

УДК 631.465:631.445.41:631.474

ПРОТЕАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ МУЧНИСТО-КАРБОНАТНЫХ ЧЕРНОЗЕМОВ ПРИ РАЗНЫХ ТИПАХ ЗЕМЛЕПОЛЬЗОВАНИЯ[§]

© 2024 г. Э. О. Чимитдоржиева*

*Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН
670047 Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6, Россия***E-mail: erzhenach@mail.ru*

Исследовали протеазную активность черноземов мучнисто-карбонатных (Naplic Chernozem Hurocalcic) при различных типах землепользования – пашня, целина, залежь. Ареал исследования расположен в Тугнуйской котловине, Мухоршибирский р-н, Республика Бурятия. Активность фермента протеазы определяли методом аппликации с использованием фотопленки, которую закладывали в слой 0–20 см почвы. Наблюдения за протеазной активностью в первый год исследования показали, что максимум активности приходился на конец июля–начало августа. На пашне показатель был равен 35–39, на залежи – 34–36, на целине – 33–39%. На 2-й год исследования протеолитическая активность возрастала с начала вегетационного периода. Первый пик активности наблюдали во 2-й половине июля, что составило 44% на пашне, 43% – на залежи и 47% – на целине. Второй пик протеазной активности приходился на 2-ю половину августа и составил 30% на пашне, 35% – на залежи и 37% – на целине. В черноземах протеолитическая активность имела более высокие показатели на целине, ее интенсивность уменьшалась от пашни к залежи. Это свидетельствовало о средней протеолитической активности в черноземах мучнисто-карбонатных при различных типах землепользования. Очаговость и мозаичный характер были отмечены при гидролизе желатина в результате 10-суточной экспозиции во всех вариантах. Это свидетельствовало о неравномерном распределении ферментных систем в почвенной толще и наличии отдельных микрозон с различной активностью протеаз. Статистическая обработка данных показала, что активность протеаз зависела от гидротермических условий.

Ключевые слова: протеолитическая активность, черноземы, целина, залежь, пашня, Западное Забайкалье.

DOI: 10.31857/S0002188124080126, **EDN:** CDKZLA

ВВЕДЕНИЕ

Важную роль в превращении азота в почвах играют ферменты, которые в азотном режиме почв определяют скорость процессов цикла трансформации азота, таким специфическим ферментом является протеаза [1]. Этот фермент активирует протеолиз, который служит инициатором для последующих этапов преобразования белков. Протеазная активность почвы является важным показателем, способствующим циркуляции иммобилизованного азота. Обработка почвы коренным образом влияет на ход и направление почвенно-биологических процессов, что отражается на интенсивности и направленности гидролиза азотистых соединений

в почве. Повышение ферментного потенциала достигается благодаря прогрессивной системе обработки почвы, которая улучшает агрофизические свойства, микробиологическую активность и плодородие почвы в целом [2].

Протеазы в почве происходят из ряда различных источников, включая микроорганизмы и растения [3–7]. Некоторые микобактерии и клостридии, выделенные из лесных почв, а также некоторые термотолерантные лигнинолитические грибы являются исключением среди большинства почвенных микроорганизмов, которые проявляют протеолитическую активность [8, 9]. Классификация, функции и регуляция активности протеаз из разных групп микроорганизмов были освещены в нескольких обзорах [10–12].

Микроорганизмы почв производят протеазы для разложения органического вещества почв, обеспечивая себя энергией [13]. Протеазы также играют роль в выживании микроорганизмов

[§] Работа выполнена по теме Госзадания № 121030100228-4 “Эволюционно-генетические, биогеохимические и продукционные функции почв Байкальского региона как компонента биосферы, оценка их ресурсного потенциала и разработка технологий рационального использования и охраны”.

в неблагоприятных условиях [14]. Оптимальный рН для каталитической активности микробных протеаз варьирует от 3.0 до 12.0 ед. [7], в то время как большинство микроорганизмов, выделенных из почвы, достигают оптимальной активности протеаз при рН 8.0–9.0 и температуре 40–60°C [15].

Протеазы и другие ферменты связаны с различными биотическими и абиотическими компонентами, включая активные и неактивные клетки, остатки клеточного материала, глинистые минералы, гуминовые коллоиды и водную фазу почвы. Размер и растворимость субстрата, тип микроорганизма и физическая и химическая природа почвенных коллоидов могут оказывать влияние на расположение ферментов [16].

Важно отметить, что ферменты, которые катализируют биохимические процессы в почве и участвуют в круговороте основных биогенных элементов, также могут быть использованы в качестве ранних индикаторов изменений типа землепользования [1, 17–21].

Интересно, что при распашке почв ферментативная активность снижается из-за уменьшения содержания органического углерода и микробиологической активности [22]. Возрастает ферментативная активность на единицу микробной биомассы при распашке лесной почвы [23]. Изменение структуры микробного сообщества может вызвать высокую ферментативную активность на единицу микробной биомассы в пахотных почвах [24]. Это может быть обусловлено уменьшением содержания микробной биомассы, увеличением скорости продуцирования ферментов микроорганизмами при обработке почв [23] или увеличением доступности питательных элементов. Кроме того, большая скорость синтеза новых ферментов может быть следствием более быстрой оборачиваемости микробной биомассы [25, 26].

Распашка приводит к изменению эрозионно-аккумулятивных процессов в почвах, что может усиливать либо, напротив, уменьшать уже существующие неоднородности ферментативной активности в разных элементах рельефа [27]. В ряде исследований показана зависимость ферментативной активности почвы от ее топографического положения [28–30].

Цель работы – определение протеазной активности мучнисто-карбонатных черноземов при разных типах землепользования.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили черноземы мучнисто-карбонатные различных типов землепользования – пахотные, целинные и залежные

Тугнуйской котловины (Мухоршибирский р-н, Республика Бурятия). Район исследования расположен в Забайкальской провинции промытых черноземов, в суббореальном поясе Центральной лесостепной и степной области. В соответствии с почвенным районированием [31], исследованная территория входит в Тугнуйско-Бичурский котловинный почвенный округ [32].

Активность фермента протеазы определяли методом аппликации с использованием фотопленки, которую закладывали в слой 0–20 см почвы ($n = 5$). Экспозиция – 10 и 30 сут. После окончания срока экспозиции пленку аккуратно извлекали из почвы, промывали, сушили и взвешивали. По разнице в массе до и после экспозиции судили об активности фермента.

Черноземы в Бурятии имеют ограниченную площадь по сравнению с каштановыми почвами. Общая площадь черноземов составляет 96.59 тыс. га (4%): пашня – 77.32 тыс. га (80.1%), сенокосы – 0.50 тыс. га (0.5%) и пастбища – 18.77 тыс. га (19.4%). Распространение черноземов подчинено широтной зональности, которая нарушается условиями рельефа, но вертикальная зональность выражена более четко.

В Бурятии на Тугнуйском хребте находятся основные массивы черноземов, которые занимают более половины его восточной части. Также можно встретить узкую полосу черноземов на восточной части северных склонов Кударинской гряды и на южных склонах хребта Заганский, которые прилегают к Бичурской котловине и верховьям р. Уды на границе с Витимским плоскогорьем. Большая часть черноземов распахана.

В отличие от восточноевропейских “эталонов” условия формирования забайкальских черноземов характеризуются суровым климатом и режимом осадков. В первую очередь резко континентальный климат влияет на черноземы региона через жесткий гидротермический режим, который проявляется в промерзании почв на глубину до 240–270 см на протяжении 6–7 мес. Среднесуточная температура января составляет –23...–28°, а в некоторые годы может опускаться до –47...–54°. Коэффициент увлажнения весеннего и раннелетнего периодов в степях Бурятии крайне низкий и составляет 0.13–0.29, в то время как в период летнего увлажнения (июль–август) достигает единицы. Этот резкий контраст увлажнения отсутствует в других степных районах [33].

Разные авторы, изучившие черноземы региона, классифицировали их в самых различных вариантах: восточносибирские “промытые”, мучнисто-карбонатные, южные, обыкновенные, степные криоаридные. Согласно классификации 1977 г., тип почвы – чернозем мучнисто-карбонатный [34],

по классификации России 2004 г. – чернозем дисперсно-карбонатный (целина) и агрочернозем дисперсно-карбонатный (пашня) [35]. По WRB – *haplic Chernozem Nypocalcic* [36].

Физико-химические характеристики определены классическими методами в почвоведении [37]. Температуру почвы определяли с помощью логгеров – комплекса TCR-0-U с регистратором DS1921, влажность почвы – с помощью портативного прибора Decagon с датчиком 5tm.

Полученные данные обработали методами математической статистики в среде электронной таблицы Microsoft Excel и Statistica 12.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследованные мучнисто-карбонатные черноземы характеризуется невысоким содержанием гумуса, имеют легкий гранулометрический состав и небольшую сумму поглощенных оснований (22.6–29.7 смоль(экв)/кг). Мощность гумусово-аккумулятивного горизонта не превышает 25–33 см, за которым следует небольшой горизонт В, промытый от карбонатов, а под ним находится карбонатный горизонт с мучнистыми скоплениями в мелкозем и натеками на щебенке. В профиле нет малорастворимых солей и гипсового горизонта. Верхние горизонты имеют нейтральную реакцию среды ($pH = 6.7–6.9$ ед.), в то время как наличие карбонатов в средней и нижней частях

профиля обуславливает слабощелочную/щелочную реакцию почвенного раствора.

Результаты наблюдений за протеазной активностью (ПА) указывали на значительную изменчивость показателя на протяжении всего вегетационного периода. Протеазная активность была неодинаковой в различные периоды вегетации и в зависимости от сочетания погодных условий, видового состава и густоты растительного покрова, физиологического состояния растений и микробных сообществ имела ярко выраженную динамику.

Наблюдения за ПА в первый год исследования показали, что в начале периода на всех экспериментальных площадках показатели были низкими (рис. 1), что было обусловлено глубоким промерзанием почв и медленным весенним прогреванием. Лимитирующим фактором в этот период являлась температура почвы (рис. 2а), которая составляла 6.7–9.0°C при влажности почвы 10.1–7.1%. С повышением температуры в течение вегетации ПА постепенно повышалась.

Максимальная протеазная активность отмечена в конце июля–начале августа. На пашне показатель был равен 35–39, на залежи – 34–36, на целине – 33–39%. В конце августа–начале сентября наблюдали уменьшение ПА на пашне до 27, на залежи – до 33, на целине – до 30%. Далее к концу вегетационного сезона протеазная ПА уменьшалась до 9–11% в ряду целина–залежь–пашня.

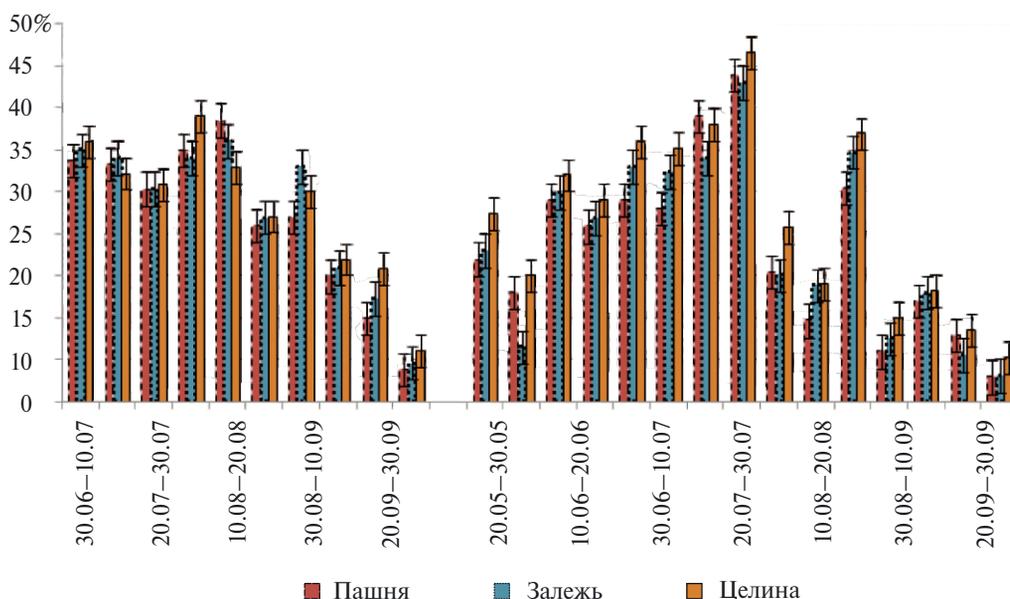


Рис. 1. Протеолитическая активность почв (2018–2019 гг.), %.

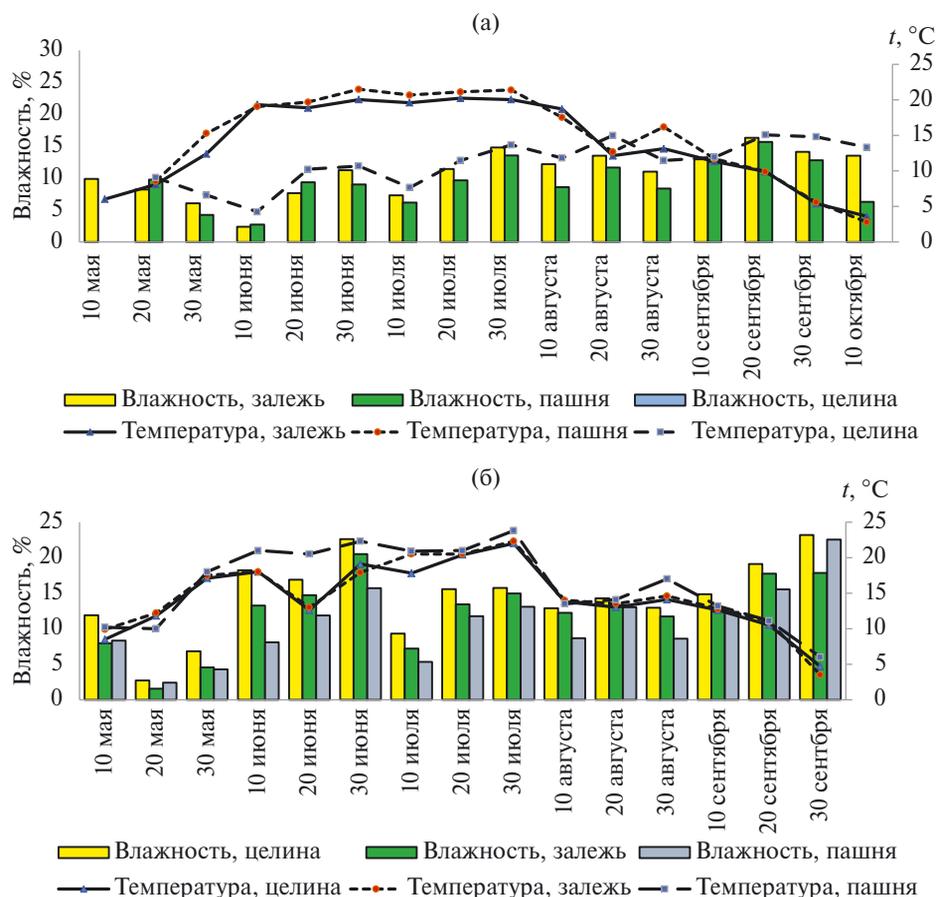


Рис. 2. Температура и влажность почвы: (а) – 2018 г., (б) – 2019 г.

В зависимости от типа землепользования наибольшую протеазную активность наблюдали в целинных почвах, чем в залежных и пахотных. Показатели протеазной активности почв различных угодий, измеренные в один период наблюдений при одинаковых погодно-климатических условиях, различались. Вероятно, это объясняется общим запасом живой биомассы, характером ее пространственного распределения и гумусированностью почв.

Коэффициенты вариации протеазной активности в вегетационном сезоне в основном варьировали от 5.1 до 19.6%. Корреляция ПА с температурой и влажностью почвы была высокой и составляла $r = 0.83-0.99$.

На 2-й год исследования ПА увеличилась с начала вегетационного периода. Первый пик активности наблюдали во 2-й половине июля, и он составил 44% на пашне, 43 – на залежи и 47 – на целине. Второй всплеск протеазной активности приходился на 2-ю половину августа и составлял 30% на пашне, 35 – на залежи и 37 – на целине.

Затем показатель снижился с незначительным пиком в середине сентября до 17, 18 и 18% соответственно. В начале октября ПА была низкой – 8, 8 и 10% соответственно. Отмечено, что совпадению оптимальных условий температуры и влажности (рис. 2б) соответствовала максимальная протеолитическая активность почв.

Во второй год исследования ПА имела более высокие показатели на целине, ее интенсивность уменьшалась от пашни к залежи. Причина этого заключалась в более динамичных условиях теплового и водного обмена, а также периодическом поступлении растительных остатков, которые определяли большую ПА этих почв. На пашне, из-за менее благоприятных физико-химических и гидротермических условий, наблюдали более низкие темпы минерализации желатина, при этом пик протеазной активности приходился на середину июля. Полученные данные указывали на средний уровень ПА в черноземах.

Коэффициенты вариации протеазной активности почв составляли 5.3–21.9%. Корреляция величины ПА с температурой и влажностью почвы была высокой и составляла $r = 0.80-0.99$.

Таким образом, при использовании аппликационного метода в почве была обнаружена топография распределения протеазной активности. Этот метод, помимо определения интенсивности протеолитических процессов, также позволил выявить качественные характеристики. Гидролиз желатина при 10-суточной экспозиции имел мозаичный характер и был неравномерно распределен в почвенной толще, указывая на наличие отдельных микрозон с различной активностью протеаз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, протеазная активность мучнисто-карбонатных черноземов имела наибольшую интенсивность на целине и убывала в сторону залежей и пашни. Эти результаты свидетельствовали о средней протеазной активности в черноземах мучнисто-карбонатных при различных типах землепользования.

Очаговость и мозаичный характер гидролиза желатина в результате 10-суточной экспозиции были отмечены во всех вариантах опыта. Это свидетельствовало о неравномерном распределении ферментных систем в почвенной толще и наличии отдельных микрозон с различной активностью протеаз. Выявлено, что активность протеаз зависела от гидротермических условий и содержания органического углерода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Хазиев Ф.Х.* Системно-экологический анализ ферментативной активности почв. М.: Наука, 1982. 203 с.
2. *Савченко Л.А.* Протеолитическая активность типичного чернозема в условиях Центрально-Черноземного заповедника // Мат-лы научн. конф. "Флора и растительность Центрального Черноземья – 2010". Курск, 2010. С. 155–156.
3. *Milton D.K., Chawla R.K.* Cotton dust contains proteolytic and elastolytic enzymes not inhibited by alpha-1-proteinase inhibitor // *Am. J. Ind. Med.* 1986. № 9. P. 247–260.
4. *Sánchez-Ramos I., Hernández C.A., Castanera P., Ortego F.* Proteolytic activities in body and faecal extracts of the storage mite, *Acarus farris* // *Med. Vet. Entomol.* 2004. № 18. P. 378–386.
5. *Jedynak L., Kowalska J., Harasimowicz J., Golimowski J.* Speciation analysis of arsenic in terrestrial plants from arsenic contaminated area // *Sci. Total Environ.* 2009. № 407. P. 945–952.
6. *Kania K., Byrnes E.A., Beilby J.P., Webb S.A.R., Strong K.J.* Urinary proteases degrade albumin: implications for measurement of albuminuria in stored samples // *Ann. Clin. Biochem.* 2010. № 47. P. 151–157.
7. *Singh S.K., Singh S.K., Tripathi V.R., Khare S.K., Garg S.K.* A novel psychrotrophic, solvent tolerant *Pseudomonas putida* SKG-1 and solvent stability of its psychro-thermoalkalizable protease // *Proc. Biochem.* 2011. № 46. P. 1430–1435.
8. *Heyndrickx M.* The importance of endospore-forming bacteria originating from soil for contamination of industrial food processing // *Appl. Environ. Soil Sci.* 2011. ID561975.
9. *Cruz Ramírez M.G., Rivera-Rios J.M., Téllez-Jurado A., Gálvez A.P.M., Mercado-Flores Y., Arana-Cuenca A.A.* Screening for thermotolerant ligninolytic fungi with laccase, lipase, and protease activity isolated in Mexico // *J. Environ. Manag.* 2012. № 95. P. 256–259.
10. *Hotson A., Mudgett M.G.* Cysteine proteases in phytopathogenic bacteria: identification of plant targets and activation of innate immunity // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2004. № 7. P. 384–390.
11. *Chandu D., Nandi D.* Comparative genomics and functional roles of the ATP-dependent proteases Lon and Clp during cytosolic protein degradation // *Res. Microbiol.* 2004. № 155. P. 710–719.
12. *Langklotz S., Baumann U., Narberhaus F.* Structure and function of the bacterial AAA protease FtsH // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. № 1823. P. 40–48.
13. *Rahman R.N.Z.R.A., Basri M., Salleh A.B.* Thermally stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1; nutritional factors affecting protease production // *Ann. Microbiol.* 2003. № 53. P. 199–210.
14. *Kim K.I., Park S.C., Kang S.H., Cheong G.W., Chung C.H.* Selective degradation of unfolded proteins by the self-compartmentalizing HtrA protease, a periplasmic heat shock protein in *Escherichia coli* // *J. Mol. Biol.* 1999. № 294. P. 1363–1374.
15. *Shankar S., Rao M., Laxman S.* Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria* sp. // *Proc. Biochem.* 2011. № 46. P. 579–585.
16. *Burns R.G.* Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology // *Soil Biol. Biochem.* 1982. № 14. P. 423–427.
17. *Собина А.С., Хачиков Э.А., Шмараева А.Н., Федоренко А.Н., Приходько В.Д., Казеев К.Ш.* Биологическая активность чернозема обыкновенного

- через 5 лет после прекращения агрогенной обработки // *Агрохим. вестн.* 2022. № 1. С. 22–26.
18. Wang Q., Wang S. Response of labile soil organic matter to changes in forest vegetation in subtropical regions // *Appl. Soil Ecol.* 2011. № 47. P. 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.12.004>
 19. Burns R.G., DeForest J.L., Marxsen J., Sinsabaugh R., Stromberger M.E., Wallenstein M.D., Weintraub M.N., Zoppini A. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions // *Soil Biol. Biochem.* 2013. № 58. P. 216–234. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.11.009>
 20. Yongxing C., Bing H., Fang L., Jiang M., Shen G., Yu J., Wang X., Zhu H., Wu Y., Zhang X. Extracellular enzyme stoichiometry reveals the carbon and phosphorus limitations of microbial metabolisms in the rhizosphere and bulk soils in alpine ecosystems // *Plant and Soil.* 2019. № 458. P. 7–20. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04159-x>
 21. Rosinger C., Rousk J., Sandén H. Can enzymatic stoichiometry be used to determine growth-limiting nutrients for microorganisms? – A critical assessment in two subtropical soils // *Soil Biol. Biochem.* 2019. № 128. P. 115–126. DOI: 10.1016/j.soilbio.2018.10.011
 22. Guan H.L., Fan J.W., Lu X. Soil specific enzyme stoichiometry reflects nitrogen limitation of microorganisms under different types of vegetation restoration in the karst areas // *Appl. Soil Ecol.* 2022. № 169. P. 104253. DOI: 10.1016/j.apsoil.2021.104253
 23. Medeiros E., Alcantara N.K., Barros J.A., Silva W., Silva A.O., Moreira K.A. Absolute and specific enzymatic activities of sandy entisol from tropical dry forest, monoculture and intercropping areas // *Soil Till. Res.* 2015. № 145. P. 208–215. DOI: 10.1016/j.still.2014.09.013
 24. Kivlin S.N., Treseder K.K. Soil extracellular enzyme activities correspond with abiotic factors more than fungal community composition // *Biogeochemistry.* 2014. № 117. P. 23–37. <https://doi.org/10.1007/s10533-013-9852-2>
 25. Beheshti A., Raiesi F., Golchin A. Soil properties, C fractions and their dynamics in land use conversion from native forests to croplands in northern Iran // *Agricult. Ecosyst. Environ.* 2012. № 148. P. 121–133. DOI: 10.1016/j.agee.2011.12.001
 26. Raiesi F., Beheshti A. Soil specific enzyme activity shows more clearly soil responses to paddy rice cultivation than absolute enzyme activity in primary forests of northwest Iran // *Appl. Soil Ecol.* 2014. № 75. P. 63–70. DOI: 10.1016/j.apsoil.2013.10.012
 27. Чернышева Е.В., Дуцанова К.С., Хомутова Т.Э., Борисов А.В. Микробная биомасса и ферментативная активность целинных и пахотных почв как показатели физиологического состояния микробных сообществ // *Усп. совр. биол.* 2023. Т. 143. № 4. С. 403–416. DOI: 10.31857/S0042132423040051
 28. Marinari S., Antisari L.V. Effect of lithological substrate on microbial biomass and enzyme activity in brown soil profiles in the northern Apennines (Italy) // *Pedobiologia.* 2010. № 53(5). P. 313–320. DOI: 10.1016/j.pedobi.2010.02.004
 29. Wickings K., Grandy S., Kravchenko A. Going with the flow: Landscape position drives differences in microbial biomass and activity in conventional, low input, and organic agricultural systems in the Midwestern US // *Agricult. Ecosyst. Environ.* 2016. № 218. P. 1–10. DOI: 10.1016/j.agee.2015.11.005
 30. Wang M., Ji L., Shen F., Meng J., Wang J., Shan C., Yang L. Differential responses of soil extracellular enzyme activity and stoichiometric ratios under different slope aspects and slope positions in *Larix olgensis* plantations // *Forests.* 2022. № 13. P. 845. <https://doi.org/10.3390/f13060845>
 31. Макеев О.В., Ногина Н.А., Вторушин В.А. Своеобразие процессов почвообразования в мерзлотной тайге // Происхождение и свойства почв Забайкалья: докл. Бурят. почвоведов к IX Международ. конгр. почвоведов. Улан-Удэ, 1968. С. 102–107.
 32. Почвенно-географическое районирование СССР (в связи с сельскохозяйственным использованием земель) М.: Изд-во АН СССР, 1962. 422 с.
 33. Ногина Н.А. Почвы Забайкалья. М.: Наука, 1964. 312 с.
 34. Классификация и диагностика почв СССР. М.: Колос, 1977. 224 с.
 35. Классификация и диагностика почв России. Смоленск: Ойкумена, 2004. 342 с.
 36. IUSS Working Group WRB. International Union of Soil Sciences (IUSS), Vienna, Austria. 2022. Available online: https://wrb.isric.org/files/WRB_fourth_edition_2022-12-18.pdf (accessed 05 December 2023).
 37. Аринушкина Е.В. Руководство по химическому анализу почв. М.: Изд-во МГУ, 1975. 488 с.

Protease Activity of Mealy-Carbonated Chernozems under Different Types of Land Use

E. O. Chimitdorzhieva[#]

*Institute of General and Experimental Biology SB RAS,
ul. Sakhyanovoy 6, Ulan-Ude 670047, Russia*

[#]*E-mail: erzhen_ch@mail.ru*

The protease activity of powdery carbonate chernozems (Haplic Chernozem Hypocalcic) was studied under various types of land use – arable land, virgin land, fallow. The research area is located in the Tugnui basin, Mukhorshibirsky district, Republic of Buryatia. The activity of the protease enzyme was determined by application using photographic film, which was laid in a layer of 0–20 cm of soil. Observations of protease activity in the first year of the study showed that the maximum activity occurred at the end of July–beginning of August. On arable land, the indicator was 35–39%, on fallow land – 34–36%, on virgin land – 33–39%. In the 2nd year of the study, proteolytic activity increased from the beginning of the growing season. The first peak of activity was observed in the 2nd half of July, which amounted to 44% in arable land, 43% in fallow, and 47% in virgin lands. The second peak of protease activity occurred in the 2nd half of August and amounted to 30% in arable land, 35% in fallow and 37% in virgin lands. In chernozems, proteolytic activity was higher in virgin lands, its intensity decreased from arable land to fallow lands. This indicated an average proteolytic activity in powdery carbonate chernozems under various types of land use. Focality and mosaic character were noted during gelatin hydrolysis as a result of 10-day exposure in all variants. This indicated an uneven distribution of enzyme systems in the soil column and the presence of separate microzones with different protease activity. Statistical processing of the data showed that the activity of proteases depended on hydrothermal conditions.

Keywords: proteolytic activity, chernozems, virgin soil, fallow, arable land, Western Transbaikalia.