

УДК 631.4

ВЛИЯНИЕ МЫШЬЯКА НА СОДЕРЖАНИЕ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ ПОЧВЫ

Р.В. Окунев, Б.Р. Григорьян

Аннотация

В лабораторном опыте исследовано влияние мышьяка, вносимого в почву в виде арсената(V) натрия в различных концентрациях (0, 0.1, 1, 5, 50, 200, 1200, 4000 мг/кг As), на содержание свободных аминокислот. В диапазоне концентраций от 0.1 до 5 мг/кг As(V) изменений в их составе не наблюдалось. При 50 и 200 мг/кг As(V) происходит увеличение содержания всех аминокислот. Дальнейшее увеличение дозы элемента (1200 мг/кг) вызвало снижение содержания группы полярных незаряженных аминокислот по сравнению с контрольным образцом.

Ключевые слова: мышьяк в почвах, свободные аминокислоты, аминокислоты почвы, ВЭЖХ аминокислот.

Введение

В условиях усиливающейся антропогенной нагрузки высок риск загрязнения почвы токсичными элементами, такими как кадмий, свинец, мышьяк, ртуть, хром, медь и т. д. Поглощаясь растениями и далее передаваясь по пищевой цепи, эти элементы наносят серьезный вред здоровью человека и животных, вызывая тяжелые заболевания кожных покровов и внутренних органов [1]. Мышьяк является одним из наиболее опасных загрязнителей. В зависимости от состава почвообразующей породы природные почвы содержат от 0.2 до 40 мг/кг мышьяка. Одной из самых распространенных форм нахождения элемента в почвах является арсенат (V) натрия [2]. В результате антропогенной нагрузки его содержание может многократно увеличиваться [3, 4], что приводит к изменению свойств почвы (таких как pH, активность ферментов, численность микроорганизмов и т. д.) и протекающих в ней биохимических процессов [5, 6]. В итоге, мышьяковое загрязнение может привести к изменению содержания питательных веществ в почвах, в том числе и свободных аминокислот, которые являются важным источником азотного питания растений и микроорганизмов [7].

Цель настоящей работы – оценить влияние мышьяка, вносимого в виде арсената (V) натрия в почву, на содержание свободных аминокислот в темно-серой лесной почве.

1. Материалы и методы

Объектом исследования выбрана темно-серая лесная почва на делювиальном суглинке, отобранная на глубине 1–20 см и имеющая следующие химические свойства: содержание органического углерода – 4.8%; валового азота – 0.42%; мышьяка – 3.4 мг/кг.

Воздушно-сухие образцы почвы насыщались водными растворами Na_3AsO_4 различных концентраций так, чтобы содержание мышьяка в пробах составило 0, 0.1, 1, 5, 50, 200, 1200, 4000 мг/кг. Затем пробы доводились бидистиллированной стерильной водой до 70% от полной влагоемкости и инкубировались при постоянной влажности и комнатной температуре (20 °С) в течение трех недель. Указанного времени будет достаточно, чтобы загрязнитель повлиял на свойства почвы [8].

Содержание свободных аминокислот определяли в водных вытяжках из почвы. Для этого 2 г почвы заливали 20 мл воды и встряхивали на ротаторе в течение 30 мин. Суспензию фильтровали через беззольный фильтр «синяя лента». Для аминокислотного анализа 400 мкл фильтрата дополнительно профильтровывали через мембранный фильтр с диаметром пор 0.2 мкм и выпаривали на водяной бане под вакуумом при 60–70 °С. Сухой остаток проходил процедуру модификации фенилизотиоцианатом для получения производных аминокислот [9], которые хроматографировались на ВЭЖХ Flexar (Perkin Elmer, США) с обратной-фазной колонкой Brownlee Analytical C18 и УФ-детектором, настроенным на длину волны 254 нм. Для определения количественного и качественного содержания использовали стандартные образцы индивидуальных аминокислот (Sigma Aldrich, Бельгия). Подсчет концентраций проводили по площадям пиков. Статистическая обработка результатов выполнена с помощью программы Statistica. Данные в тексте и на диаграммах представлены как среднее \pm стандартное отклонение ($n = 3$; $p < 0.05$). Для установления взаимосвязей между значениями переменных использовали корреляционный анализ по Спирмену. Значимость различий полученных данных определяли с помощью U-критерия Манна – Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

2. Результаты и их обсуждение

Вне зависимости от содержания мышьяка во всех инкубированных образцах было обнаружено шестнадцать свободных протеиногенных аминокислот, среди которых: неполярные – валин, изолейцин, лейцин, фенилаланин, пролин, аланин; полярные незаряженные – аспарагин, глицин, тирозин, треонин, серин; полярные заряженные положительно – аргинин, гистидин, лизин; полярные заряженные отрицательно – аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота (рис. 1). Пики аланина и пролина на хроматограмме разделить не удалось, поэтому считали их суммарное содержание.

Сумма свободных аминокислот (ССА) в вытяжке, полученной из незагрязненной арсенатом контрольной пробы, составляет 12 ± 1.6 мкмоль. По данным [7], содержание аминокислот в почвах зависит от многих биотических и абиотических факторов и может варьировать в пределах от 0 до 158 мкмоль. В пробах с содержанием от 0.1 до 5 мг/кг As(V) значения ССА совпадают с контролем, а в пробах с содержанием As(V) 50 и 200 мг/кг наблюдается увеличение ССА (рис. 2). Причем максимальная концентрация аминокислот составляет 94.1 ± 11.3 мкмоль (при 200 мг/кг мышьяка), что в 7.8 раз больше, чем в контрольном образце. В образцах с содержанием 1200 и 4000 мг/кг As(V) свободных аминокислот содержится меньше, чем в образцах с 200 мг/кг As(V).

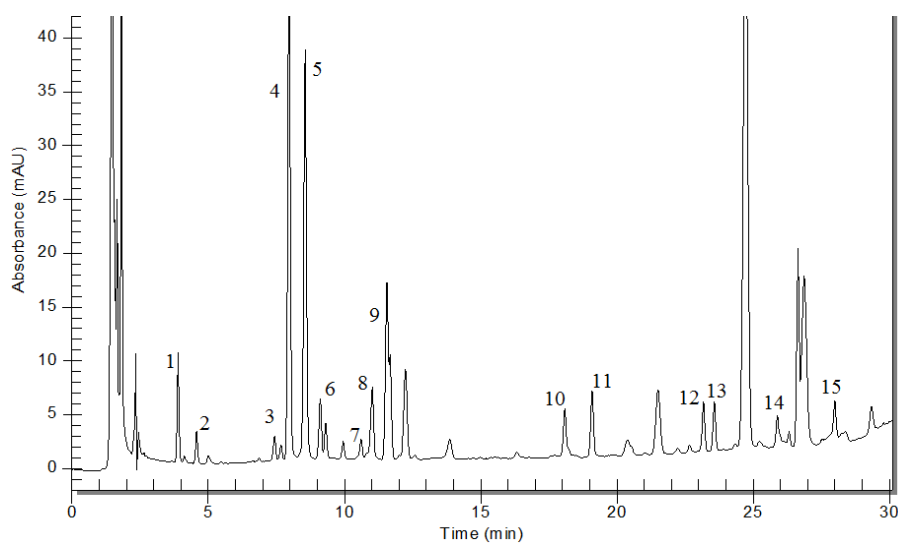


Рис. 1. Хроматограмма свободных аминокислот водной вытяжки темно-серой лесной почвы. Пики: 1 – аспарагиновая кислота; 2 – глутаминовая кислота; 3 – аспарагин; 4 – серин; 5 – глицин; 6 – гистидин; 7 – аргинин; 8 – треонин; 9 – аланин + пролин; 10 – тирозин; 11 – валин; 12 – изолейцин; 13 – лейцин; 14 – фенилаланин; 15 – лизин

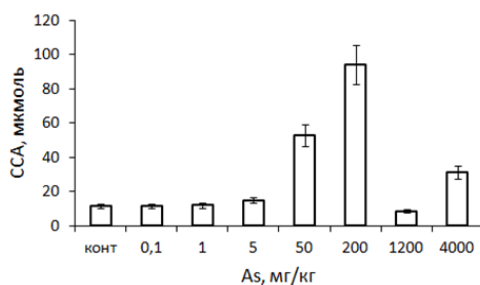


Рис. 2. Концентрация свободных аминокислот при разных содержаниях As в почвах

Значительная часть фонда свободных аминокислот представлена серином (17.4–25.4% от ССА) и глицином (17.2–25.9% от ССА), наименьшее содержание получено для изолейцина (1.4–2.7%), лейцина (2.2–2.6%) и фенилаланина (1.4–4.0%). Процентное соотношение групп аминокислот (классификация по радикалу) в основном варьирует в небольших пределах и не имеет достоверной линейной корреляционной связи с концентрацией мышьяка в почвах. Концентрация 1200 мг/кг As(V) вызвала снижение относительного содержания полярных незаряженных аминокислот в 1.4 раза по сравнению с контролем и повышение содержания остальных групп.

Таким образом, в почве под действием загрязнителя суммарное содержание свободных аминокислот изменяется в зависимости от дозы загрязнителя при 50, 200 и 4000 мг/кг As(V). Относительное содержание различных групп аминокислот изменилось лишь при дозе 1200 мг/кг As(V). Согласно литературным данным, причины изменения содержания могут быть разнообразны. Скорости минерализации и биodeградации аминокислот напрямую связаны с количеством, структурой и активностью микроорганизмов почвы. В зависимости от метаболического

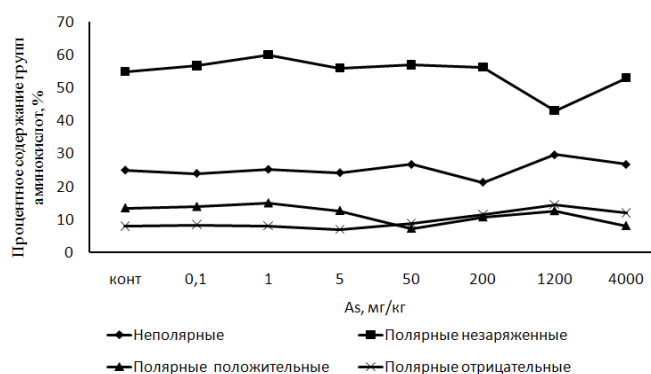


Рис. 3. Процентное содержание групп аминокислот (классификация по радикалу) от ССА

статуса микроорганизмов они могут использовать аминокислоты для производства энергии, увеличения биомассы или поддержания жизнеспособности клеток [10]. При загрязнении окружающей среды на поддержание жизнеспособности клеток может уходить гораздо больше энергии и материалов, в том числе и аминокислот [11, 12], которые, вероятно, расходуются организмами на системы репарации клеток или выведение токсикантов. Кроме того, изменение концентрации аминокислот может происходить в результате гибели микроорганизмов под воздействием загрязнителя [12], активного развития толерантных к элементу микроорганизмов или биохимической трансформации аминокислот в почве [13]. С ростом концентрации загрязнителя вышеперечисленные факторы, и в первую очередь количество, структура и активность микроорганизмов, будут меняться [11, 14], что, вероятно, и обуславливает нелинейность ($r = 0.38$; $n = 3$) изменения содержания аминокислот в зависимости от дозы. Однако для точного объяснения причин изменения содержания необходимо проводить дополнительные исследования.

Заключение

В результате внесения мышьяка в форме арсената (V) натрия в почву может наблюдаться изменение содержания свободных аминокислот. При этом наибольшая их концентрация наблюдается при внесении As(V) в дозе 200 мг/кг. При 1200 мг/кг As(V) изменяется соотношение различных групп аминокислот. Таким образом, внесение различных доз As(V) по-разному влияет на состав и содержание свободных аминокислот почвы.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

Литература

1. Järup L. Hazards of heavy metal contamination // Br. Med. Bull. – 2003. – V. 68. – P. 167–182.
2. 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.

3. *Бабошкина С.В., Пузанов А.В., Ельчинонова О.А., Горбачев И.В.* Мышьяк в почвах техногенных ландшафтов Алтая // Ползуновский вестн. Биогеохимия. – 2005. – № 4. – С. 153–156.
4. *Водяницкий Ю.Н.* Хром и мышьяк в почвах (Обзор литературы) // Почвоведение. – 2009. – № 5. – С. 551–559.
5. *Prasad P., George J., Masto R.E., Rout T.K., Ram L.C., Selvi V.A.* 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.
6. *Das S., Jean J.-S., Kar S., Chakraborty S.* Effect of arsenic contamination on bacterial and fungal biomass and enzyme activities in tropical arsenic-contaminated soils // Biol. Fertil. Soils. – 2013. – V. 49, No 6. – P. 757–765.
7. *Jamtgard S.* The occurrence of amino acids in agricultural soil and their uptake by plants: Doct. Thesis. – Umeå, 2010. – 52 p.
8. *Diaz-Ravin M., Bååth E.* Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels // Appl. Environ. Microbiol. – 1996. – V. 62, No 8. – P. 2970–2977.
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. Sib. Fed. Univ. Chemistry. – 2014. – V. 7, No 4. – P. 480–486.
10. *Anraku Y.* Transport and utilization of amino acids by bacteria // Microorganisms and Nitrogen Sources / Ed. by J.W. Payne. – London: J. Wiley and Sons, 1980. – P. 9–33.
11. *Valsecchi G., Gigliotti C.* Microbial biomass, activity, and organic matter accumulation in soils contaminated with heavy metals // Biol. Fertil. Soils. – 1995. – V. 20, No 4. – P. 253–259.
12. *Shentu J., He Z.-l., Yang X., Li T.-Q.* Microbial activity and community diversity in a variable charge soil as affected by cadmium exposure levels and time // J. Zhejiang Univ. Sci. B. – 2008. – V. 9, No 3. – P. 250–260.
13. *Dippold M.A., Kuzyakov Y.* Biogeochemical transformations of amino acids in soil assessed by position-specific labeling // Plant Soil. – 2013. – V. 373. – P. 385–401.
14. *Turpeinen R.* Interactions between metals, microbes and plants – Bioremediation of arsenic and lead contaminated soils: Acad. Diss. in Environmental ecology. – Lahti, 2002. – 48 p.

Поступила в редакцию
26.01.15

Окунев Родион Владимирович – аспирант кафедры почвоведения, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: tutinkaz@yandex.ru

Григорьян Борис Рубенович – кандидат биологических наук, доцент кафедры почвоведения, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: Boris.Grigoryan@kpfu.ru

* * *

THE EFFECT OF ARSENIC ON THE FREE AMINO ACID COMPOSITION IN SOIL

R.V. Okunev, B.R. Grigoryan

Abstract

Laboratory experiments were performed to evaluate the effect of arsenic on the free amino acid composition in soil. The samples were contaminated with arsenic in the form of sodium arsenate(V)

at different concentrations (0, 0.1, 1, 5, 50, 200, 1200, 4000 mg/kg As). There were no changes in the amino acid composition for the concentrations of 0.1–0.5 mg/kg As(V). The amino acids content increased at the concentrations of 50 and 200 mg/kg As(V). After the addition of 1200 mg/kg arsenic, the content of polar uncharged amino acids decreased as compared to the control sample.

Keywords: arsenic in soils, free amino acids, soil amino acid composition, HPLC of amino acids.

References

1. Järup L. Hazards of heavy metal contamination. *Br. Med. Bull.*, 2003, vol. 68, pp. 167–182.
2. Moreno-Jimenez E., Esteban E., Penalosa J.M. The fate of arsenic in soil-plant systems. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 2012, vol. 215, pp. 1–37.
3. Baboshkina S.V., Puzanov A.V., Elchininova O.A., Gorbachev I.V. Arsenic in the soils of technogenic landscapes of Altai. *Polzunovsky Vestn. Biogeokhim.*, 2005, no. 4, pp. 153–156. (In Russian)
4. Vodyanitskii Yu.N. Chrome and arsenic in soils (review). *Pochvovedenie*, 2009, no. 5, pp. 551–559. (In Russian)
5. Prasad P., George J., Masto R.E., Rout T.K., Ram L.C., Selvi V.A. Evaluation of microbial biomass and activity in different soils exposed to increasing level of arsenic pollution: a laboratory study. *Soil Sediment. Contam.*, 2013, vol. 22, pp. 483–497.
6. Das S., Jean J.-S., Kar S., Chakraborty S. Effect of arsenic contamination on bacterial and fungal biomass and enzyme activities in tropical arsenic-contaminated soils. *Biol. Fertil. Soils*, 2013, vol. 49, no. 6, pp. 757–765.
7. Jämtgård S. The occurrence of amino acids in agricultural soil and their uptake by plants. *Doct. Thesis*. Umeå, 2010. 52 p.
8. Diaz-Ravin M., Bååth E. Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, vol. 62, no. 8, pp. 2970–2977.
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. Sib. Fed. Univ., Chem.*, 2014, vol. 7, no. 4, pp. 480–486.
10. Anraku Y. Transport and utilization of amino acids by bacteria. *Microorganisms and Nitrogen Sources*. Payne J.W. (Ed.). London, J. Wiley and Sons, 1980, pp. 9–33.
11. Valsecchi G, Gigliotti C. Microbial biomass, activity, and organic matter accumulation in soils contaminated with heavy metals. *Biol. Fertil. Soils*, 1995, vol. 20, no. 4, pp. 253–259.
12. Shentu J., He Z.-I., Yang X., Li T.-Q. Microbial activity and community diversity in a variable charge soil as affected by cadmium exposure levels and time. *J. Zhejiang Univ., Sci., B*, 2008, vol. 9, no. 3, pp. 250–260.
13. Dippold M.A. Kuzyakov Y. Biogeochemical transformations of amino acids in soil assessed by position-specific labeling. *Plant Soil*, 2013, vol. 373, pp. 385–401.
14. Turpeinen R. Interactions between metals, microbes and plants – Bioremediation of arsenic and lead contaminated soils. *Acad. Diss. Environ. Ecol.* Lahti, 2002. 48 p.

Received
January 26, 2015

Okunev Rodion Vladimirovich – PhD Student, Department of Soil Science, Institute of Environmental Sciences, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: tutinkaz@yandex.ru

Grigoryan Boris Rubenovich – PhD in Biology, Department of Soil Science, Institute of Environmental Sciences, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: Boris.Grigoryan@kpfu.ru