцирование, иммобилизация, активность / А. Е. Гулько, Ф. Х. Хазиев // Почвоведение. – 1992. – № 11. – С. 55–67.
14. Хазиев, Ф. Х. Некоторые свойства гумус-пероксидазного комплекса / Ф. Х. Хазиев, А. Е. Гулько // Почвоведение. – 1990. – № 2. – С. 30–36.
15. Ацци, Ж. Сельскохозяйственная экология / Ж. Ацци. – М.: Ил., 1959. – 479 с.