

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Сибирский федеральный университет»

На правах рукописи



Колосова Елизавета Маратовна

**ОЦЕНКА ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВ КОМПЛЕКСНЫМ
ФЕРМЕНТАТИВНЫМ БИОТЕСТИРОВАНИЕМ (НА ПРИМЕРЕ ПОЧВ
КРАСНОЯРСКОГО КРАЯ)**

Специальность – 1.5.15 Экология (биологические науки)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Кратасюк Валентина Александровна

Красноярск – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|-----------|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 5 |
| ГЛАВА 1 Экологическое состояние почв и методы его определения | 11 |
| 1.1 Почва как сложная система..... | 11 |
| 1.2 Почва как индикатор загрязнения окружающей среды..... | 15 |
| 1.3 Почвы Красноярского края и их экологическое состояние..... | 23 |
| 1.4 Методы оценки загрязнения почвы..... | 29 |
| 1.5 Методы биотестирования почв, основанные на реакции тест-организмов..... | 35 |
| 1.6 Биотестирование <i>in vitro</i> и ингибиторный анализ | 44 |
| 1.7 Заключение к главе | 50 |
| ГЛАВА 2 Материалы и методы исследования..... | 52 |
| 2.1 Описание почвенных образцов | 52 |
| 2.1.1 Модельные почвогрунты (стандартные модельные почвы Красноярского края) | 53 |
| 2.1.2 ОПХ «Минино» и лесной массив «Погорельский бор», Емельяновский район..... | 55 |
| 2.1.3 ОПХ «Соляное», Рыбинский район | 58 |
| 2.1.4 Объект археологического наследия «Саяно-Пограничное б», горная система Западный Саян, Ермаковский район | 60 |
| 2.1.5 Техногенные урбостратоземы..... | 63 |
| 2.2 Методы определения почвенных характеристик..... | 63 |
| 2.3 Пробоподготовка почвы к ферментативному анализу | 64 |
| 2.4 Биотестирование, основанное на ингибировании активности ферментов | 65 |

| | |
|--|-----------|
| 2.4.1 Растворы и препараты | 65 |
| 2.4.2 Измерение активности ферментативных систем в присутствии водных вытяжек из почв и растворов поллютантов | 67 |
| 2.4.2.1 Измерение активности алкогольдегидрогеназы | 67 |
| 2.4.2.2 Измерение активности НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы | 68 |
| 2.4.2.3 Измерение активности трипсина | 68 |
| 2.4.2.4 Измерение активности бутирилхолинэстеразы | 69 |
| 2.4.2.5 Измерение активности глюкоза-6-фосфат дегидрогеназы | 70 |
| 2.4.2.6 Измерение активности биферментной системы НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза и люцифераза | 70 |
| 2.4.2.7 Измерение активности триферментной системы лактатдегидрогеназа, НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза и люцифераза | 71 |
| 2.4.2.8 Измерение активности триферментной системы алкогольдегидрогеназа, НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза и люцифераза | 72 |
| 2.4.2.9 Измерение активности триферментной системы трипсин, НАДН:ФМН-оксидоредуктаза и люцифераза | 72 |
| 2.5 Статистическая обработка результатов..... | 73 |
| ГЛАВА 3 Чувствительность ферментативных систем различной сложности к модельным поллютантам..... | 74 |
| 3.1 Определение набора ферментативных систем для включения в состав комплексного биотеста для анализа загрязнения городских почв | 74 |
| 3.2 Определение набора ферментативных систем для включения в состав комплексного биотеста для анализа загрязнения сельскохозяйственных почв | 80 |
| 3.3 Выводы по главе | 85 |

| | |
|--|------------|
| ГЛАВА 4 Закономерности влияния водных вытяжек из модельных почвенных смесей и природных почв и грунтов на моно-, би- и триферментные системы в присутствии модельных поллютантов и без них | 87 |
| 4.1 Оценка влияния оптических и кислотных свойств водных вытяжек из почв | 87 |
| 4.2 Оценка влияния водных вытяжек из условно чистых почв на активность моно-, би- и триферментных систем..... | 91 |
| 4.3 Выводы по главе | 96 |
| ГЛАВА 5 Разработка программного продукта, реализующего комплексный ферментативный тест для анализа загрязнения почв. Апробация ферментативного биотеста | 98 |
| 5.1 Разработка программного обеспечения..... | 98 |
| 5.2 Биотестирование почв промышленных городских районов | 102 |
| 5.3 Биотестирование почв сельскохозяйственного назначения | 108 |
| 5.4 Биотестирование лесных почв | 112 |
| 5.5 Выводы по главе | 116 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 118 |
| ВЫВОДЫ | 119 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ | 121 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 123 |
| Приложение А | 149 |
| Приложение Б | 150 |
| Приложение В | 153 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. При разработке современных методов экологического мониторинга почв важными являются проблемы понимания происходящих в почве процессов, идентификации многочисленных загрязняющих химических веществ и оценки их биодоступности (Huang et al., 2011). Причина тому – сложность состава самой почвы как системы (Добровольский, 2008; Апарин, 2012), а также многообразие загрязнителей, механизмы действия которых на почвенные экосистемы мало изучены или неизвестны, что также затрудняет обоснование для них предельно допустимых концентраций. Так как почва является средой жизни множества организмов и функционирования молекулярных структур (ферментов), то для преодоления таких трудностей предлагается совместное использование нескольких тест-организмов – создание «батареи биотестов» (Cairns, 1986; Bierkens et al., 1998; Ko et al., 2012), сочетание химических, биоиндикационных методов и методов биотестирования в «Триадном» подходе (Chapman, 1990; ISO 19204: 2017), а также методология, основанная на многофакторных реакциях тест-организмов в биотестах (Олькова, 2020).

При этом, часто теоретически декларируется возможность применения экспрессных биотест-систем разного уровня организации – от популяционного, организменного, клеточного до субклеточного и молекулярно-биохимического, но в реалиях продолжается практика использования одиночных биотестов. Использование живых организмов в качестве «аналитического датчика» имеет ряд недостатков, наиболее существенные из которых: низкая повторяемость результатов, длительность и трудоемкость проведения анализа (Terekhova, Gladkova, 2013). К тому же, чувствительность тест-объектов к разным поллютантам также различается, что делает необходимым использование «батареи биотестов» (Van Gestel et al., 2001; Ko et al., 2012; Rodriguez-Ruiz et al., 2014).

Ферментативные процессы – универсальные процессы, лежащие в основе всех уровней организации живого. Ферменты, с одной стороны обладая видовой специфичностью в строениях и свойствах, выполняют строго определенную функцию, присущую разным организмам. Для увеличения точности и чувствительности биотестов было предложено использовать вместо интактных организмов их ферментативные реакции (Кратасюк, 1985), с помощью которых осуществляется какая-либо функция живого организма как тест-объекта. На примере биферментной системы НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза (Р+Л) из светящихся бактерий был разработан надежный экспрессный метод, в котором подавление активности ферментов хорошо коррелирует со степенью загрязнения водных образцов тяжелыми металлами, органофосфатами, нефтехимическими веществами (Esimbekova et al., 2014), гербицидами β -трикетона (Thiour-Mauprivez et al., 2019) и другими веществами. При этом, так же как в биотестах на светящихся бактериях, измеряется интенсивность биолюминесценции как функция интактного организма (Esimbekova et al., 2017; Esimbekova and Kratasyuk 2014, 2015). Была предложена схема анализа, дающая интегральный ответ, не зависящий от механизмов действия токсических веществ (Кратасюк, 1985; Kudryasheva, 2006), а также количественного и качественного состава анализируемой смеси (Есимбекова и др., 2021). Биферментная система Р+Л показала свою эффективность для оценки загрязнения природных водных экосистем и промышленных сточных вод (Esimbekova et al., 2013), а также была продемонстрирована правильность идеи о том, что в случае выбора репрезентативных ферментных систем, отражающих ключевые функции метаболических цепей организма, можно создать комплексный ферментативный биотест как «модель живого организма» для оценки качества и загрязнения образцов сложного состава, таких как почва.

Цель исследования: создание научных основ комплексного ферментативного биотеста для оценки загрязнения почвенных систем.

Задачи исследования:

1) Оценить чувствительность моно-, би- и триферментных систем, ответственных за разные метаболические функции организма, к модельным поллютантам, с целью выбора ферментов для комплексного биотеста, моделирующего функции живого организма;

2) Изучить закономерности влияния водных вытяжек из модельных почвенных смесей и природных почв и грунтов на моно-, би- и триферментные системы в присутствии модельных поллютантов и без них;

3) Разработать формализацию и конечный программный продукт, реализующий комплексный ферментативный тест для анализа загрязнения почв;

4) Провести оценку загрязнения сельскохозяйственных и городских почв Красноярского края, подверженных длительному антропогенному влиянию, с помощью ферментативного биотеста.

Положения, выносимые на защиту:

1. Ферментативные системы (моноферментные, катализируемые НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой и бутирилхолинэстеразой, биолюминесцентная биферментная и сопряженная с ней триферментная) обладают чувствительностью к модельным почвенным поллютантам на уровне ПДК, что обеспечивает возможность их включения в состав комплексного ферментативного биотеста.

2. Банк из 68 модельных почвенных грунтов в качестве контрольных образцов для учета влияния типа и разновидности почвы при проведении ферментативного биотестирования.

3. Информационная платформа, позволяющая сравнивать результаты ферментативного биотестирования загрязненных почв с референтными «чистыми» показателями.

4. Комплексный ферментативный биотест применим для оценки загрязнения почв, возникшего в результате промышленной и сельскохозяйственной деятельности.

Научная новизна. Впервые показано, что ключевые ферменты метаболических цепей, отвечающие за функционирование живых тест-объектов,

могут быть использованы для мониторинга сложных по составу почв в нативном состоянии и в условиях их загрязнения. Изучены факторы, влияющие на чувствительность ферментативного метода анализа загрязнения почв (влияние рН, мутности водной вытяжки из почвы, типа и разновидности почв, природы экстрагирующего растворителя и др.). На примере биотестирования почв предложены новые подходы при создании комплексного многоферментного биотеста для экологического мониторинга и анализа образцов сложного состава. В модельном эксперименте в состав комплексного биотеста предложены ферментативные тест-системы для выявления промышленного и сельскохозяйственного загрязнения почв. Впервые составлен уникальный банк стандартных почвенных грунтов (68 образцов) Красноярского края, различающихся гранулометрическим составом и содержанием гумуса, в качестве эталонов сравнения почв. Разработана специализированная программа для ЭВМ, позволяющая визуализировать всю информацию об анализируемых почвенных образцах.

Практическая значимость работы заключается в создании комплексной экспрессной тест-системы для мониторинга сложных по составу объектов, основанная на воздействии водной вытяжки из разных почв в нативном состоянии и в условиях их загрязнения на ключевые ферменты метаболических цепей. Подобраны условия проведения анализа и пробоподготовки, обеспечивающие высокую чувствительность метода для включения их в систему государственного мониторинга.

Личный вклад автора состоял в проведении экспериментов при разработке комплексного биотеста, подборе условий пробоподготовки почвы и их влияния на биолюминесцентные реакции, обработки и обсуждении экспериментальных данных, анализе литературы, разработке программного обеспечения, написания публикаций и тезисов конференций.

Достоверность полученных результатов подтверждается большим массивом данных и тщательной обработкой и анализом полученных результатов. Различия между показателями независимых выборок оценивали по критерию

Стьюдента (t). Значения считали достоверными при уровне значимости не ниже 95% ($p < 0,05$).

Апробация результатов. Основные положения диссертационной работы апробированы на конференциях и других научных мероприятиях российского и международного уровня: X Всероссийской с международным участием научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Молодежь и наука», посвященной 80-летию образования Красноярского края, (Красноярск, 2014); 18-ом Международном симпозиуме по биолюминесценции и хемилюминесценции (Швеция, Уппсала, 2014); Встрече молодых ученых – экологов (Сербия, Петница, 2015); V Инновационном форуме (Железногорск, 2015); XIX Докучаевских молодежных чтениях «Почва – зеркало ландшафта» (Санкт-Петербург, 2016); VII съезде Общества почвоведов им. В.В. Докучаева и Всероссийской с международным участием научной конференции «Почвоведение – продовольственной и экологической безопасности страны» (Белгород, 2016); IV Всероссийской научной конференции с международным участием «Динамика современных экосистем в голоцене» (Пушино, 2016); Международной научной конференции "Биотехнология новых материалов – окружающая среда – качество жизни" (Красноярск, 2016, 2017); Красноярском экономическом форуме (Красноярск, 2017); 28-ой ежегодной встрече Европейского общества SETAC (Италия, Рим, 2018); Международной онлайн-конференции «Устойчивое развитие после COVID-19: экологические проблемы и вызовы» (Индия, 2020); на семинарах Лаборатории биолюминесцентных биотехнологий Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета (Красноярск, 2014-2022).

Работа проведена **при финансовой поддержке** грантов Красноярского краевого фонда науки (*№ КФ-497*); РНФ (*№ 16-14-10115*); РФФИ, Правительство Красноярского края и Красноярский краевой фонд поддержки научно-технической деятельности (*№ 18-47-240005*); Фонда Содействия инновациям (*№10059ГУ/2015*).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 27 работ, в том числе 6 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science, Scopus и рекомендуемых ВАК России для опубликования научных результатов. Получено свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Содержание диссертационной работы соответствует паспорту специальности 1.5.15 Экология (биологические науки). Положения диссертационной работы 1-3 соответствуют п.6 «Научное обоснование принципов и разработка методов прогнозирования, предупреждения и ликвидации последствий загрязнения окружающей среды», положение 4 – п.5 «Исследования в области экологической безопасности, принципы и механизмы системного экологического мониторинга, аналитического контроля в промышленности и сельском хозяйстве» паспорта специальности 1.5.15 Экология (биологические науки).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, трех глав с результатами работы, выводов (заключения) и 3 приложений. Работа изложена на 154 страницах, содержит 20 таблиц и 21 рисунок. Список литературы включает 215 источников, в том числе 95 на иностранных языках.

ГЛАВА 1 Экологическое состояние почв и методы его определения

Обзор литературных источников о современном состоянии исследований по теме работы содержит представления о почве как сложной системе, свойствах и характеристиках почвы, об основных путях попадания и распространения загрязняющих веществ в почву, а также их трансформациях и взаимодействиях с почвенными компонентами и растениями. Приведены основные методы оценки загрязнения почвы (физические, химические, биологические), проанализированы их преимущества и недостатки. Особое внимание уделяется методам биотестирования, и, в первую очередь, ферментативным биотестам, включая биолюминесцентные.

1.1 Почва как сложная система

Почва является важнейшим компонентом экосистемы – средой жизни множества организмов и функционирования молекулярных структур (ферментов). В современном почвоведении принято следующее определение: «Почва – это обладающая плодородием сложная полифункциональная и поликомпонентная открытая многофазная система в поверхностном слое коры выветривания горных пород, являющаяся комплексной функцией горной породы, организмов, климата, рельефа и времени» (Вальков, 2004). Важнейшим в вышесказанном является определение почвы именно как системы.

Система (от греч. – целое, составленное из частей; соединение) – совокупность элементов, находящихся в отношениях и связях друг с другом, которая образует определенную целостность, единство (Ильичёв, 1983). В простых системах свойства целого определены свойствами элементов и не существует каких-либо системных качеств, несводимых к свойствам элементов. В том время сложные развивающиеся системы обладают синергетическими характеристиками (Степин, 2006). В философии науки выделяют некоторые признаки «сложности» системы, такие как иерархическая организация, наличие

множества элементов, наличие обратной связи, устойчивость, эмерджентность и другие (Ladyman et al., 2013). С позиции теории сложных систем можно описать почву как сложную полифункциональную, поликомпонентную, многофазную, динамичную, открытую и устойчивую живую систему, обеспечивающую циклический характер воспроизведения жизни на суше (Добровольский, 2008; Апарин, 2012).

Полифункциональность заключается в выполнении почвой следующих функций (Апарин, 2012):

1. Биогеоэкологические (среда обитания, воспроизводство плодородия, сохранение генофонда, память ландшафта)

2. Ноосферные (производство биомассы, пространственный базис инфраструктуры, регулирование состава воды и воздуха, санитарная, буферная, качество жизни, культурное наследие, память об истории человечества)

3. Биосферные (глобальный цикл С, N, P, S, К и др., соединение геологического и биологического круговорота, аккумуляция солнечной энергии, обеспечение биоразнообразия)

Поликомпонентность почв определяется составляющими её элементами, при этом в составе почвы можно выделить органическую часть, минеральные соединения и микроэлементы, радиоактивные химические элементы, микроорганизмы и животные.

В составе почвы выделяют четыре **фазы**: твердую, жидкую, газообразную и живую (Горбылева, 2014). Твердая фаза состоит из минерального и мертвого органического вещества. Жидкая фаза представлена водой и почвенными растворами. Эта фаза помогает перераспределять вещества в почвенном профиле. Газообразная фаза почв состоит из смеси газообразных компонентов, заполняющих свободное поровое пространство. Почву населяет большое количество организмов из разных классов и царств живой природы, каждый из которых выполняет свою определенную роль. Совокупность всех организмов выделяют в четвертую, живую фазу почвы. Микроорганизмы и животные наравне с высшими растениями играют огромную роль в почвообразовании и плодородии

почв. Изучение почвенных организмов послужило основой для создания биологических методов мониторинга и диагностики состояния почв.

Строение, состав и свойства почв формируются и изменяются под действием внешних факторов постепенно в течение длительного времени. Это обуславливает *динамичность* почвы как системы. Факторами почвообразования являются: атмосфера и климатические условия (температура, солнечная радиация, атмосферные осадки); живые организмы и продукты их жизнедеятельности; мертвое органическое вещество; почвообразующие породы (основа и источник минеральных соединений); рельеф; грунтовые и поверхностные воды.

Кроме того, почва является также и *открытой системой*, т.е. обменивается энергией и веществом с окружением.

Почва является очень *устойчивой* системой. Подверженная загрязнению или физической деградации она способна длительно «сопротивляться» этому воздействию, благодаря сложности почвы как системы и её устойчивости. Но существует граница устойчивости, при которой наступают необратимые нарушения, так называемая «точка невозврата». Считается, что утрата более 30% биоорганического потенциала (сумма живого и гумусированного органического вещества почв) является такой точкой невозврата. Устойчивость существенно отличается для разных типов почв, различающихся в основном по гранулометрическому составу, содержанию органического вещества и уровню кислотности (Яковлев, 2011).

Понятие «почва» объединяет множество сильно отличающихся по составу и свойствам систем. Для описания этих систем и работы с ними, почвы объединяют в группы по важнейшим свойствам, т.е. классифицируют.

Первая классификация почв принадлежит В.В. Докучаеву (1879 г.). Далее эта классификация многократно перерабатывалась советскими и зарубежными исследователями-почвоведом. В настоящее время почвы России описывают исходя из предложенной в начале 2000-х годов субстантивно-генетической классификации. В основу легли следующие принципы (Шишов, 2004):

гинетичности, историчности, воспроизводимости, открытости, изменчивости и стабильности, сочетания объективности и субъективности, иерархичности.

Разнообразие почв определяется в первую очередь её составом. Как было отмечено ранее, почва является поликомпонентной системой, в которой можно выделить несколько элементов. Органическая часть почвы состоит из органических остатков (корешков и наземного опада) и гумуса – массы органических веществ темного цвета, равномерно пропитывающих минеральную часть почвы. Источником минеральных соединений почвы являются горные породы, из которых слагается твердая оболочка земной коры – литосфера.

В ходе выветривания и почвообразования одни микроэлементы накапливаются в почвах, другие, наоборот, вымываются, теряются. Некоторые микроэлементы могут поступать в почву с газами атмосферы, дымами вулканов и с метеоритными осадками. Огромная роль в миграции микроэлементов и их биологической аккумуляции принадлежит высшим и низшим растениям. На подвижность микроэлементов в почвах, а, следовательно, на их миграционную способность, аккумуляцию или вынос и доступность их растениям оказывают влияние реакция среды (рН), окислительно-восстановительные условия, концентрация CO_2 и органическое вещество почвы.

Особым критерием отличия почв можно также назвать и гранулометрический состав (содержание твердых частиц). По гранулометрическому составу почвы делятся на песчаные, супесчаные, суглинистые и глинистые.

При воздействии на почву внешних нагрузок проявляются ее физико-механические свойства, такие как – сжимаемость, связность, твердость, набухаемость, консистенция, липкость, пластичность и др. (Апарин, 2012). Почва способна поглощать и перемещать в своей толще тепловую энергию за счет теплопоглощительной способности, теплоемкости и теплопроводности.

Одна из существенных характеристик почвы – поглощительная способность, то есть поглощение и удерживание поступающих в нее различные твердые, жидкие и газообразные вещества. Уникальным свойством почвы является также

ее буферность. Эти две характеристики обеспечивают стабильность осуществления экологических функций почвы.

1.2 Почва как индикатор загрязнения окружающей среды

В Российской Федерации требования к состоянию почв, согласно Федеральному закону «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» от 30 марта 1999 года N52-ФЗ, определяются гигиеническими нормативами и установленными предельно допустимыми концентрациями химических веществ. Так, согласно одному из нормативных документов (МУ 2.1.7.730-99), под санитарным состоянием почв понимается «совокупность физико-химических и биологических свойств почвы, определяющих качество и степень ее безопасности в эпидемическом и гигиеническом отношениях».

В широком смысле под загрязнением окружающей среды можно понимать внесение не свойственных этой системе живых или неживых компонентов, физических, структурных изменений, нарушающих нормальное функционирование, снижение продуктивности или разрушение (Степановских, 2001). Согласно санитарным нормам и правилам, чистой можно считать почву, отвечающей конкретным требованиям по санитарно-токсикологическим, бактериологическим, паразитологическим, энтомологическим и химическим показателям (СанПиН 2.1.7.1287-03).

При рассмотрении химического загрязнения можно руководствоваться определением: «химическое загрязнение почвы - изменение химического состава почвы, возникшее под прямым или косвенным воздействием фактора землепользования (промышленного, сельскохозяйственного, коммунального), вызывающее снижение ее качества и возможную опасность для здоровья населения» (МУ 2.1.7.730-99).

В почве может находиться большое разнообразие загрязнителей, мешающих нормальному функционированию экосистемы, а также приводящее к негативным последствиям для человека, в частности. Согласно методическим рекомендациям

(МР, 1996) для выявления зон с наибольшей техногенной нагрузкой в первую очередь устанавливается перечень потенциальных источников загрязнения территории. К ним относятся:

- «промышленные и транспортные предприятия, предприятия энергетики, аэропорты, различного рода заправочные станции;
- предприятия добычи, переработки, хранения и транспортировки нефти и нефтепродуктов;
- предприятия минерально-сырьевого комплекса;
- полигоны и места захоронения отходов промышленности (в том числе, атомной энергетики, предприятий военно-промышленного комплекса и вооруженных сил (ракетное топливо, опасные вещества, образующиеся в результате испытаний вооружения, горюче-смазочные материалы и т.п.), коммунально-бытового хозяйства;
- дорожно-транспортная сеть».

Для выявления возможного загрязнения сельскохозяйственных угодий необходимые сведения:

- «о применяемых средствах химизации сельского хозяйства (пестициды, регуляторы роста, мелиоранты и т.п.);
- отходах сельскохозяйственного производства, животноводческих комплексов, птицефабрик;
- складах хранения средств химизации, растворных узлах, взлетно-посадочных полосах сельскохозяйственной авиации».

Одинаковое содержание поллютантов в разных почвах может представлять разную опасность. Так, оценка степени опасности загрязнения почвы химическими веществами проводится по каждому веществу с учетом следующих общих закономерностей (МУ 2.1.7.730-99):

- опасность загрязнения тем выше, чем больше фактическое содержание компонентов загрязнения почвы превышает ПДК, что может быть выражено коэффициентом $K_0 = C / \text{ПДК}$, т.е. опасность загрязнения тем выше, чем больше K_0 превышает единицу;

- опасность загрязнения тем выше, чем выше класс опасности контролируемого вещества, его персистентность, растворимость в воде и подвижность в почве и глубина загрязненного слоя;

- опасность загрязнения тем больше, чем меньше буферная способность почвы, которая зависит от механического состава, содержания органического вещества, кислотности почвы. Чем ниже содержание гумуса, рН почвы и легче механический состав, тем опаснее загрязнение химическими веществами.

Для контроля над степенью загрязнения почв используют методы определения тех веществ, содержание которых в почве регламентировано, определены их ПДК и ОДК. Для некоторых веществ значения ПДК приведены в Приложении А.

Для контроля загрязнения почв также установлена классификация химических веществ антропогенного происхождения по степени опасности. Его оценивают не менее чем по трем показателям из списка: токсичность (LD_{50}), персистентность в почве, ПДК в почве, миграция, персистентность в растениях, влияние на пищевую ценность сельскохозяйственной продукции. В таблице 1.1 приведены вещества в соответствии с классами опасности (где 1 класс – наиболее опасные вещества (ГОСТ 17.4.1.02-83))

Благодаря своим особенностям и свойствам, почва, как сложная система, способна удерживать и трансформировать в себе различные вещества, в том числе и вредоносные, токсические для животных и человека. Известно (Добровольский, 2004), что в почве зарождаются главные потоки масс металлов, вовлекаемые в миграционную систему биосферы. Тяжелые металлы могут мобилизоваться из рассеянного состояния, а также перераспределяться между различными живыми системами. Кроме того, часть веществ выводится из круговорота в твердую фазу почвы, часть вымывается грунтовыми и поверхностными водами и вовлекается в геохимический круговорот веществ. От параметров и состояния почвы зависит её депонирующая способность.

Таблица 1.1 – Распределение веществ по классам опасности
(воспроизведено по ГОСТ 17.4.1.02-83)

| Пестициды | | | |
|----------------------------|--------------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| Наименование пестицида | Токсичность ЛД ₅₀ , мг/кг | Персистентность, мес. | ПДК или ОДК, мг/кг почвы |
| 1-й класс | | | |
| Атразин | От 1400 до 3300 включ. | От 18 до 20 включ. | 0,5 |
| Гексахлорбутадиен | От 51 до 165 включ. | До 24 включ. | 0,5 |
| Гранозан | От 30 до 50 включ. | - | 0,1 |
| ГХЦГ | От 25 до 200 включ. | - | - |
| Гептахлор | От 82 до 500 включ. | До 36 включ. | 0,05 |
| ДНОК | От 40 до 85 включ. | От 1 до 2 включ. | - |
| ДДТ | От 200 до 500 включ. | До 144 включ. | 0,1 |
| Карбатион | От 146 до 450 включ. | - | - |
| Метафос | От 15 до 35 включ. | До 3 включ. | 0,1 |
| ПХК | От 45 до 90 включ. | От 6 до 24 включ. | 0,5 |
| ПХП | От 350 до 525 включ. | От 6 до 24 включ. | 0,5 |
| Севин | От 153 до 850 включ. | До 12 включ. | 0,05 |
| Тордон | От 1500 до 3750 включ. | До 24 включ. | 0,05 |
| Тиодан | От 32 до 100 включ. | - | 0,1 |
| ТМТД | До 400 включ. | - | - |
| 2-й класс | | | |
| Агелон (артазин+прометрин) | - | От 6 до 12 включ. | - |
| 2,4-Д | От 490 до 1500 включ. | От 1 до 1,5 включ. | - |
| Далапон | До 4700 включ. | От 6 до 12 включ. | 0,5 |
| Карбофос | От 400 до 1400 включ. | До 3 включ. | 2,0 |
| Купрозан | До 400 включ. | От 1 до 6 включ. | - |
| Кельтан | От 430 до 900 включ. | От 5 до 12 включ. | 1,0 |
| Нитрафен | От 450 до 700 включ. | - | - |
| Пропанид | От 360 до 2500 включ. | От 6 до 12 включ. | 1,5 |
| Симазин | От 1300 до 4000 включ. | До 12 включ. | 0,2 |
| Трефлан | От 3500 до 5000 включ. | От 6 до 12 включ. | 0,1 |
| Хлорофос | От 225 до 1200 включ. | До 3 включ. | 0,5 |
| Ялан | От 350 до 720 включ. | От 2 до 6 включ. | 0,9 |
| Рогор | От 139,5 до 220,5 включ. | - | 0,3 |
| 3-й класс | | | |
| Банвел Д | От 1200 до 3000 включ. | От 2 до 4 включ. | 0,25 |
| Дактал | До 3000 включ. | От 4 до 6 включ. | 0,1 |
| Дилор | От 2000 до 9000 включ. | - | - |
| Мильбекс | от 1200 до 2000 включ. | - | - |
| Полидим | От 800 до 4000 включ. | До 6 включ. | - |

Продолжение таблицы 1.1

| Наименование пестицида | Токсичность ЛД ₅₀ , мг/кг | Персистентность, мес. | ПДК или ОДК, мг/кг почвы |
|------------------------|--|-----------------------|--------------------------|
| Поликарбацин | - | От 1 до 6 включ. | - |
| Прометрин | От 1800 до 3500 включ. | От 3 до 4 включ. | 0,5 |
| Трихлорацетат натрия | От 3500 до 6000 включ. | От 2 до 6 включ. | 0,2 |
| Тедион | От 500 до 1000 включ. | До 2 включ. | - |
| Цинеб | До 5200 включ. | До 1 включ. | 1,8 |
| Эрадикан | До 4450 включ. | От 1,5 до 3 включ. | - |
| Другие вещества | | | |
| Класс опасности | Химическое вещество | | |
| 1 | Мышьяк, кадмий, ртуть, селен, свинец, цинк, фтор, бинз(а)пирен | | |
| 2 | Бор, кобальт, никель, молибден, медь, сурьма, хром | | |
| 3 | Барий, ванадий, вольфрам, марганец, стронций, ацетофенон | | |

Была проведена работа по изучению поглощения меди, цинка и свинца в почвах в условиях техногенного загрязнения (Карпухин, Ладонин, 2008). Авторы показали, что в поглощение почвами цинка большой вклад вносит органическое вещество, за счет образования внешнесферных комплексов или за счет электростатического взаимодействия. При отсутствии органического вещества почвы становятся доступными связи с глинистыми минералами. Медь также хорошо связывается с органической частью почвы, но в её отсутствии взаимодействует большей частью с железистыми минералами, чем с глинистыми. Свинец обладает большей специфичностью к сорбции, чем цинк и медь. Кроме того, чем более загрязнена почва, тем менее она способна поглощать тяжелые металлы в дальнейшем за счет снижения сорбционной емкости и прочности связи ионов металлов с почвой.

Однако степень влияния органического вещества на биодоступность и растворимость металлов зависит от рН и от содержания растворенного органического вещества (Путилина и др., 2009). Так, рН является фактором, оказывающим наибольшее влияние на распределение смеси металлов в почвах между твердой фазой (сорбентом) и жидкой (почвенный раствор).

Устойчивость пестицидов в почве зависит от её состава и физико-химических свойств, способности пестицидов вступать в реакции, поглощения

почвенными организмами и от климатических условий. Пестициды хорошо сорбируются коллоидами почвы, накапливаются в результате диффузии в кристаллических решетках минералов, проникают в полости частиц гумуса (Волгина и др., 2010).

Особым образом происходит взаимодействие почвы и нефти. Нефть является гетерогенной системой, её фракции различаются по плотности и вязкости, поэтому вниз по почвенному профилю происходит расслоение нефтяного потока. При этом происходят изменения в агрофизических свойствах почв: уплотняется сложение почв, снижается коэффициент структурности (Шорина и др., 2010).

Сохранению устойчивости почв при загрязнении металлами могут способствовать: высокое содержание гумуса и емкость поглощения, глинистый гранулометрический состав, нейтральный pH. Устойчивость к нефтепродуктам обусловлена наличием микроорганизмов, способных окислять нефть, ускоряя её разложение (Колесников и др., 2010).

Большая роль в сорбционной способности почвы отводится её органическому веществу, а именно гуминовым и фульвовым кислотам. Ионы металлов могут образовывать комплексы с фульвокислотами, и в таком виде переходить в раствор. При взаимодействии с гуминовыми кислотами, которые более активно участвуют в образовании комплексов, тяжелые металлы выводятся из раствора в твердую фазу почвы. На рисунке 1.1 представлена возможная схема распределения ионов тяжелых металлов в почве.

Структурная сложность, присущая гумусовым веществам, создает возможности для широкого спектра химических взаимодействий. Они могут окисляться сильными окислителями; действовать как восстановители; принимать участие в протолитических, ионообменных и комплексообразующих реакциях; участвовать в донорно-акцепторных взаимодействиях; вовлекаться в образование водородной связи; и принимать участие во взаимодействиях Ван-дер-Ваальса. Гуминовые вещества взаимодействуют со всеми классами экотоксикантов, включая: тяжелые металлы, нефть и хлорированные углеводороды, пестициды,

нитроароматические взрывчатые вещества, азокрасители, актиниды и т.д. (Perminova et al., 2005).

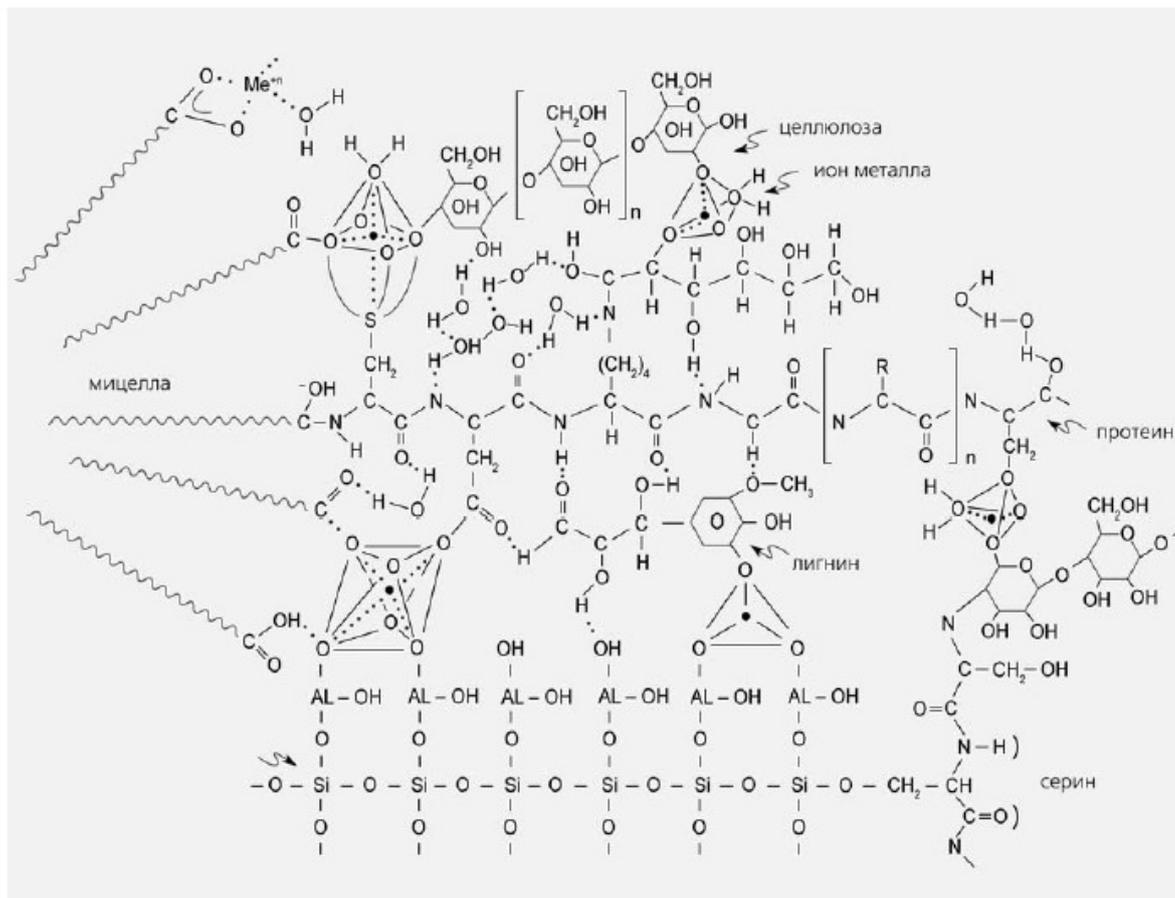


Рисунок 1.1 – Один из вариантов нахождения ионов тяжелых металлов (выделены черными кружками) в комплексе гуминовой кислоты с высокодисперсным глинистым минералом (Добровольский, 2004)

Сложные взаимодействия между гумусовыми кислотами, экотоксикантами и живыми организмами могут быть классифицированы следующим образом (там же, с. 9):

- связывающие взаимодействия, которые влияют на химическое видообразование и биодоступность экотоксикантов;
- сорбционные взаимодействия, влияющие на физическое видообразование или межфазное распределение экотоксикантов;

- абиотически-биотические окислительно-восстановительные взаимодействия, которые влияют на метаболические пути в сочетании с экотоксикантами;

- прямое и косвенное взаимодействие с различными физиологическими функциями живых организмов.

Свойство гуминовых кислот активно образовывать комплексы с металлами легло в основу методов ремедиации загрязнения.

Экзогенные химические вещества, попадающие в почву, могут перерабатываться организмами и вовлекаться в метаболические пути. Существует порядка 100 видов микроорганизмов (бактерии, грибы и дрожжи), способных утилизировать углеводороды нефти, как в воде, так и в почве (Atlas, 1981). Для оптимальной работы таких микроорганизмов нужны мезофильные температурные условия, влажность 60% от полной влагоемкости почвы, близкие к нейтральным значения рН, доступность кислорода, так как процессы разрушения нефти преимущественно окислительные (Водянова и др., 2010).

В особый тип взаимодействия можно выделить систему биообъект-наночастица. В зависимости от наноматериала, могут наблюдаться многие механизмы воздействия: нарушение конформации белков, производство активных форм кислорода и окислительный стресс, повреждение клеточных мембран, высвобождение токсичных катионов, повреждение ДНК и др. Основные эффекты обусловлены свойствами материала, модификацией поверхностных свойств и динамическими взаимодействиями с биологическими молекулами и клеточными компартментами (Nel et al., 2009).

Наиболее сложные и комплексные взаимодействия между системой химические вещества–почва–растения. Растения могут потреблять излишнее количество токсикантов, удаляя их из почвы, но накапливая в себе, что может привести к отравлению консументов 1 порядка. Гипераккумуляция встречается у 0,2% всех покрытосеменных растений (Krämer, 2010).

Гипераккумулялирующие металлы растения обладают исключительными способностями извлекать металлы из почвы и изолировать в высоких

концентрациях в побегах. При этом видимых симптомов токсичности не наблюдается. Самым большим описанным примером гипераккумуляции является растение *Sebertia acuminata*, млечный сок которого может содержать до 26% (w/w) никеля. Микроэлементами, которые растения могут накапливать в излишнем количестве, являются Zn, Ni, Mn, Cu, Co, Cd, металлоиды (As) и неметаллы (Se) (Verbruggen et al., 2009). Наиболее изученным является процесс гипернакопления растениями цинка (Whiting et al., 2001). Существует гипотеза, согласно которой гены, которые, как считается, участвуют в гипераккумуляции и гипертолерантности, не являются видоспецифичными или новыми, а экспрессируются и регулируются по-разному по сравнению с негипераккумуляторными видами. Сравнительные транскриптомные исследования гипераккумуляторов и родственных неаккумулялирующих нетолерантных видов выявили большое количество генов, которые конститутивно (при отсутствии избытка ионов металлов) высоко экспрессируются (Verbruggen et al., 2009). Повышенное поглощение корнями цинка, по-видимому, обусловлено избыточной экспрессией генов семейства ZIP (*zinc-regulated transporter, iron-regulated transporter protein* (Krämer et al., 2007)).

1.3 Почвы Красноярского края и их экологическое состояние

Красноярский край расположен в северо-восточной части Евразии, занимает площадь 2 339 700 км² и протяжен с севера на юг на 3300 км. В пределах края сформированы три климатических пояса и представлены разнообразные природные зоны – арктическая пустыня и тундра, лесотундра, тайга, лесостепь и степь. Основная часть территории края находится между 52 и 76° с. ш., при этом 90,6 % территории края (2 120,1 тыс. км²) относят к районам Крайнего Севера и приравненным к ним местностям (Ананьева, 2016). Наибольшую часть земельного фонда края занимают леса (62,1%) (Безруких, Елин, 2012).

В связи с особенностью пространственной протяженности территории Красноярского края, выделяются зоны, в которых преобладающие типы

хозяйственной деятельности различны. Типы хозяйственной деятельности условно можно разделить на две группы: промышленное и аграрное природопользование. Очевидно, что источники загрязнений и, соответственно, основные загрязняющие химические вещества, будут различаться между группами и поэтому требуют отдельного рассмотрения и изучения.

Под земли сельскохозяйственного назначения отводится 16,8% (О состоянии земель..., 2019). При этом освоенность земель составляет 2,3% и характеризуется как низкая. Однако доля пахотных земель в структуре земельного потенциала составляет 60%, что сравнимо с Алтайским краем и Омской областью (Лысанова, Сороковой, 2015). По сравнению с 2010 годом площадь сельскохозяйственных угодий сократилась незначительно (на 0,26%) (О состоянии земель..., 2019).

В качестве географических особенностей сельскохозяйственного использования земель Красноярского края можно указать широкую вариативность, как среди используемых почв, так и среди основных направлений специализации сельского хозяйства (Безруких, Елин, 2012). В качестве наиболее благоприятных зон для молочного, мясного, зернового и овощного хозяйства выделяют южную тайгу, подтайгу, лесостепи и степи с дерново-глеевыми, дерново-подзолистыми, серыми лесными и оподзоленными и выщелоченными черноземными почвами соответственно. В зонах северной тайги и тундры с менее плодородными аллювиальными и мерзлотно-таежными почвами успешно развивается оленеводство и звероводство.

На земли промышленности и иного специального назначения по состоянию на 2019 год приходится 0,11 % от земельного фонда Красноярского края, или 268,2 тыс. га (О состоянии земель..., 2019).

На территории края расположены крупные промышленные предприятия. Предприятия цветной металлургии могут быть источниками загрязнения почв кадмием, свинцом, никелем, цинком, ртутью, медью, железом, молибденом, оловом, банз(а)пиреном. Выбросы предприятий черной металлургии могут содержать никель, марганец, хром, кадмий, кобальт, медь, молибден, олово,

свинец, цинк. Высокие концентрации бенз(а)пирена и других полициклических ароматических углеводородов содержатся в выбросах ТЭЦ. Максимальное содержание металлов в почвах наблюдается на расстояниях 1-5 км от источников загрязнения. Глубина проникновения тяжелых металлов в почву обычно не превышает 20 см, при сильном могут проникать на глубину до 160 см (Анализ загрязненной почвы..., 2011). Еще одним источником загрязнения городских почв являются выхлопные газы транспортных средств. В своем составе они содержат около 300 веществ, большинство из которых токсичны (формальдегид, бенз(а)пирен, оксиды азота и углерода и серы, углеводороды и сажа) (Крушель, 2013).

При изучении проблемы загрязнения почв в целом, необходимо учитывать фоновое (природное, естественное) содержание микроэлементов в почвах. Так, на основании исследования, проводимого с 1994 по 2004 год в лесостепной, степной и подтаежной зонах Красноярского края, было определено фоновое содержание микроэлементов (Волошин, 2012). Проведенное автором сравнение полученных значений с аналогичными для почв соседних регионов представлено в таблице 1.2. Согласно представленным результатам, почвы Красноярского края хотя и обеднены микроэлементами в сравнении с аналогами из других регионов страны, но содержание большинства представленных микроэлементов соотносится с кларком почвы.

Согласно официальному докладу Управления Федеральной службы государственной регистрации, кадастра и картографии по Красноярскому краю нарушенные земли занимают территорию в 17,3 тыс. га. Площадь земель, занятых полигонами отходов и свалок в крае составила 6,2 тыс. га. В целом, к категории прочих земель – непригодных и малопригодных для хозяйственных нужд (в том числе из-за деградации и загрязнения, а также овраги, галечники и др.) относят 74860.4 тыс. га на различных категориях земель, что составляет 31,6% от общей площади края (О состоянии земель..., 2019).

Таблица 1.2 – Фоновое валовое содержание микроэлементов в пахотных почвах Красноярского края, мг/кг. Воспроизведено из (Волошин, 2012)

| Элемент | Кларк почвы | В бывшем СССР | Центральное Черноземье | Западная Сибирь | Алтайский край | Забайкалье | Тува | Хакасия | Красноярский край |
|----------|-------------|---------------|------------------------|-----------------|----------------|------------|-------|---------|-------------------|
| Медь | 20 | 19,5 | 24,0 | 25,0 | 24,9 | 23,0 | 24,0 | 15,6 | 18,2 |
| Кобальт | 8 | 11,1 | 12,0 | 10,0 | 15,0 | – | 10,7 | 6,3 | 9,3 |
| Марганец | 850 | – | 700,0 | 666,7 | 750,0 | 619,0 | 728,0 | – | 463,0 |
| Цинк | 50 | 51,9 | 66,0 | 64,0 | 74,3 | 73,0 | 51,7 | 40,7 | 52,3 |
| Ртуть | 0,01 | – | 0,15 | 0,2–0,3 | 0,021 | – | 0,12 | 0,03 | 0,022 |
| Свинец | 20 | 11,6 | 19,4* | 14,0 | 30,0 | – | – | 8,4 | 11,4 |
| Кадмий | 0,5 | 0,56 | 0,25* | 0,15–0,21** | 0,375 | – | – | 0,10 | 0,11 |
| Никель | 40 | 46,5 | 38,0 | 35,0 | 37,3 | 27,0 | – | 19,2 | 25,6 |
| Хром | 200 | 253 | 87,0 | 56,0 | 70,0 | 52,0 | – | – | 25,3 |
| Мышьяк | 5 | – | 2,6 | 8,23,9 | – | – | – | – | 5,1 |

* среднее для черноземов; ** среднее для основных типов почв; отсутствие данных.

В таблице 1.3 представлены сведения об исследованных почвах, относящихся к различным категориям и уровне их загрязнения. Из таблицы видно, что проблема загрязнения почв остра и затрагивает всю территорию Красноярского края, при этом наблюдается специфика распространения того или иного химического вещества в зависимости от источников. Самыми распространенными загрязнителями являются медь, свинец и цинк.

Таблица 1.3 – Химическое загрязнение почв Красноярского края

| Исследуемая территория | Чем загрязнено (уровень загрязнения) | Ссылка |
|---|---|----------------------------|
| г. Красноярск и пригородные зоны | | |
| Территория бывшей воинской части (п. Кедровый, Емельяновский район) | Компоненты ракетного топлива (0,001 мг/л, категория «Очень опасно») | Баранов и др., 2017 |
| П. Кедровый (Емельяновский район) | Нефтепродукты (мазут) (6-22 мг/кг) | Фомина, Чижевская, 2013 |
| Зоны влияния Красмаш, КрасТЭЦ-1, РУСАЛ | Превышение ПДК по Cr, Pb, Cu, Zn | Горлушкина, Бадмаева, 2018 |
| Зона влияния КрАЗа | Содержание водорастворимого фтора 1,5-100 мг/кг | Косицына, 2009 |

| Исследуемая территория | Чем загрязнено (уровень загрязнения) | Ссылка |
|---|--|--|
| Зона влияния КраЗ, КрасТЭЦ-1 | Превышение ПДК по водорастворимому фтору, As и Pb в 1,6-44,4 раз | Kolosova et al., 2021 |
| Рекреационные зоны левого берега г. Красноярска | 1 категория загрязнения (допустимая) по суммарному показателю Z_c | Жирнова, Холдаенко, 2017 |
| Рекреационные и промышленные зоны г. Красноярска | Превышение ПДК по Pb, Zn, Co, Cu в зоне влияния ТЭЦ-1 и ТЭЦ-2 | Коротченко, Мучкина, 2016 |
| Торгашинский хребет (Свердловский район, г. Красноярск) | Полиметаллическое загрязнение (Pb, Cu, Ni, Zn, Mn, Co, Cr) до 20 ПДК | Байкалова, Байкалов, 2017 |
| Сельскохозяйственные земли | | |
| Сельскохозяйственные почвы в зоне влияния КраЗ, КрасТЭЦ-3, СаАЗ | 3,4-бенз(а)пирен (1,5-50 ПДК) | Бутенко, Полонская, 2012 |
| Землепользование ООО «Агрофермер» Емельяновского района Красноярского края | Содержание валовых форм тяжелых металлов на уровне фоновых значений | Демиденко, 2017 |
| Сельскохозяйственные почвы СПК «Зыковский» и СПК «Березовский» (Березовский район), ЗАО «Шуваевское» и ОАО «Солонцы» (Емельяновский район), ЗАО «Племзавод Таежный» и ЗАО «Миндерлинское» (Сухобузимский район) | Концентрация основных тяжелых металлов в почве в пределах кларковых значений Превышение ПДК по Zn, Co, Cr, Ni | Зазнобина. 2018 Зазнобина и др., 2019 |
| Сельскохозяйственные земли (Минусинский район) | Пестициды ДДТ, ДДД и ДДЕ (производные дифенилметана) ниже ПДК | Морозова и др., 2017 |
| Сельскохозяйственные земли подтаежной и лесостепных зон Красноярского края | Cd (0,001-0,80 мг/кг, ОДК 2 мг/кг) Mn (45,4-3336,0 мг/кг, ПДК 1500 мг/кг) Pb (1,1-68,5 мг/кг, ПДК 32 мг/кг) Hg (0,001-0,360 мг/кг, ПДК 2,1 мг/кг) | Побилат, Волошин, 2017 Побилат, Волошин, 2017 Побилат, Волошин, 2017 Побилат, Волошин, 2019 |
| Учхоз «Миндерлинское» (Сухобузимский район) | Концентрация основных тяжелых металлов не превышает ПДК | Волошин и др., 2020 |
| АО «Белоярское» (Ачинский район) | Превышение ПДК по Cu в 3 раза | Цугленок и др., 2003 |

| Исследуемая территория | Чем загрязнено (уровень загрязнения) | Ссылка |
|---|--|---|
| Зона влияния промышленных предприятий (кроме г. Красноярск и г. Норильск) | | |
| Абаканская ТЭЦ, Минусинская ТЭЦ | Pb (7,12 мкг/кг), Zn (13,33 мг/кг) Pb (2,78 мг/кг), Zn (8,17 мг/кг) | Захарова и др., 2018 |
| Зона влияния «Ачинский нефтеперерабатывающий завод» | Суммарный показатель загрязнения $Z_c=31,6$ (средний) | Шахова, 2018 |
| Зона влияния «Ачинский глиноземный комбинат» | Превышение ПДК по Cu в 3 раза, по Zn – в 4 раза | Цугленок и др., 2003 |
| Территория Крайнего Севера | | |
| Зона влияния Норильских горно-металлургических предприятий (г. Норильск) | Полиметаллическое загрязнение (Cu, Ni, Zn, Fe, S, Cr) 3,5 - 287 ПДК | Vodyanitskii et al., 2011 |
| Зоны аварийных разливов нефтепродуктов (Ванкорское, Куюмбинское, Юрубченское месторождения) | Нефтепродукты (1,0-20204 мг/кг) | Ваганов и др., 2012 |
| Торфяные залежи в зонах влияния Норильского промышленного района | Превышение фоновых значений Cu, Ni, Co, Pb, S на один и два порядка | Карпенко, 2014 Ефремова, Ефремов, 2014 |
| Зона влияния Надеждинского металлургического завода | Превышение ПДК по Cu, Ni, Co, S на 3 порядка | Шапченкова и др., 2017 |

В структуру рационального природопользования входит четыре основных принципа: изучение, охрана, освоение и преобразование (Потапов, 2004). В соответствии с этими принципами и с целью охраны природной среды, необходимо проводить мероприятия, направленные не только на рациональное использование природных ресурсов, но и на восстановление и рекультивацию уже нарушенных и загрязненных земель. Тем самым прирост площади, например, сельскохозяйственных земель может произойти не столько за счет вовлечения ранее нетронутых, целинных, сколько за счет возобновления агроэкологического состояния нарушенных и деградированных почв.

На примере нарушенного карьерными разработками земельного массива (20 га в пределах Канско-Тасеевской впадины, приуроченных к древней долине р. Кан, Канский район Красноярского края) изучалось агроэкологическое состояние

почв и возможность и способы восстановления земель с последующим их вовлечением в сельское хозяйство (Чупрова, Белоусов, 2019). Основным следствием техногенного влияния при добыче песчано-гравийной смеси открытым способом являлось изменение гранулометрического состава со среднесуглинистого до песчаного и снижение содержания гумуса. В результате чего почвенный экологический индекс существенно снизился с 38 до 30. Для восстановления участка на основе проведения анализа агрохимических характеристик почвы авторы рекомендуют увеличение поступления в почвенный субстрат органического материала, источником которого может служить смесь бобово-злаковых многолетних культур.

Особое внимание представляют также земли, нарушенные в результате добычи минеральных ресурсов и полезных ископаемых (Виноградова, 2021; Сариев и др., 2021). Методы рекультивации таких земель включают как биологические, так и технические процедуры (Космаков и др., 2021).

1.4 Методы оценки загрязнения почвы

Методики анализа химического загрязнения почв можно разделить на три типа: физические, химические и биологические. Исследователи, ученые, экологи используют все методы, а также их комбинации для более детального анализа.

К **физическим методам** анализа загрязнения почвы относятся различные спектрометрические методы: атомно-эмиссионные, атомно-абсорбционные. В зарубежной литературе встречаются методы с использованием слабо-полевой ядерно-магнитной резонансной релаксометрии, рентгеновской компьютерной томографии (Nakashima, 2011). Распространены методы инструментального нейтронно-активационного анализа (INNA), масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой (ICP-MS) (Gaudino, 2007), хроматография, атомно-флуоресцентная спектрометрия (Yuan, 2007).

Физические методы исследования позволяют идентифицировать элементы, а также их количество. Большой интерес представляют микроэлементы, так как

они управляют процессами обмена веществ, входят в состав витаминов, клеточных стенок. Присутствие некоторых микроэлементов сказывается на здоровье негативно (алюминий, мышьяк, кадмий, свинец, ртуть, бериллий). Для контроля качества питания и питьевой воды, влияющих на здоровье человека, необходима возможность определения концентрации как можно более широкого спектра микроэлементов (Горбунов, 2012), которые в свою очередь сорбируются из почвы. Такими возможностями как раз и обладают ядерно-физические аналитические методы.

Химический анализ почвы позволяет получить сведения о ее химическом составе и свойствах. Он проводится в два этапа: перевод определяемого компонента в форму, доступную для количественного измерения существующими методами аналитической химии, и собственно измерение. Химические методы отличаются необходимостью трудоемкой подготовкой образца и использованием большого числа процедур и реактивов. К важнейшим аналитическим процедурам относятся: взвешивание, выпаривание растворов, осаждение, фильтрование и промывание осадков, прокаливание осадков, титрование, фотометрия. Существенным недостатком химического метода является необходимость знания соединения или элемента исследования, так как пробоподготовка осуществляется по-разному. Химический анализ можно разделить на элементный (валовой) и вещественный. Валовой анализ позволяет получить сведения об общем содержании в почве химических элементов, независимо от формы их присутствия. Его можно провести как для органической, так и для минеральной части почвы. В органической части главным образом определяют содержание общего углерода и азота. Минеральную часть определенным образом подготавливают, а элементы определяются в составе оксидов. Для оценки доли элементов, находящихся на поверхности раздела жидкая фаза, твердая фаза и участвующих в реакциях межфазного обмена изучают поглотительную способность почвы. Можно определить общее количество и состав способных к обмену ионов. Для анализа присутствующих в

почве солей используются природные почвенные растворы и искусственно приготовленные водные вытяжки (Химический анализ почв, 1995).

Химический анализ может быть совмещен с физическими методами для сравнения результатов, подбора оптимальной методики, более детального анализа или в качестве дополнительного инструмента для пробоподготовки (Корнилова, 2011; Дабах, 2013).

Контроль состояния почвы при помощи живых организмов относят к **биологическому мониторингу почв**. Определение токсичности (загрязнения) среды непосредственно при действии ее на живой организм осуществляется методами **биоиндикации** и **биотестирования**. В первом случае у свободно живущих организмов исследуются видимые или незаметные повреждения, или отклонения от нормы, являющиеся признаками стрессового воздействия. Например, исчезновение некоторых видов микроорганизмов (*Vorticella microstoma*, *Litonotus lamella*, *Colpidium colpoda*, *Notommata ansata*, *Cathypna luna*, *Monostula cornuta*, *Epystilis plicatilis*, *Vorticella campanula*) является индикатором на содержание в среде хрома, цинка и меди в концентрациях, превышающих ПДК (Пат. RU2258676). Во втором случае пытаются обнаружить те же самые воздействия на тест-организмах, культивируемых в искусственно поддерживаемых стандартных условиях, в лабораторных экспериментах (Пат. РФ2202619, РФ2039825 и РФ2232805, Егорова и Белолипецкая, 2000). Использование биологических методов позволяет исследователям получать интегральную характеристику качества среды и определять токсичность среды для живых организмов.

Использование живых организмов в качестве аналитического датчика обладает большим преимуществом перед физическими и химическими методами, если рассматривать почву как сложную систему. Согласно теории систем «системное рассмотрение объекта предполагает, прежде всего, выявление целостности исследуемой системы, ее взаимосвязей с окружающей средой, анализ в рамках целостной системы свойств составляющих ее элементов и их взаимосвязей между собой. Системный подход, развиваемый в биологии,

рассматривает объекты не просто как системы, а как самоорганизующиеся системы, носящие открытый характер» (Устюгов, 2013).

Одним из главных методов в науке, с помощью которого можно исследовать сложные системы является метод моделирования (Биофизика, 1999). Моделирование можно определить как замещение некоторого сложного объекта изучения другим, более простым, с целью получения какого-либо нового знания о его строении, свойствах и функциях. Такой более простой объект называется моделью. Модель – это «некое упрощение объекта исследования и в смысле его структуры, и по сложности внутренних и внешних связей, но обязательно отражающее те основные свойства, которые интересуют исследователя (Биофизика, 1999)».

Выделяют основные этапы моделирования (Биофизика, 1999):

- 1) первичный сбор информации о характеристиках реального объекта;
- 2) постановка цели и задач исследования;
- 3) обоснование основных допущений, выявление существенных и несущественных для исследования характеристик;
- 4) создание модели, её исследование;
- 5) проверка адекватности модели реальному объекту, указание границ применимости модели.

В широком смысле для построения моделей существует два способа: анализ и синтез (Сергеева, 2013). Анализ необходим для представления знаний о внутренней организации системы, а синтез позволяет описывать внешние связи этой системы с окружающей средой. Процедура анализа состоит из трех последовательных действий: разделить сложную систему на более простые части, попытаться объяснить каждый фрагмент, объединить объяснение частей в объяснение всей сложной системы. В результате должна получиться модель состава системы (элементы) и модель структуры системы (связи). Процедура синтеза также состоит из трех действий: определение метасистемы, в которую исследуемая система входит как часть; анализ состава и структуры метасистемы; объяснение связей исследуемой системы с другими частями метасистемы. В

результате появляется модель черного ящика для познавательной системы, которая широко применяется для изучения биологических систем (Приходько и др., 2021).

Выбор метода и средств моделирования, а также степень детализации и адекватность модели зависит от постановки конкретной цели и задач исследования. Типы моделей по (Советов, Яковлев, 2001; Сергеева, 2013; Биофизика, 1999) приведены в таблице 1.4

Таблица 1.4 – Типы моделей

| Типы моделей | | Характеристика моделей |
|---------------------------------|-------------------|---|
| По типу цели субъекта | Познавательные | Обеспечивают процессы получения и накопления сведений о познавательном явлении |
| | Прагматические | Являются средством управления и организации практических действий |
| По степени динамичности системы | Статические | Модель конкретного состояния объекта |
| | Динамические | Отображение процесса изменения состояний |
| По степени определенности | Вероятностные | Описывают поведение системы в условиях воздействия случайных факторов |
| | Детерминированные | Описывают поведение систем с позиций полной определенности состояний системы во времени |
| По типу материала построения | Абстрактные | Идеальные структуры, построенные средствами мышления, сознания и языковыми средствами |
| | Материальные | Реальные объекты, построенные по прямому, косвенному и условному подобию |
| По отношению к области науки | Физические | Имеет физическую природу, физическое устройство, заменяющее биологический объект |
| | Биологические | Биологические объекты, удобные для экспериментальных исследований |
| | Математические | Описание процессов в реальном объекте с помощью математических уравнений |

Для разных наук характерны разные типы моделей. В биофизике сложных систем наиболее часто используются динамические математические модели, например, модель численности роста популяции Мальтуса и Ферхюльста, модель «хищник-жертва» Вольтерра. Для изучения внутренних органов и процессов, протекающих внутри организма, используются физические модели.

В почвоведении с помощью моделей изучают различные почвенные процессы. Математическое моделирование почвенных процессов делят на три группы: эмпирические, полуэмпирические и теоретические модели (Микайылов, 2014). Эмпирические модели строятся на основе результатов наблюдения за объектом и представляют собой аналитическое выражение, связывающее изучаемое свойство почвы и определяющие его факторы окружающей среды. Полуэмпирические модели строятся на основе формул фундаментальных законов. Теоретические модели направлены на выявление фундаментальных механизмов, происходящих в почве. Разрабатывались модели влаго- и солепереноса (Шейн, 2015), миграции пестицидов по профилю почвы (Шейн и др., 2009), сорбции и миграции веществ (Фрид, 2012), для оценки эмиссии CO₂ и динамики органического вещества (Припутина и др., 2020) и другие.

В биологии и экологии используют как математические, так и биологические модели. Например, нематода *Caenorhabditis elegans*, благодаря малым размерам, прозрачности и относительной простоте строения, является удобным модельным организмом, над которым проводят разнообразные лабораторные исследования: отработка процедуры секвенирования генома и других генетических эксперименты, изучение процессов старения и биохимических путей новых лекарств, оценка токсического действия новых материалов и загрязненных природных сред (Tejeda-Benitez, Olivero-Verbel, 2016).

Современная естественнонаучная картина мира предполагает междисциплинарные подходы в комплексных исследованиях и изучении сложных объектов. Поэтому часто методы, и модели, из одной науки используются в другой. Например, для понимания механизмов почвенных процессов трансформации веществ, использование одних лишь только методов аналитической химии и математических моделей может быть не достаточным. Для понимания процессов, при которых токсиканты в почвах становятся доступными для организма и как они влияют на него при контакте с поверхностью или попадая внутрь организма, как раз и используют биологические модели – тест-организмы.

В целом, привлечение методов биотестирования помогает изучать биофизико-химические пути распределения и биодоступности новых веществ и материалов (Manzo et al., 2011). Привлекательность биологического тестирования для исследователей заключается в том, что оно позволяет оценить антропогенное воздействие на среду обитания в показателях, имеющих биологический смысл (Есимбекова, 2000). Кроме того, поскольку токсичные химические вещества оказывают кумулятивное и синергетическое влияние на рост организмов, биотесты могут обеспечить более четкую и адекватную меру токсичности смесей токсинов по сравнению с традиционными методами (Hassan et al., 2016).

1.5 Методы биотестирования почв, основанные на реакции тест-организмов

Методы биотестирования как аналитический инструмент возникли в начале XX века и продолжают активно развиваться. Необходимость создания новых и принципиально отличных от химического анализа методов была изначально обусловлена разработкой новых лекарств. В работе С. I. Bliss сформулированы основные принципы биотестирования того времени (Bliss, 1957), в которых постулировалось в том числе необходимость введения стандартного раствора с похожим биологическим эффектом, а также что анализ должен быть надежным и эффективным.

После чего исследователи стали задумывать не только о необходимости проверки воздействия лекарств на организм, но и о способах утилизации и связанных с этими путями миграции препаратов в среде (вода, почва). Также к объектам биотестирования стали добавляться пестициды различного действия. А в связи с накоплением знаний о тест-системах и границах их применимости, стали разрабатываться и новые принципы биотестирования (Kohn, 1980):

1) для наилучшего проведения биотестирования необходим мультидисциплинарный подход, заключающийся в совместной работе как минимум одного химика и одного биолога;

2) независимо от класса токсиканта, биолог должен использовать для биотестирования все филы (типы) организмов, что обеспечивает большую чувствительности и информативность тестирования;

3) чтобы уменьшить воздействие, внешнее и внутреннее (вариабельность среды и организма), неизвестные вещества и стандарты должны быть проверены с использованием практически идентичных процедур и одновременно, насколько это возможно;

4) интерпретация результатов анализа должна проводиться и химиком, и биологом. Необходимо также проводить верификацию методов;

5) необходимо тщательно планировать эксперимент в зависимости от поставленной специальной задачи;

6) для увеличения значимости и упрощения процедуры лучше использовать общепринятые виды организмов, не заменяя их на наиболее распространенные в данной местности.

В настоящее время методологию биотестирования применяют ко всем природным средам, новым материалам и веществам.

Процедуру биотестирования можно рассматривать с разных точек зрения и относить к методологии разных наук. Был разработан подход к биотестированию с позиции аналитической химии, названный инструментальным химико-биологическим методом (Туманов, 1996). Такой подход заключается в совместном использовании аналитической химии и объектов биотестирования. При этом анализируемую пробу разделяют на две части, одна из которых служит контролем. Вторая часть подвергается химическому воздействию, посредством которого изменяется (увеличивается, уменьшается, полностью нивелируется) биологическое действие поллютанта на биотест.

При организации системы экологического контроля и мониторинга почв с позиции почвоведения набор анализируемых показателей определяется выполняемой почвой функции (Терехова, 2011). Так, для почв агроценозов важны в первую очередь показатели плодородия. Для почв поселений определяют санитарные качества (наличие возбудителей каких-либо кишечных инфекций,

паразитарных заболеваний, патогенных бактерий, энтеровирусов). Природные почвы оцениваются с позиции обеспечения биоразнообразия. И для проверки каждой из этих функций почв может применяться процедура биологического анализа.

В настоящее время существует огромное разнообразие биотестов, включающих тест-организмы различных трофических и организационных уровней. В обзоре (Hassan et al., 2016) были выделены наиболее часто используемые биотесты для анализа загрязнения воды и сточных вод (таблица 1.5). Эти же тест-организмы могут применяться и к выявлению загрязнения почв при элюатном биотестировании (Vaajasaari et al., 2002).

Таблица 1.5 – Методы биотестирования

| | Организм | Тест-сигнал |
|----------------|---|--|
| Рыбы | Эмбрионы рыбок Данио | Рост и выживание лярвы |
| | Чёрный толстолов | Смертность, подвижность |
| | Синежаберный солнечник | Деление и дифференцировка клеток |
| | Радужная форель (лососёвые) | Уровни АТФ |
| Беспозвоночные | <i>Daphnia magna</i> | Смертность, подвижность |
| | <i>Brachionus calyciflorus sp.</i> | Жизнеспособность и рост |
| | <i>Brachionus plicatilis</i> | Ферментативная активность |
| | Артемия <i>Artemia salina sp.</i> | Количество дафний |
| | Креветки | Изменение скорости |
| | Двустворчатые моллюски, мидии | Открытие / закрытие створки ракушки |
| Растения | Китайская капуста | Производство микроядер |
| | Овес | Генотоксичность |
| | <i>Vicia faba</i> | Скорость прорастания, биомасса |
| | <i>Allium cepa</i> | Масса, ферментативная активность |
| Водоросли | <i>Chlamydomonas sp.</i> | Смертность |
| | <i>Chlorella sp.</i> | Активность фотосинтеза |
| | <i>Chlorella vulgaris</i> | Рост водорослей |
| | <i>Monoraphidium sp.</i> | Ферментативная активность |
| | <i>Scenedesmus subspicatus</i> | Количество клеток |
| Бактерии | Нитрифицирующие бактерии <i>Nitrobacter</i> <i>Nitrosomonas</i> | Емкость микроорганизмов для трансформация С, N, S, ферментативная активность, микробный рост |
| | Биолюминесцентные бактерии | Смертность, активность фотосинтеза |
| | Микробный топливный элемент | Активность поглощения глюкозы |
| | Активный ил | Выход люминесценции |
| | Олиготрофные бактерии Аэробные бактерии | Дыхание, электрическая мощность |

В каждой стране могут быть свои рекомендованные и/или аттестованные методики биотестирования. В Российской Федерации можно выделить следующие биотесты (таблица 1.6).

Широко распространены биотесты, основанные на светящихся организмах, чаще всего представленных светляками и бактериями, в качестве первичного быстрого и количественного лабораторного теста на химическую токсичность (Родичева, Кузнецов, 2004) и в экологическом мониторинге (Kuznetsov, Rodicheva, 1999). Биолюминесцентные биотесты, как и все биотесты, основаны на проявлении реакции живого организма на негативное воздействие, в данном случае на уменьшении свечения организмов.

Таблица 1.6 – Список стандартизованных методик биотестирования (воспроизведено по Терехова, 2011)

| Наименование методики | Организм | Тест-сигнал |
|--|---|---|
| ФР.1.39.2007.03222. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний | <i>Daphnia magna</i> Straus, <i>Cladocera</i> , <i>Crustacea</i> | Смертность, изменение плодовитости |
| ФР.1.39.2007.03221. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости цериодафний | <i>Ceriodaphnia affinis</i> , <i>Cladocera</i> , <i>Crustacea</i> | Смертность, изменение плодовитости |
| ФР.1.39.2007.03223. Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей | <i>Scenedesmus quadricauda</i> (Turp.) Breb. или <i>Selenastrum capricornutum</i> | Уровень флуоресценции, численность клеток |
| ФР.1.39.2006.02506. ПНД Ф Т 14.1:2:3.13-06 (ПНД Ф Т 16.1:2.3:3.10-06). Методика определения токсичности отходов, почв, осадков сточных, поверхностных и грунтовых вод методом биотестирования с использованием равноресничных инфузорий <i>Paramecium caudatum</i> Ehrenberg | <i>Paramecium caudatum</i> Ehrenberg | Смертность |
| ФР 1.39.2006.02505. ПНД Ф Т 14.1:2.14-06 (ПНД Ф Т 16.1:3.11-06). Методика определения токсичности высокоминерализованных поверхностных и сточных вод, почв и отходов по выживаемости солоноватоводных рачков <i>Artemia salina</i> L. | <i>Artemia salina</i> L. | Смертность |

| Наименование методики | Организм | Тест-сигнал |
|--|-------------------------------------|--------------------------------|
| ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04 (ПНД Ф Т 16.1:2.3:3.7-04). Методика определения токсичности проб поверхностных пресных, грунтовых, питьевых, сточных вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению оптической плотности культуры водоросли хлорелла | <i>Chlorella vulgaris</i> Beijer | Оптическая плотность |
| ПНД Ф Т 14.1:2:4.12-06 (ПНД Ф Т 16.1:2:3:3.9-06). Методика определения токсичности водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов, питьевой, сточной и природной воды по смертности тест-объекта <i>Daphnia magna</i> Straus | <i>Daphnia magna</i> Straus | Смертность |
| ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04 (ПНД Ф Т 16.1:2.3:3.8-04). Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-системой “Эколюм” на приборе “Биотокс-10” | Люминесцентные бактерии | Интенсивность биолюминесценции |
| ПНД Ф Т 16.2:2.2-98. Методика определения токсичности почвы и донных осадков по хемотаксической реакции инфузорий | <i>Paramecium caudatum</i> | Реакция хемотаксиса |
| ПНД Ф 14.1:2:4:15-09 (16.1:2.2.3:3.13-09) ФР.1.31.2009.06301. Методика выполнения измерений индекса токсичности почв, почвогрунтов, вод и отходов по изменению подвижности половых клеток млекопитающих <i>in vitro</i> | Сперматозоиды быка | Подвижность |

Ценность данных тестов заключается в следующем: во-первых, биолюминесцентные организмы широко распространены на планете, встречаются в соленых и пресных водах, в почвах, то есть являются представительным организмом; во-вторых, тест-сигнал – свечение или его отсутствие – легко регистрировать с помощью специальной светочувствительной аппаратуры, минимизирую тем самым человеческий фактор в исследовании.

Наиболее известными производимыми люминесцентными тест-системами являются созданные на основе живых лиофилизированных клеток *Vibrio fischeri* системы Microtox и LUMIStox.

Тест оценки острой токсичности Microtox® начал разрабатываться Beckman Microbics Operation с 1979 года (Bulich, 1979). Уже в 1981 году была продемонстрирована возможность применения данной тест-системы для

экологического анализа (Chang et al, 1981). Тест основан на использовании биолюминесцентных бактерий *V. fischeri* в качестве тест-объекта. С момента создания первой рабочей модели прошло свыше 30 лет, с тех пор данный тест стал более автоматизированным. В настоящее время Microtox® представляет собой лабораторный комплекс, включающий в себя: тест-организмы, растворители, набор кювет, специальный микропланшетный анализатор (люминометр) с возможностью автоматического дозированного добавления веществ, а также специализированного программного обеспечения, позволяющего рассчитывать полуметальную концентрацию веществ EC_{50} , коэффициент вариации и другие параметры.

Отдельным направлением в биолюминесцентном тестировании является разработка специальных биомаркеров путем генной модификации бактерий. При этом могут использоваться как светящиеся бактерия, переносящие определенный набор репрезентативных генов, так и несветящиеся, переносящие люминесцентные гены, находящиеся под контролем специфического промотора (Fernández-Piñas et al, 2014).

Сконструированные и трансгенные микроорганизмы с клонированными генами люминесцентной системы различных природных светящихся бактерий, позволили отказаться от необходимости добавления хлорида натрия в исследуемые растворы и упростить процедуру биотестирования (Дерябин, 2004). Имеется ряд сообщений о создании специальных биолюминесцентных репортеров для определения тяжелых металлов и фенолов в почвенных образцах (Alcorta et al., 2006).

В России подобные люминесцентные тест-системы на основе морских светящихся бактерий *Photobacterium phosphoreum* («Микробиосенсор В17-677F») и рекомбинантного штамма *Escherichia coli* Z905, несущего плазмиду с *lux*-опероном *Photobacterium leiognathi* («Микробиосенсор ЕСК»), с 90-х годов XX века производятся в Институте биофизики Сибирского отделения Российской Академии наук. Биотесты «Микробиосенсор» являются стандартными тест-объектами для измерения интегральной токсичности исследуемых водных

образцов, исключают необходимость культивирования и поддержания бактериальных культур с маркерным *lux*-геном (Дерябин, 2004).

При этом тесты, использующие биолюминесцентные бактерии, включаются почти во все современные исследования, ставящие своей целью комплексную оценку токсичности образцов. По данным портала Science direct каждый год выходит порядка 100 статей, в которых упоминается Microtox®. Так, Microtox® выбирают при сравнении твердо- и жидко-фазных биотестов при разработке системы эко-баллов (Lors et al, 2011); при оценке токсичности пиренов в почве с помощью батареи биотестов (Khan et al, 2012); при оценке экотоксикологических рисков (Boluda et al, 2011); при разработке регулирующих документов оценки экологических рисков (Rodrigues-Ruiz et al, 2014); для оценки структурных эффектов биодоступной фракции пестицидов и гербицидов, находящихся в почве (Antunes et al, 2010; Magdaleno et al, 2015).

Необходимость использовать набор биотестов постулировалась еще в 1980-х годах (Cairns, 1986). Исследователи, использующие подход выбора для биотестирования *одного* наиболее чувствительного вида, основываются на следующих предположениях:

- выбранный тест-организм является репрезентативным, т.е. его реакция будет соответствовать реакциям большого массива организмов;
- не существует более значительной реакции на любом уровне биологической организации, чем тест-функция выбранного самого чувствительного биотеста;
- экономия, полученная в результате использования «подхода наиболее чувствительных видов» не компенсируется издержками принятия плохих управленческих решений;
- виды, показавшие, что они наиболее чувствительны к ограниченному массиву токсичных веществ, неизменно будут таковыми для гораздо большего массива токсичных веществ.

Однако автор вышеуказанной статьи считает эти предположения ошибочными. Во-первых, в каждой стране может быть свой «самый

чувствительный вид», который выбирается из часто используемых именно на данной местности тест-организмов. Во-вторых, тест-функции нередко выбираются исходя из удобства регистрации и воспроизводимости, а не основываются на чувствительности. В-третьих, «излишняя чувствительность» одного репрезентативного вида может привести к попыткам изменить нормативы на управленческом уровне, что может быть экономически затратно и при этом бесполезно. И, в-четвертых, многообразие классов токсикантов порождает многообразие механизмов действия на живой организм, которые проявляются по-разному.

В действительности, выбор единого тест-организма затруднителен. Один и тот же вид организмов может проявлять неодинаковую чувствительность в различных исследованиях. Было проведено сравнение чувствительности 20 биотестов для оценки качества почвы (Bierkens et al., 1998). В качестве тест-функций были выбраны: смертность и репродуктивность дождевых червей, ногохвосток, нематод, водорослей и сосудистых растений; биодоступность металлов у бактерий; индукция белков теплового шока у нематод и водорослей; повреждение ДНК (бактерии, дождевые черви, сосудистые растения); активность β -галактозидазы (дафнии) и эстеразы (водоросли); иммунологические показатели дождевых червей. При этом в эксперименте использовали четыре модельных токсиканта (кадмий, фенол, пентахлорфенол и трифлуралин) различного способа действия. Так в почвенных экстрактах, самым чувствительным к кадмию оказался биотест, основанный на размножении микроводорослей *Raohidocetes subcapitata*. К пентахлорфенолу проявили чувствительно сразу четыре биотеста, к фенолу – два. Самым чувствительным к трифлуралину оказался тест ингибирования эстеразной активности. Для твердофазного анализа также не удалось определить единственный репрезентативный тест-организм и тест-функцию.

Для определения экологического риска и биоремедиационной эффективности почв, загрязненных нефтью, были выбраны семь биотестов острой токсичности, а также четыре биотеста хронической токсичности, и включали в себя следующие виды как водных, так и наземных организмов: *Raphidocelis*

subcapitata, *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna*, *Lactuca sativa*, *Bacillus* sp., *Plectus acuminatus*, *Folsomia candida*, *Eisenia fetida*, Bait lamina test (Van Gestel, 2001). В работе было показано, что тесты острой токсичности полезны только при загрязнении нефтью в большой концентрации, но для отслеживания процессов ремедиации необходимо использовать хронические тесты, отражающие сублетальные токсические эффекты.

Выбор тест-организмов осуществляется исследователями самостоятельно в зависимости от конкретной задачи. В батарею биотестов могут включаться не только разные виды из однотипных биотестов, но и кардинально разные биологические методы анализа. Например, в работе (Ко, 2012) целью исследования являлось иллюстрация полезности использования именно батареи биотестов в качестве эффективного комплексного теста для оценки потенциальной токсичности металлов. Токсическое действие солей мышьяка и хрома, меди и кадмия определялось с помощью сильно отличающихся друг от друга тестов – билюминесцентный анализ, ферментная активность α -глюкозидазы, фитотоксичность (проращивание семян) и анализ генных мутаций. Каждый из биотестов имел свой «спектр чувствительности» к металлам, поэтому представляется невозможным выбор одного единственного биотеста. Кроме того, по результатам комплексного исследования, самым токсичным из металлов оказался мышьяк, воздействующий на шесть из семи биотестов, но не на активность α -глюкозидазы.

Использование набора биотестов также обеспечивает обозначение токсического профиля образца (среды). Профиль токсичности - это токсикологический «отпечаток пальца» образца, начиная от чистого соединения до сложной смеси, полученной путем тестирования образца или его экстракта на его активность с использованием батареи биотестов с различными тест-функциями (конечными точками) (Rodriguez-Ruiz et al., 2014). Для составления такого профиля необходимо применять контактные и элюатные методы биотестирования, а также определять точную концентрацию токсикантов химическими методами.

Таким образом, в настоящее время, как для прогноза, так и для диагностики загрязнения рекомендуется использовать набор тестов. Критерии выбора тестов для такой батареи могут включать в себя (по Van Gestel, 2012):

1. Практичность, включающую осуществимость и экономическую эффективность теста;
2. Приемлемость, включая такие аспекты, как стандартизация, воспроизводимость и статистическая достоверность метода испытаний, а также его широкая химическая чувствительность;
3. Экологическое значение, в том числе чувствительность и экологическая реалистичность метода испытаний.

Для получения сбалансированного набора тестов, кроме того, необходимо учитывать следующие критерии оптимальности (по Van Gestel, 2012):

1. Репрезентативность экосистемы. Использование организмов, имеющих разные жизненные циклы, представляющих различные функциональные и таксономические группы и разные пути воздействия поллютантов;
2. Репрезентативность откликов. Они должны быть действительно актуальны для защиты популяций и сообществ;
3. Единообразие, которое предусматривает возможность применения всех тест-системы в батарее к одному тест-объекту в определенном состоянии.

1.6 Биотестирование *in vitro* и ингибиторный анализ

Важным звеном в цепочке биотестов являются методы, отражающие воздействие токсикантов на биохимическом и молекулярном уровне. Для биотестирования *in vitro* применяются не живые организмы как таковые, а выделенные системы (часть организма, клеточные колонии, ферменты).

Использование ферментов в биотестировании почв изначально было нацелено на понимание функционального воздействия токсических веществ на микробные популяции почв. Ферменты в почвах имеют растительное, животное и

микробное происхождение, и в совокупности их активность выражает метаболический статус почв в определенный момент времени. Наиболее часто исследуемыми почвенными ферментами являются оксидоредуктазы (особенно дегидрогеназы, каталаза и пероксидаза) и гидролазы (особенно инвертазы, протеиназы, фосфатазы и уреазы) (Ladd, 1985).

В таблице 1.7 указаны классы ферментов, определяемых в почве (по Ladd, 1985), а также ферменты, используемые в биотестах *in vitro* как самостоятельный «тест-организм» или информация из других источников (*выделены курсивом*). Примеры использования ферментов для анализа содержания пестицидов и тяжелых металлов в образцах подробно рассмотрены также в (Есимбекова и др., 2021).

Таблица 1.7 – Ферментативные биоиндикаторы и биотесты

| Группа и Подгруппа | Фермент | Область применения | Источники |
|--------------------------|--|--|------------------------|
| 1 Оксидоредуктазы | | | |
| 1.1 | дегидрогеназы, глюкозооксидаза | | |
| <i>1.1</i> | <i>дегидрогеназы</i> | Ингибирование активности бактериальной дегидрогеназы при контактном биотестировании твердых осадков и почв | Ronnpagel et al., 1995 |
| <i>1.1.1.27</i> | <i>Лактатдегидрогеназа</i> | Токсичность химических веществ для почвенных изопод | Ribeiro et al., 1999 |
| 1.2 | альдегидоксидаза | | |
| 1.7 | уратоксидаза | | |
| 1.10 | катехолоксидаза, п-дифенолоксидаза, аскорбатоксидаза | | |
| 1.11 | каталаза, пероксидаза | | |
| 1.12 | гидрогеназа | | |
| 1.14 | Фенол А-гидроксилаза | | |
| 2 Трансферазы | | | |
| 2.4 | декстрансукраза, леван-сукраза | | |
| 2.6 | аминотрансферазы | | |
| 2.8 | роданезы | | |
| 3 Гидролазы | | | |
| 3.1 | карбоксилэстераза, арилэстераза, липаза, фосфатаза (моно- и диэфир), нуклеаза, нуклеотидаза, фитаза, | | |
| <i>3.1.1</i> | <i>Эстеразы</i> | Анализ чувствительности к кадмию, фенолу, пентахлорфенолу и трифлуралин в почвах | Bierkens et al., 1998 |

| Группа и Подгруппа | Фермент | Область применения | Источники |
|--------------------|---|--|---|
| 3.1.1.7 | Ацетилхолинэстераза | Анализ загрязнения воды органофосфорными пестицидами Токсичность химических веществ для почвенных изопод | Holland et al., 1967 Ribeiro et al. 1999 |
| 3.1.3 | Фосфатаза | Промышленное загрязнение медью и цинком лесных почв | Tyler G. 1976 |
| 3.2 | амилаза, целлюлаза, ламинариназа, инулаза, ксиланаза, декстраназа, леваназа, полигалактуроназа, α -глюкозидаза, β -глюкозидаза, α -галактозидаза, β -галактозидаза, инвертаза | | |
| 3.2.1.1 | α -амилаза | Потенциально чувствительный биотест для обнаружения следов тяжелых металлов | Poli et al., 2009 |
| 3.2.1.20 | α -глюкозидаза | Анализ чувствительности к мышьяку, хрому, меди и кадмию | Ko, 2012 |
| 3.2.1.23 | β -галактозидаза | Анализ чувствительности к кадмию, фенолу, пентахлорфенолу и трифлуралин в почвах | Bierkens et al., 1998 |
| 3.4 | протеиназа, пептидаза | | |
| 3.5 | аспарагиназа, глутаминаза, амидаза, уреазы | | |
| 3.5.1 | Уреаза | Исследование чувствительности к катехину, гидрохинону, <i>p</i> -бензохинону, ацетогидроксамовой кислоте, натрий п-хлормеркурибензоату | Douglas et al., 1971 |
| 3.6 | неорганическая пирофосфатаза, полиметафосфатаза, аденозинтрифосфатаза | | |
| 3.6.1.3 | АТФ-аза | Загрязнение воды (19 токсикантов) | Riedel et al., 1979 |
| 4 Лиазы | | | |
| 4.1 | аспартаз декарбоксилаза, глутамат декарбоксилаза, ароматическая аминокислота декарбоксилазы | | |

К не сугубо ферментативным биотестам можно отнести методики определения эстрогенной активности сред (Pons et al., 1990; Vondráček et al., 2001; Xiao et al., 2006); исследование активности, опосредованную диоксиноподобными, эстрогенными и комбинированными рецепторами андрогенов и глюкокортикоидными рецепторами (Kannan et al., 2003). Другой метод основан на регистрации изменений двигательной активности сперматозоидов быка в зависимости от токсикантов, присутствующих в экстракте из почв (ПНД Ф 14.1:2:4:15-09, 2009). Биотест *in vitro* RET (Reverse electron transport) основан на ингибировании ферментативной активности

субмитохондриальных частиц сердца коровы токсическими веществами. Условия реакции устроены так, что фермент НАДН-кофермент Q редуктаза работает в обратном направлении; определяют соотношение НАДН к НАД (Blondin et al., 1988; Juvonen et al., 2000). Анализ токсичности с помощью седалищного нерва лягушки проводится путем оценки жизнеспособности (правильного физиологического функционирования) аксонов изолированных из организма нервов (Papaefthimiou et al., 2004).

В качестве особого подхода можно выделить концепцию люциферазного тестирования, предложенную в 1987 году (Кратасюк, Гительзон, 1987). В частности, показаны возможности использования фермент-субстратных систем, полученных из светящихся бактерий, в качестве анализа субстратов реакции, активности ферментов и субстратов при сопряжении нескольких ферментных реакций, анализ ингибиторов билюминесценции.

Интересным представляется подход сопряжения биохимических реакций (рисунок 1.2). В данном примере происходит два последовательных сопряжения: люциферазы с оксидоредуктазой, а оксидоредуктазы с дегидрогеназой. Такая возможность обусловлена превращением субстратов в форме, необходимой для ферментов каждого нижележащего уровня. При этом потенциально возможно сопряжение с биферментной системой (оксидоредуктаза + люцифераза) большого числа ферментов.

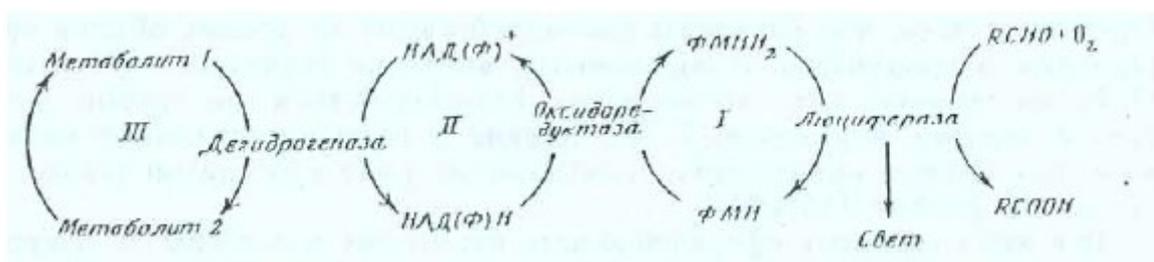


Рисунок 1.2 – Принцип сопряжения реакций
(Кратасюк, Гительзон, 1987)

Такой принцип может использоваться для регуляции чувствительности ферментного теста и выбора фермента-мишени, обеспечивающую ключевую

функцию. Рассмотрим принципы ингибиторного анализа на примере биферментной биолюминесцентной системы.

При классическом подходе ингибирование ферментов рассматривают как обратимый и необратимый процесс. При этом необратимые ингибиторы связывают (или разрушают) функциональные группы ферментов, которые необходимы для проявления каталитической активности. Обратимые ингибиторы бывают конкурентного и неконкурентного типа. Конкурентные ингибиторы конкурируют с субстратом за связывание с активным центром фермента, при этом ферментативного превращения не происходит. Неконкурентный ингибитор присоединяется к ферменту не в активном центре. При этом происходит изменение конформации молекулы фермента и его каталитический центр становится неактивным (Ленинджер, 1985).

При протекании биолюминесцентной реакции наблюдаются более сложные процессы ингибирования, чем при классическом подходе Михаэлиса-Ментен. Для ферментативных процессов светящихся бактерий можно выделить следующие механизмы ингибирования (Экологическая биофизика, 2002):

- Химическая модификация аминокислотных остатков, в активном центре ферментов в том числе;
- Конкурентные отношения между субстратами люциферазы и других ферментов и добавляемыми веществами;
- Разрушение или тушение возбуждения интермедиатов;
- Действие на дегидрогеназы (неспецифические акцепторы электронов, ингибиторы дегидрогеназ).

Химические соединения могут оказывать эффект на разных уровнях и стадиях протекания сопряженной биолюминесцентной реакции. Была предложена схема, обобщающая механизмы действия веществ (Kudryasheva, 2006). Согласно этой схеме (рисунок 1.3) выделяют пять типов влияния: процессы переноса энергии с участием возбужденных состояний экзогенных молекул акцепторов энергии (1); увеличение вероятности синглет-триплетной конверсии эмиттера биолюминесценции в присутствии тяжелого атома (2); изменение скорости

сопряженных реакций органическими окислителями (3); взаимодействие экзогенных соединений с ферментами и изменение ферментативной активности (4); неспецифическое распределение электронной плотности акцепторов (5). При этом процессы 1,2 и 5 относят к физико-химическому, процесс 3 к химическому, а 4 процесс – к биохимическому уровню воздействия.

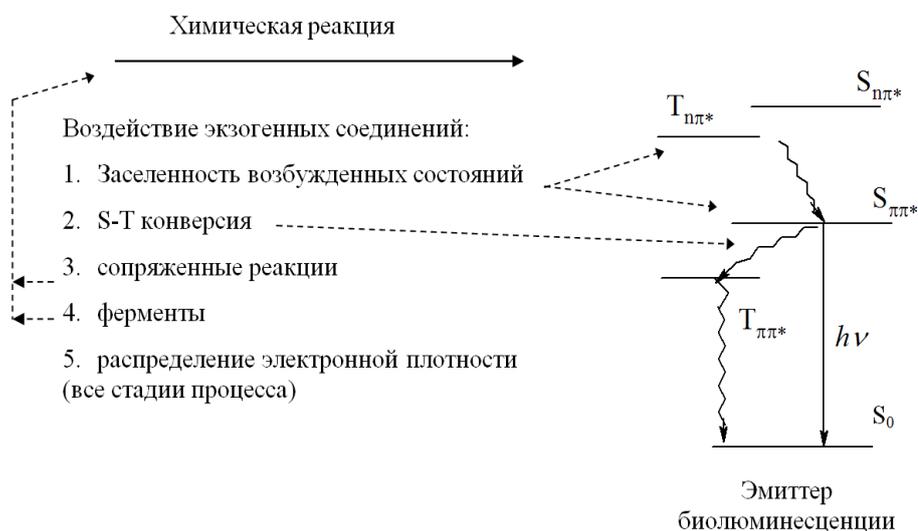


Рисунок 1.3 – Влияние экзогенных соединений на различные стадии биолюминесцентного процесса (Kudryasheva, 2006)

В приложении Б представлены данные об некоторых ингибиторах биолюминесценции (в том числе *in vitro*) их химическом строении и механизме действия.

Не смотря на многообразие механизмов воздействия на ферментную систему, основным принципом биолюминесцентного анализа является корреляция токсичности исследуемого образца и изменений кинетических параметров биолюминесцентной реакции (Kudryasheva, 2006). Под влиянием поллютантов могут изменяться: максимальная интенсивность свечения (I_{max}), общее количество излученных в ходе реакции квантов света (Q), константы затухания свечения после максимума (k), время достижения максимума свечения (t_{max}) (Экологическая биофизика, 2002). Для выявления действия токсикантов так же можно использовать коэффициент ингибирования K_i (Ren, Frymier, 2003). Количественная оценка параметра тест-реакции может выражаться в виде безразмерной величины - индекса токсичности, который определяют по

отношению величин интенсивностей биолюминесценции тест-объекта в исследуемой пробе к контрольной пробе, не содержащей токсических веществ (Родичева, Кузнецов, 2004; Esimbekova et al, 2014; Kratasyuk et al, 2015).

В общем случае в биотестировании применяют подход, при котором определяют безопасные, полублетальные и летальные концентрации токсических веществ, что также справедливо и для биолюминесцентного ферментативного биотеста. Например, токсичность количественно можно определить с помощью таких параметров, как (Van Gestel, 2012):

LC₁₀ и LC₅₀ («летальные концентрации», убивающие 10 и 50% подвергшихся воздействию испытуемых организмов соответственно);

EC₁₀ и EC₅₀ («эффективные концентрации», вызывающие снижение значения тест-функции на 10% и 50% соответственно, например, рост или плодовитость);

NOEC и LOEC (ненаблюдаемая и наименьшая наблюдаемая концентрация эффекта, соответственно).

1.7 Заключение к главе

Таким образом, почва является сложной полифункциональной, поликомпонентной, многофазной, динамичной, открытой и устойчивой живой системой. В почве зарождаются главные потоки масс металлов, вовлекаемые в миграционную систему биосферы (Добровольский, 2004). Способность почв к накоплению и преобразованию веществ зависит от её состояния (степени здоровья) и от многих физико-химических параметров и свойств (Карпухин, Ладонин, 2008; Путилина и др., 2009; Волгина и др., 2010; Шорина и др., 2010; Колесников и др., 2010). Поэтому оценка её состояния, в частности загрязнение, представляет собой сложную проблему.

Для решения данной проблемы используются различные методологические подходы, в том числе и привлечение методов биотестирования. Подходы и принципы, применяемые в биотестировании, неоднократно менялись,

добавлялись тестовые организмы. К настоящему моменту в качестве теста используют организмы разных трофических уровней (Терехова, 2011), рекомендуется составлять батарею репрезентативных биотестов (Cairns, 1986; Van Gestel, 2012; Ко, 2012). Для получения сбалансированного набора тестов, кроме того, необходимо учитывать критерии оптимальности (Van Gestel, 2012). Однако универсальный подход для рассмотрения действия поллютантов на молекулярном уровне отсутствует. Ферментативные процессы – универсальные процессы, лежащие в основе всех уровней организации живого. Ферменты, с одной стороны обладая видовой специфичностью в строениях и свойствах, выполняют строго определенную функцию, присущую разным организмам. Поэтому рассмотрение возможности использования отдельных ферментов и цепей их сопряжения для целей биотестирования почв и определения механизмов действия химических веществ на молекулярном уровне, является актуальным и перспективным.

ГЛАВА 2 Материалы и методы исследования

В качестве основ для разработки методики были выбраны: патент РФ № 2413771 «Экспресс-способ биотестирования природных, сточных вод и водных растворов», процедура пробоподготовки почв по ГОСТ 17.4.4.02-2017 и методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-системой «Эколюм» ПНД Ф.Т. 14.1:2:3:4.11-04.

Для исследования были отобраны 263 образца почв и почвенных грунтов: модельные почвенные грунты (песок, суглинок, высокогумусный чернозем, предоставлены В.В. Чупровой); модельные серые лесные почвы искусственной лесной экосистемы, в которую вносили разную концентрацию азота (пробы предоставлены А.И. Матвеевко); банк модельных почвенных грунтов, составленный на основе песка (пойма р. Енисей, Березовский район), легкого суглинка (лесной массив «Погорельский бор», Емельяновский район), тяжелого суглинка и чернозема (ОПХ «Минино», Емельяновский район); дерново-подзолистые почвы в лесу и на месте вырубki (лесной массив «Погорельский бор», Емельяновский район); горные почвы заповедных территорий (объект археологического наследия «Саяно-Пограничное б», горная система Западный Саян, Ермаковский район); почвы сельскохозяйственного назначения (пашня, залежь и целина, ОПХ «Соляное» Рыбинский район); техногенные урбостратоземы (г. Красноярск).

2.1 Описание почвенных образцов

В работе исследовались почвы различного происхождения (естественные и искусственные) и предназначения (лесные, сельскохозяйственные, заповедные, техногенные, городские), разновидностью по гранулометрическому составу от супеси до тяжелого суглинка, с широким диапазоном различия в содержании гумуса.

2.1.1 Модельные почвогрунты (стандартные модельные почвы Красноярского края)

Для оценки возможности использования биолюминесцентных ферментативных тестов в качестве диагностических показателей широкого спектра поллютантов заложены два стандартных модельных опыта. Полные факториальные схемы опытов включали варианты видов и разновидностей почв и пород с различным гранулометрическим составом и содержанием гумуса. Образцы для опытов были отобраны в экологически чистых районах, что исключало техногенное загрязнение почв и пород (ОПХ «Минино», Емельяновский район, лесной массив «Погорельский бор», Емельяновский район, пойма р. Енисей, Березовский район).

Почвы были высушены, просеяны через сито для достижения однородности. Опыты (рисунки 2.1 и 2.2) закладываются в сосудах с массой почвы и породы 8 кг. Повторность в опытах 4-кратная. Породы представлены четвертичными лессовидными отложениями (за исключением супеси). Всего было заложено 68 сосудов.

СХЕМЫ ОПЫТОВ

Схема опыта 1

Супесь.

Легкий суглинок.

Средний суглинок.

Тяжелый суглинок.

Исходная высокогумусная почва
(содержание гумуса 9,5-10%).

Схема опыта 2

Супесь + почва (1% гумуса).

Супесь + почва (3% гумуса).

Супесь + почва (5% гумуса).

Легкий суглинок + почва (1% гумуса).

Легкий суглинок + почва (3% гумуса).

Легкий суглинок + почва (5% гумуса).

Средний суглинок + почва (1% гумуса).

Средний суглинок + почва (3% гумуса).

Средний суглинок + почва (5% гумуса).

Тяжелый суглинок + почва (1% гумуса).

Тяжелый суглинок + почва (3% гумуса).

Тяжелый суглинок + почва (5% гумуса).



Рисунок 2.1 – Внешний вид модельного опыта №1

Исследования почвенных образцов были выполнены в лаборатории Федерального агентства научных организаций федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр сибирского отделения российской академии наук» обособленное подразделение Красноярский научно-исследовательский институт сельского хозяйства (КрасНИИСХ).

Также в качестве модельных почв природного происхождения использовались серые лесные почвы, искусственно обогащенные азотом. Почвы отобраны из верхнего минерального горизонта A_1 (0-10 см) под древесными породами сосны обыкновенной. Азот вносили в форме NH_4NO_3 и инкубировали трое суток, концентрация вносимой соли соответствовала поступлению: 1000, 500, 250, 50, 10, 1 и 0,5 кг N га⁻¹. Пробы предоставлены Матвиенко А.И.



Рисунок 2.2 – Подготовка почв для модельного опыта

2.1.2 ОПХ «Минино» и лесной массив «Погорельский бор», Емельяновский район

На каждом из объектов заложены полнопрофильные почвенные разрезы, выполнены привязка и описание почв по морфологическим признакам, дано полное наименование почвы, отобраны почвенные образцы.

Наименование почв дано по классификации, на основе субстантивно-генетического подхода (Шишов и др., 2004; Полевой определитель ..., 2008), с учетом результатов морфогенетического исследования профилей почв и их химико-аналитических показателей. Все почвы отнесены к постлитогенному стволу.

В ОПХ «Минино» было заложено, на целинном и пахотном участках, два полнопрофильных разреза почв. Описание и название почв приведено в таблице 2.1.

Р. 4.6 заложен на склоне южной экспозиции в замкнутом микропонижении (56°04'40"N и 92°40'15"E), крутизна склона в месте разреза 3-4°. Высота гипсометрической отметки 248 м над уровнем моря. Разрез заложен на целинном участке с лугово-степной растительностью. Наблюдается выраженная ветровая эрозия.

Р. 6-1 заложен на ровном, распаханном микропонижении (56°04'43,60"N и 92°40'28,64"E). Высота гипсометрической отметки 242 м над уровнем моря. Наблюдается ветровая эрозия.

Таблица 2.1 – Описание почв по морфологическим признакам

| Горизонт, его мощность, см | Описание горизонта по морфологическим признакам |
|--|--|
| Р. 4-6. Отдел аккумулятивно-гумусовых почв. Чернозем дисперсно-карбонатный, маломощный, слабо гумусированный, среднесуглинистый, сильнодефлированный на легком карбонатном суглинке. | |
| AU, 0-35 | Свежий, темно-серый с бурыми вкраплениями, комковатый, плотный, тонкопористый, средний суглинок, гумусовые вещества, корни, дресва, переход плавный. |
| BCA, 35-103 | Свежий, красно-бурый с белесыми и охристыми вкраплениями, кипит, непрочно-комковатый, плотный тонкопористый, средний суглинок, карбонаты, оглеение в нижней части горизонта, камни, дресва, переход постепенный. |
| Cca, 103-123 | Свежий, красный, кипит, бесструктурный, уплотненный, легкий суглинок, карбонаты. |
| Р. 6-1. Отдел аккумулятивно-гумусовых почв. Чернозем дисперсно-карбонатный, средне мелкий, средне гумусированный, тяжелосуглинистый, среднедефлированный на карбонатной глине. | |
| PU, 0-5 | Сухой, темно-серый, комковато-глыбистый, рыхлый, тонкопористый, тяжелый суглинок, гумусовые вещества, дресва, переход выраженный. |
| AU, 5-29 | Свежий, темно-серый, комковато-глыбистый, плотный, тонкопористый, трещиноватый, средний суглинок, гумусовые вещества, корни, дресва, переход резкий. |
| BCA, 29-90 | Свежий, красно-бурый, кипит, комковатый, очень плотный, тонкопористый, глина, карбонаты в форме псевдомицелия, дресва, переход постепенный. |
| Cca, 90-110 | Свежий, желто-бурый, кипит, бесструктурный, рыхлый, глина, галька, дресва, карбонаты. |

В лесном массиве «Погорельский бор» были заложены три полнопрофильных разреза почв. Разрезы заложены под сосновым лесом на

нетронутой и нарушенной поверхности, а также на вырубке. Описание и название почв приведено в таблице 2.2.

Р. 4.5 заложен на ровном участке соснового леса (56°22'38,58"N и 92°57'26,49"E). Высота гипсометрической отметки 276 м над уровнем моря.

Р. 5-1 заложен на ровном нарушенном участке соснового леса (56°22'34,27"N и 92°57'29,45"E). Высота гипсометрической отметки 274 м над уровнем моря. Участок представлен, свежей (зимней) вырубкой. Поверхность почвы нарушена лесохозяйственной техникой и работами по заготовке древесины.

Р. 5-2 заложен на ровном участке соснового леса (56°22'35,33"N и 92°57'29,54"E). Высота гипсометрической отметки 275 м над уровнем моря.

Таблица 2.2 – Описание почв по морфологическим признакам

| Горизонт, его мощность, см | Описание горизонта по морфологическим признакам |
|---|---|
| Р. 4-5. Отдел текстурно-дифференцированных почв. Дерново-подзолистая типичная, маломощная, малогумусированная среднесуглинистая на супеси | |
| АУ, 0-55 | Свежий, серый с бурыми вкраплениями, непрочно-комковатый, рыхлый, тонкопористый, средний суглинок, гумусовые вещества и кремнеземистая присыпка, переход постепенный. |
| ЕL, 55-73 | Свежий, светло-бурый, комковато-плитчатый, уплотненный, тонкопористый, легкий суглинок, кремнеземистая присыпка, переход резкий. |
| ВТ, 73-120 | Свежий, бурый, комковатый, уплотненный, тонкопористый, глина, окись железа, переход постепенный. |
| Р. 5-1. Отдел текстурно-дифференцированных почв. Дерново-подзолистая типичная, мелкая, мало гумусированная, среднесуглинистая на супеси. | |
| АУ, 0-22 | Свежий, темно-серый, непрочно-комковатый, рыхлый, тонкопористый, средний суглинок, гумусовые вещества и кремнеземистая присыпка, переход постепенный. |
| ЕL, 22-44 | Свежий, палево-серая, бесструктурный, рассыпчатый, тонкопористый, средний суглинок, кремнеземистая присыпка, переход резкий. |
| ВТ, 44-144 | Свежий, желтая с ржавыми, охристыми пятнами, бесструктурный, рассыпчатый, тонкопористый, супесь, окись железа. |
| Р. 5-2. Отдел текстурно-дифференцированных почв. Дерново-подзолистая типичная, мелкая, сильногумусированная, супесчаная на песке. | |
| АУ, 0-14 | Свежий, черная, комковатый, рыхлый, тонкопористый, супесчаный, гумусовые вещества и кремнеземистая присыпка, переход постепенный. |
| ЕL, 14-51 | Свежий, бурый, бесструктурный, рассыпчатый, тонкопористый, песок, кремнеземистая присыпка, переход резкий. |
| ВТ, 51-97 | Свежий, красно-бурый, бесструктурный, рассыпчатый, тонкопористый, песок, окись железа, переход постепенный. |
| С, 97-140 | Свежий, светло-бурый, бесструктурный, рыхлый, окись железа, песок. |

2.1.3 ОПХ «Соляное», Рыбинский район

На каждом из объектов заложены полнопрофильные почвенные разрезы, выполнены привязка и описание почв по морфологическим признакам, дано полное наименование почвы, отобраны почвенные образцы.

Наименование почв дано по классификации, на основе субстантивно-генетического подхода (Шишов и др., 2004; Полевой определитель ..., 2008), с учетом результатов морфогенетического исследования профилей почв и их химико-аналитических показателей. Все почвы отнесены к постлитогенному стволу.

В ОПХ «Соляное» Рыбинского района были заложены три полнопрофильных разреза почв. Разрезы заложены на пашне, на 10-летней залежи и на целинном участке (рисунок 2.3). Абсолютная высота местности 355 м.



Рисунок 2.3 – Космический снимок участков, где закладывались почвенные разрезы

Р. 1-15 заложен на ровном распаханном участке (56° 0'11,15"N и 95°10'13,47"E). Возделываются многолетние травы. Продолжительность распашки несколько десятков лет.

Р. 2-15 заложен на ровном залежном участке (56° 0'11,06"N и 95°10'8,91"E). Срок залежи не менее 10 лет.

Р. 3-15 заложен на целинном ровном участке (55°59'57,82"N и 95°10'14,77"E). Растительность представлена бобово-злаковым разнотравьем.

Описание и название почв приведено в таблице 2.3.

Таблица 2.3 – Описание почв по морфологическим признакам

| Горизонт, его мощность, см | Описание горизонта по морфологическим признакам |
|--|---|
| Р. 1-15. Отдел аккумулятивно-гумусовых почв. Агрочернозем глинисто-иллювиальный, среднемощный, сильно гумусированный, тяжелосуглинистый, на глине. | |
| PU 0-20 | Сухой, темно-серый (практически черный), комковато-ореховатый, рыхлый, тонкопористый, тяжелый суглинок, гумусовые вещества, переход выраженный. |
| AU 27-43 | Свежий, темно-серый, ореховато-комковатый, рыхлый, тонкопористый, тяжелый суглинок, гумусовые вещества, переход плавный. |
| ABI 43-55 | Свежий, темно-серый, комковато-зернистый, плотный, тонкопористый, глина, гумусовые вещества, переход плавный. |
| BI 55-120 | Свежий, буровато-коричневый, комковато-ореховатый, плотный, глина. |
| Р. 2-15. Отдел аккумулятивно-гумусовых почв. Агрочернозем маломощный, сильно гумусированный, тяжелосуглинистый, на карбонатном тяжелом суглинке. | |
| AU (PU), 0-26 | Свежий, темно-серый, комковатый, уплотненный, тонкопористый, тяжелый суглинок, гумусовые вещества, переход плавный. |
| ABI, 26-52 | Свежий, светло-серый с бурым оттенком, комковато-зернистый, плотный, тонкопористый, тяжелый суглинок, гумусовые вещества, переход плавный. |
| BCA, 52-140 | Свежий, бурый с белёсыми вкраплениями в виде псевдомицелия, комковато-зернистый, уплотненный, тяжелый суглинок, карбонаты. |
| Р. 3-15. Отдел аккумулятивно-гумусовых почв. Чернозем маломощный, тучный, тяжелосуглинистый, на карбонатной глине. | |
| AU, 0-34 | Свежий, темно-серый, комковато-ореховатый, уплотненный, тонкопористый, тяжелый суглинок, гумусовые вещества, структурой, переход плавный. |
| ABI, 34-45 | Свежий, серовато-бурый, комковато-зернистый, уплотненный, тонкопористый, тяжелый суглинок, гумусовые вещества, переход плавный. |
| BI, 45-67 | Свежий, светло-бурый, мелкозернистый, уплотненный, тяжелый суглинок, переход выраженный, по вскипанию. |
| BCA, 67-120 | Свежий, светло-бурый с белёсыми вкраплениями в виде псевдомицелия, непрочно-комковатый, плотный, глина. |

2.1.4 Объект археологического наследия «Саяно-Пограничное б», горная система Западный Саян, Ермаковский район

На каждом из объектов заложены полнопрофильные почвенные разрезы, выполнены привязка и описание почв по морфологическим признакам, дано полное наименование почвы, отобраны почвенные образцы.

Наименование почв дано по классификации, на основе субстантивно-генетического подхода (Шишов и др., 2004; Полевой определитель ..., 2008), с учетом результатов морфогенетического исследования профилей почв и их химико-аналитических показателей. Все почвы отнесены к постлитогенному стволу.

Памятник археологического наследия «Саяно-Пограничное б» (серия курганов скифского периода) расположен в горной системе Западный Саян. Данный объект считается эталоном экологической чистоты, так как удален от промышленных объектов, дорог, крупных населенных пунктов и практически лишен антропогенного воздействия. Объект находится на южном склоне долины, сформированной временными водотоками (рисунок 2.4). Для характеристики почвенного покрова объекта заложено 6 почвенных разрезов (рисунок 2.5).



Рисунок 2.4 – Памятник археологического наследия «Саяно-Пограничное



Рисунок 2.5 – Космический снимок долины (цифрами показаны номера почвенных разрезов)

Разрезы задолжены вдоль южного склона долины, либо на месте раскопок (разрезы 2-14, 5-14), либо в непосредственной близости от них (разрезы 1-14, 6-14). Растительность представлена лугово-степными сообществами, образованными в основном злаками, и редколесьем из лиственницы сибирской. Высота травостоя 15-25см. Проективное покрытие 90-100%. Описание приведено в таблице 2.4.

Р. 1-14 заложен в нижней части южного склона долины ($52^{\circ}12'58''N$ и $93^{\circ}35'03''E$), крутизной $6-7^{\circ}$. Высота гипсометрической отметки 1013 м над уровнем моря. Р. 2-14, заложен на конусе выноса в средней части южного склона долины ($52^{\circ}13'05''N$ и $93^{\circ}34'46''E$), крутизна склона в месте разреза $4-5^{\circ}$. Высота гипсометрической отметки 1020 м над уровнем моря. Р. 5-14 заложены на конусе выноса нижней части южного склона долины ($52^{\circ}13'06''N$ и $93^{\circ}34'29-32-34''E$), крутизна склона в месте разреза $3-4^{\circ}$. В месте закладки этих трех разрезов отмечен слабый уклон $2-3^{\circ}$ западной экспозиции. Таким образом, разрезы расположены вдоль юго-западного пологого склона. Данные три разреза отражают пространственную смену органо-аккумулятивных почв на аккумулятивно-гумусовые почвы, а именно, последовательный переход темно-гумусовой почвы в чернозем. Высота гипсометрической отметки 1016-1017 м над уровнем моря.

Р. 6-14, заложен в средней части южного склона долины (52°13'10"N и 93°35'26"E), крутизна склона в месте разреза 30-35°. Высота гипсометрической отметки 1057 м над уровнем моря.

Таблица 2.4 – Описание почв по морфологическим признакам

| Горизонт, его мощность, см | Описание горизонта по морфологическим признакам |
|--|---|
| Р. 1-14. Отдел аккумулятивно-гумусовых почв. Чернозем дисперсно-карбонатный, маломощный, тучный, среднесуглинистый, с глубокоразвитым профилем на карбонатном лессовидном суглинке | |
| AU, 0-30 | Свежий, черный, комковато-пылеватый, рыхлый, тонкопористый, средний суглинок, гумусовые вещества, в нижней части горизонта карбонаты в диффузной форме, корней много (дернина), переход языковатый, выражен по цвету. |
| Bdc, 30-68 | Свежий, бурый, комковато-пылеватый, рыхлый, тонкопористый, средний суглинок, пленка гумусовых веществ, карбонаты в диффузной форме, окись железа, камни, дресва, корни, переход постепенный по цвету. |
| [Bdc], 68-100 | Свежий, красно-бурый, комковато-пылеватый, рыхлый, тонкопористый, средний суглинок, карбонаты в диффузной форме, камни, дресва, песчаные светлые прослойки, корни, переход, выраженный по цвету. |
| Cdc, 100-120 | Свежий, слоистый, по цвету слои бурые и светло-бурые, плотный, тонкопористый, тяжелый суглинок, карбонаты, окись железа, камни, дресва. |
| Р. 2-14. Отдел органо-аккумулятивных почв. Темно-гумусовая, натечно-карбонатная, мелкая, легкосуглинистая, слабоскелетная, со слаборазвитым профилем на пролювии | |
| AU, 0-15 | Свежий, темно-серый, комковато-пылеватый, рыхлый, тонкопористый, легкий суглинок, гумусовые вещества, карбонаты в диффузной форме, корней много (дернина), переход выражен по границе с камнями. |
| BCic, 15-22 | Свежий, светло-бурый, состоит из камней и пыли, средний суглинок, карбонаты, корни, камни слоистые, чешуйчатые и плитчатые, с нижней стороны камней «накипь» карбонатов. |
| [BCic], 22-40 | Свежий, бурый, состоит из камней и мелкозема, тяжелее, чем предыдущий, карбонаты, окись железа, корни, камни слоистые, чешуйчатые и плитчатые, с нижней стороны камней «накипь» карбонатов. |
| Р. 5-14. Отдел аккумулятивно-гумусовых почв. Чернозем дисперсно-карбонатный, маломощный, тучный, легкосуглинистый, слабоскелетный, со слаборазвитым профилем на пролювиально-делювиальных отложениях | |
| AU, 0-31 | Свежий, темно-серый, комковатый, рыхлый, тонкопористый, легкий суглинок, гумусовые вещества, не кипит, корней много, переход плавный. |
| Bdc, 31-35 | Свежий, темно-бурый, комковатый, рыхлый, тонкопористый, средний суглинок, гумусовые вещества, карбонаты в диффузной форме, камни, дресва. |
| Р. 6-14. Отдел литоземы. Литозем темно-гумусовый, натечно-карбонатный, тучный, легкосуглинистый, среднескелетный. | |
| AU, 0-10 | Свежий, темно-серый, пылеватый, рыхлый, тонкопористый, легкий суглинок, гумусовые вещества, карбонаты в диффузной форме, корней много, обломки горных пород разного размера, переход неровный. |
| Cic, 10-20 | Свежий, бурый, пылеватый, тонкопористый, легкий суглинок, карбонаты в диффузной форме, обломки горных пород разного размера, с нижней стороны камней «накипь» карбонатов. |
| Ric, 20- | Мраморовидные массы, с нижней стороны камней «накипь» карбонатов. |

2.1.5 Техногенные урбостратоземы

Образцы урбостратоземов техногенных, диагностированных по методу Прокофьевой с соавторами (Прокофьева и др. 2014), загрязненные фтором, были отобраны в 2016 г. в зоне техногенного влияния крупного промышленного предприятия Красноярский алюминиевый завод (КраЗ), в пределах левобережной части г. Красноярска (0-2,0 км от завода). Образцы почвы с загрязнением мышьяком и свинцом были взяты в правобережной части города, в непосредственной близости (0,5-2,0 км) от одной из крупнейшей в СФО тепловой электростанции Красноярской ТЭЦ-1 (ТЭЦ-1).

2.2 Методы определения почвенных характеристик

Образцы почвы для аналитической работы отбирались послойно, из каждого генетического горизонта. Подготовка образцов заключалась в высушивании, измельчении, просеивании через сито ячейками в 1,0 и 0,25 мм. В почвенных образцах стандартными химическими методами определяли содержание гумуса, подвижного гумусового вещества (ПГВ), содержание подвижного органического вещества $C_{0,1n.NaOH}$, pH_{KCl} , pH_{H_2O} , гранулометрический состав (в том числе содержание физической глины), нитратный азот $N-NO_3$, подвижный фосфор P_2O_5 . Аналитическая работа выполнялась в соответствии с методическим руководством (Агрохимические методы, 1975).

Содержание гумуса определяли по методу Тюрина (ГОСТ 26213-2021). Для извлечения ПГВ использовали 0,1n. гидроксид натрия при соотношении почвы и растворителя 1:20. Гуминовые кислоты (ГК) в составе ПГВ осаждали серной кислотой, а содержание фульвокислот (ФК) рассчитывали по разности между общим содержанием извлекаемых щелочью гумусовых веществ и содержанием гуминовых кислот. По количеству гумусовых кислот определяли отношение ГК:

ФК. Для извлечения подвижной части гумуса ($C_{0,1n. NaOH}$) использовали 0,1 н. гидроксид натрия, при соотношении почвы и растворителя 1:20.

Содержание нитратного азота определяли ионоселективным методом. Содержание подвижного фосфора определяли по методу Кирсанова в 0,2 н HCl вытяжке (для почв Погорельского бора) и по методу Чирикова в 0,5 н CH_3COOH (для почв ОПХ «Минино» и почв Саян).

Гранулометрический состав почвы определялся в соответствии с ГОСТ 12536-2014. Показатели $pH_{сол}$ и pH_{H_2O} определяли потенциометрическим методом (ГОСТ 26483-85; ГОСТ 26423-85).

Предельные концентрации поллютантов (водорастворимого фтора, валового свинца, валового мышьяка) были измерены Красноярским Референтным Центром Россельхознадзора (КРЦ). Содержание водорастворимой формы свинца в почве было определено в Центре коллективного пользования Сибирского федерального университета методом пламенной атомно-абсорбционной спектрометрии.

Содержание поллютантов в почвах определяли физико-химическими методами в соответствии с требованиями нормативных документов. Содержание валового мышьяка и свинца в почвах фиксировали методом атомно-эмиссионной спектрометрии (М-МВИ 80-2008, 2008), содержание водорастворимого фтора – с использованием фторселективного электрода (ФР 1.31.2017.27474).

2.3 Пробоподготовка почвы к ферментативному анализу

Тестирование проводили на водной вытяжке из почв. Для приготовления водной вытяжки к навеске почвы (5,0 г) приливали пятикратный объем дистиллированной воды ($pH=6,8$) и взбалтывали в течение 30 минут на орбитальном шейкере (Multi-functional Orbital Shaker PSU-20i, Biosan, Латвия). Полученный экстракт фильтровали через бумажный фильтр «белая лента» и центрифугировали в течение 10 мин при 3500 об/мин на центрифуге («Eppendorf» centrifuge 5810 R, Германия).

2.4 Биотестирование, основанное на ингибировании активности ферментов

В качестве возможных ферментных систем для включения в комплексный ферментативный биотест были рассмотрены следующие ферментативные системы: *алкогольдегидрогеназа* (АДГ, класс оксидоредуктаз, ключевой фермент детоксикации спиртов), *НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза* (Р, класс оксидоредуктаз, один из ключевых ферментов дыхания), *трипсин* (Тр, класс гидролаз, ключевой фермент пищеварения белков), *бутирилхолинэстераза* (БХЭ, класс гидролаз, ключевой фермент нервной проводимости), *глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа* (Г6ФД, класс оксидоредуктаз, является ключевым фермент вторичного пути катаболизма глюкозы - пентозофосфатного пути), *НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза* (Р+Л, люцифера относится к классу оксидоредуктаз, катализирует реакцию окисления длинноцепочечных алифатических альдегидов при участии восстановленного флавинмононуклеотида (ФМН·Н₂), продуктами реакции являются окисленный флавинмононуклеотид (ФМН), жирная кислота (RCOOH) и излучение света в сине-зеленой области спектра), *лактатдегидрогеназа + НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза* (ЛДГ+Р+Л, лактатдегидрогеназа относится к классу оксидоредуктаз, ключевой фермент молочно-кислого брожения), *алкогольдегидрогеназа + НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза* (АДГ+Р+Л), *НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза + трипсин* (Р+Л+Тр).

2.4.1 Растворы и препараты

Алкогольдегидрогеназа (АДГ) из *Saccharomyces cerevisiae* (75000 ед., CAS: 9031-72-5); лактатдегидрогеназа (ЛДГ) ЕС 1.1.1.27 из кроличьей мышцы был произведен Sigma (Type XI, catalogue no. L1254, 5000 ед.); бутирилхолинэстераза (БХЭ) из лошадиной сыворотки лиофилизированная ≥ 900 U/мг; глюкоза-6-фосфат дегидрогеназа (Г6ФДГ) ЕС 1.1.1.49 из *Leuconostoc mesenteroides* (1000 ед., CAS:

9001-40-5) был произведен Sigma-Aldrich (Germany); комплект реактивов аналитической билюминесценции (КРАБ) (Институт биофизики СО РАН, Красноярск), содержащий 0,5 мг люциферазы (Л) ЕС 1.14.14.3 из рекомбинантного штамма *Escherichia coli* (*Photobacterium leiognathi*) и 0,15 ед. активности NADH:FMN-оксидоредуктазы (Р) ЕС 1.5.1.29 (*Vibrio fischeri*); трипсин.

НАД⁺ (AppliChem, Germany) и этиловый спирт (Medhimprom, Russia) были использованы в качестве субстратов АДГ. ФМН (Serva, Germany) и НАДН (Gerbu, Germany) были использованы в качестве субстратов Р. HCl (GOST 14261-77, Russia) и N α -бензоил-L-аргинин этиловый эфир (Sigma-Aldrich, Germany) были использованы в качестве субстратов трипсина. Бутирилхолин йодид $\geq 99.0\%$ (АТ) (Sigma-Aldrich, Germany) и 5,5'-5-5' дитиобис-2(нитробензойной кислоты) $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, Germany) были использованы в качестве субстратов БХЭ. β -НАДФ (Sigma-Aldrich, Germany) и MgCl₂ (LenReaktiv, Russia) были использованы в качестве субстратов Г6ФДГ. ФМН (Serva, Germany), НАДН (Gerbu, Germany) и тетрадеканаль (Merck, Germany) были использованы в качестве субстратов биферментной системы Р + Л и трехферментной системы Трипсин + Р + Л. L-(+)-лактат (Sigma-Aldrich, Germany), ФМН (Serva, Germany), НАД⁺ (AppliChem, Germany) и тетрадеканаль (Merck, Germany) были использованы в качестве субстратов трехферментной системы ЛДГ + Р + Л. НАД⁺ (AppliChem, Germany), спирт (Medhimprom, Russia), ФМН (Serva, Germany) и тетрадеканаль (Merck, Germany) были использованы в качестве субстратов трехферментной системы АДГ + Р + Л.

Малатион (Алсико-Агропром, Россия), диазинон (МедЛис, Россия), «Децис» Профи (Bayer CropScience, Germany), хлорид меди (II), сульфат меди (II) (NPF Невский химик, Россия), γ -гексахлорциклогексан (γ -ГХЦГ) (ГСО 7308-96, Россия), диоксид титана, наночастицы (TiO₂) (Альбион, Россия), дизельное топливо были использованы в качестве модельных загрязнителей образцов почвы.

2.4.2 Измерение активности ферментативных систем в присутствии водных вытяжек из почв и растворов поллютантов

Активность моноферментных систем оценивали по изменению оптической плотности спектрофотометрическим методом. Активность биферментной и триферментной систем определяли по величине максимальной интенсивности свечения. Для оценки влияния токсиканта рассчитывали остаточную активность. В качестве контрольного раствора использовали дистиллированную воду. Количественную оценку степени влияния загрязняющих веществ на активность ферментных систем выражали в виде величин IC_{20} , IC_{50} , представляющих собой концентрации анализируемых веществ, вызывающих снижение активности системы (ингибирование) на 20, и 50% соответственно.

Все измерения были выполнены не менее чем в трех повторностях. Обработку расчетов проводили в пакете прикладных программ Excel (Microsoft, США).

2.4.2.1 Измерение активности алкогольдегидрогеназы

Активность алкогольдегидрогеназы (АДГ) оценивали по изменению оптической плотности ($\Delta D/\Delta t$) раствора. Активность АДГ (А) определяли по скорости ферментативного восстановления НАД⁺ по следующей формуле $A = \Delta D/\Delta t$, где ΔD – изменение оптической плотности реакционной смеси, Δt – время измерения.

Измерение оптической плотности проводили в течение 90 секунд при длине волны 340 нм с использованием спектрофотометра Shimadzu UV-1800 (Shimadzu, Япония). Для оценки влияния токсиканта на активность АДГ рассчитывали остаточную активность АДГ (ОА) в реакционной смеси по следующей формуле $OA = (A/A_0) * 100\%$, где А – скорость восстановления НАД⁺ в анализируемом растворе, A_0 – скорость восстановления НАД⁺ в контрольном растворе.

При проведении анализа реакционная смесь содержала следующие компоненты: 1430 мкл 0,05 М калий-натрий фосфатного буфера рН 8,15; 25 мкл этилового спирта (мин. 95 %); 5 мкл раствора АДГ концентрации 0,5 мг/мл, разведенного в 0,05 М калий-натрий фосфатном буфере рН 8,15; 40 мкл 2,4 мМ раствора НАД⁺, разведенного в 0,05 М калий-натрий фосфатном буфере рН 8,15; 500 мкл дистиллированной воды (контроль) или анализируемого образца.

2.4.2.2 Измерение активности НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы

Активность НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы (Р) оценивали по изменению оптической плотности ($\Delta D/\Delta t$) раствора. Для этого в кювету спектрофотометра последовательно вносили следующие компоненты: 660 мкл 0,05 М калий-натрий фосфатного буфера рН=7,25; 40 мкл раствора НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы 0,15 ед. акт./мл; 30 мкл раствора 0,5 мМ ФМН, 120 мкл дистиллированной воды (контроль) и 150 мкл буферного раствора 0,4 мМ НАДН. Перемешивали раствор не менее 5 с и регистрировали скорость изменения оптической плотности раствора.

2.4.2.3 Измерение активности трипсина

Принцип метода определения активности трипсина (Тр) заключается в измерении скорости гидролиза БАЭЭ (N α -бензоил-L-аргинин этиловый эфир) трипсином путем регистрации изменений оптической плотности исследуемой пробы во времени. Реакционная смесь содержала следующие компоненты: 25 мкл раствора трипсина концентрации 0,85 мг/мл, разведенного 1мМ раствором HCl, 830 мкл 0,3мМ БАЭЭ (N α -бензоил-L-аргинин этиловый эфир), 158 мкл буфера по Кларку-Лабсу, рН 7,6, 42 мкл 1мМ HCl, а также 33 мкл дистиллированной воды (контроль) или анализируемого образца. Активность трипсина (А) определяли по скорости ферментативного гидролиза БАЭЭ по следующей формуле $A = \Delta D/\Delta t$,

где ΔD – изменение оптической плотности реакционной смеси, Δt – время измерения.

Измерение оптической плотности проводили в течение 5 минут при длине волны 253 нм с использованием спектрофотометра Uvikon 943 (Kontron Instruments, Италия). Для оценки влияния токсиканта на активность трипсина рассчитывали остаточную активность трипсина (ОА) в реакционной смеси по следующей формуле $ОА=(A/A_0) * 100\%$, где A – скорость гидролиза БАЭЭ трипсином в анализируемом растворе, A_0 – скорость гидролиза БАЭЭ трипсином в контрольном растворе.

2.4.2.4 Измерение активности бутирилхолинэстеразы

В настоящей работе активность бутирилхолинэстеразы (БХЭ) определяли по методу Элмана. Для этого в кювету спектрофотометра последовательно вносили следующие компоненты: 800 мкл 0,05 М калий-фосфатного буфера (рН 7,9); 200 мкл пробы (контрольного или анализируемого раствора); 30 мкл БХЭ (0,11 U); 57 мкл 0,2 мМ раствора 5-5'-дителиобис-2(нитробензойной кислоты); 57 мкл 2 мМ раствора S-BuCh-I.

Регистрацию оптической плотности раствора проводили в течение 5 минут при длине волны 412 нм на спектрофотометре UV-2600 (Shimadzu, Япония). По изменению оптической плотности вычисляли скорость гидролиза субстрата БХЭ, по полученным результатам делали вывод об относительной активности (A) БХЭ в реакционной смеси.

Для оценки влияния ингибитора на активность БХЭ рассчитывали остаточную активность БХЭ (ОА) в реакционной смеси по следующей формуле $ОА=(A/A_0) * 100\%$, где A – скорость гидролиза S-BuCh-I БХЭ в анализируемом растворе, A_0 – скорость гидролиза S-BuCh-I БХЭ в контрольном растворе

2.4.2.5 Измерение активности глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы

Принцип метода определения активности глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (Г6ФДГ) заключается в измерении скорости гидролиза субстрата реакции глюкозо-6-фосфата ферментом путем регистрации изменений оптической плотности исследуемой пробы во времени. Реакционная смесь содержала следующие компоненты: 800 мкл реакционного раствора, 158 мкл буфера, содержащего глицилглицин, рН 7,4, 10 мкл раствора глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы 0,6 У/мл, разведенного буфером, а также 33 мкл дистиллированной воды (контроль) или анализируемого образца. Реакционный раствор включал дистиллированную воду, буфер, содержащий глицилглицин, рН7,4, 60мМ раствор глюкозо-6-фосфата, 20мМ раствор β -NADP и 300мМ раствор $MgCl_2$. Активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы определяли по скорости ферментативного гидролиза глюкозо-6-фосфата по следующей формуле $A = \Delta D / \Delta t$, где ΔD – изменение оптической плотности реакционной смеси, Δt – время измерения.

Измерение оптической плотности проводили в течение 5 минут при длине волны 340 нм с использованием спектрофотометра Uvikon 943 (Kontron Instruments, Италия). Для оценки влияния токсиканта рассчитывали остаточную активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (ОА) в реакционной смеси по следующей формуле $OA = (A/A_0) * 100\%$, где A – скорость гидролиза глюкозо-6-фосфата глюкозо-6-фосфат дегидрогеназой в анализируемом растворе, A_0 – скорость гидролиза глюкозо-6-фосфата глюкозо-6-фосфат дегидрогеназой в контрольном растворе.

2.4.2.6 Измерение активности биферментной системы НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза и люцифераза

Для определения активности сопряженной системы НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза и люцифераза (Р+Л) использовали реакционную смесь

следующего состава: 300 мкл 0,05 М калий фосфатного буфера рН=6,8; 5 мкл раствора КРАБа ; 50 мкл 0,0025% раствора тетрадеканала; 100 мкл 0,4 мМ раствора НАДН; 50 мкл дистиллированной воды или раствора токсиканта; 10 мкл 0,5 мМ раствора ФМН.

Реакционную смесь помещали в кювету люминометра («PromegaGloMax» 20/20 Luminometer, USA) и измеряли интенсивность свечения в течение 300 с. В качестве анализируемого параметра выступает величина остаточного свечения, которую находили по формуле $(I / I_0) * 100\%$, где I – максимальная интенсивность свечения в присутствии анализируемого образца и I_0 – максимальная интенсивность свечения в присутствии контрольного раствора (дистиллированная вода).

2.4.2.7 Измерение активности триферментной системы лактатдегидрогеназы, НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза и люцифераза

Измерения кинетических параметров биолуминесцентной триферментной системы (ЛДГ+Р+Л) проводили в смеси следующего состава: 300 мкл 0,05 М калий-фосфатный буфера; 5 мкл раствора лактатдегидрогеназы 0,5 мг/мл; 10 мкл раствора Р+Л; 10 мкл 15 мМ раствора лактата; 100 мкл 0,5 мМ раствора НАД⁺; 50 мкл 0,0025 % раствора тетрадеканала; 10 мкл 0,5 мМ раствора ФМН в дистиллированной воде, а также 50 мкл дистиллированной воды (контроль) или анализируемого образца. Реакцию инициировали добавлением раствора ФМН. Реакционную смесь помещали в кювету люминометра («PromegaGloMax» 20/20 Luminometer, USA) и измеряли интенсивность свечения в течение 300 с. Активность триферментной биолуминесцентной системы определяли по формуле $T = (I / I_0) * 100\%$, где T- остаточная интенсивность свечения, I – максимальная интенсивность свечения системы в присутствии токсиканта, I_0 – максимальная интенсивность свечения системы в контроле (в присутствии дистиллированной воды).

2.4.2.8 Измерение активности триферментной системы алкогольдегидрогеназа, НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза и люцифераза

Измерения кинетических параметров билюминесцентной триферментной системы (АДГ+Р+Л) проводили в смеси следующего состава: 300 мкл 0,05 М калий-фосфатного буфера (рН 6,9); 5 мкл 0,5 мг/мл раствора алкогольдегидрогеназы; 5 мкл раствора Р+Л; 50 мкл 0,0025 % раствора тетрадеканая; 100 мкл 0,4 мМ раствора НАД⁺; 10 мкл 0,5 мМ раствора ФМН; 5 мкл 96% этанола; а также 50 мкл дистиллированной воды (контроль) или анализируемого образца. Реакционную смесь помещали в кювету люминометра («PromegaGloMax» 20/20 Luminometer, USA) и измеряли интенсивность свечения в течение 300 с. Активность триферментной билюминесцентной системы определяли по формуле $T = (I / I_0) * 100\%$, где T- остаточная интенсивность свечения, I – максимальная интенсивность свечения системы в присутствии токсиканта, I₀ – максимальная интенсивность свечения системы в контроле (в присутствии дистиллированной воды).

2.4.2.9 Измерение активности триферментной системы трипсин, НАДН:ФМН-оксидоредуктаза и люцифераза

Измерения кинетических параметров билюминесцентной триферментной (Тр+Р+Л) системы проводили в смеси следующего состава: 350 мкл 0,05 М калий фосфатного буфера (рН=6,9); 5 мкл раствора КРАБа; 50 мкл 0,0025% раствора тетрадеканая; 100 мкл 0,4 мМ раствора НАДН; 10 мкл 0,5 мМ М раствора ФМН; 6 мкл раствора трипсина 0,003 г/л; а также 50 мкл дистиллированной воды (контроль) или анализируемого образца. Реакционную смесь помещали в кювету люминометра («PromegaGloMax» 20/20 Luminometer, USA) и измеряли интенсивность свечения в течение 300 с. Активность триферментной билюминесцентной системы определяли по формуле $T = (I / I_0) * 100\%$, где T- остаточная интенсивность свечения, I – максимальная интенсивность свечения

системы в присутствии токсиканта, I_0 – максимальная интенсивность свечения системы в контроле (в присутствии дистиллированной воды).

2.5 Статистическая обработка результатов

Все измерения были выполнены не менее чем в трех повторностях. Обработку расчетов проводили в пакете прикладных программ Excel (Microsoft, США). Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 10 (StatSoft Inc., США) с подсчетом среднего арифметического значения (M) и стандартного отклонения (s). Различия между показателями независимых выборок оценивали по критерию Стьюдента (t), корреляционную связь - по критерию Пирсона (r). Значения считали достоверными при уровне значимости не ниже 95% ($p < 0,05$). Планки погрешностей на графиках представляют собой стандартное отклонение.

ГЛАВА 3 Чувствительность ферментативных систем различной сложности к модельным поллютантам

Биотестирование, основанное на ингибировании активности ферментов, является важным звеном в цепочке биотестов, отражающим действие токсикантов на биохимическом и молекулярном уровне. Принципы выбора ферментативных систем основаны на отслеживании полного набора функций жизнедеятельности организма по активности ключевых ферментов, в том числе основных катаболических и анаболических путей углеводов, белков и липидов; метаболизма этанола; креатинфосфата и др. и простоте проведения анализа.

Гипотеза данной части исследования состоит в том, что комплексный биотест, в состав которого будет включен оптимальный набор ферментов и ферментативных систем, будет отвечать критериям сбалансированного набора тестов (раздел 1.5, по Van Gestel, 2012). Именно набор систем, а не отдельных тестов необходим для исследования сложных систем, таких как почва. Для проверки гипотезы было проведено два эксперимента по определению состава «биологической части» комплексного ферментативного биотеста.

3.1 Определение набора ферментативных систем для включения в состав комплексного биотеста для анализа загрязнения городских почв

В первом эксперименте в качестве модельных загрязнителей выбраны вещества, загрязнение которыми можно обнаружить в черте города: а) **тяжелые металлы** (на примере ионов меди Cu^{2+} ; источники загрязнения – предприятия черной и цветной металлургии); б) **пестициды** (на примере инсектицида «Децис», д. в. дельтаметрин; применяется для личных подсобных хозяйств, на придомовых территориях, в парках и скверах и в быту для дезинсекции против вредных насекомых); в) **нефтепродукты** (на примере дизельного топлива; источники – в том числе автозаправочные станции).

Для исследования возможности включения в состав комплексного биотеста были выбраны следующие модельные системы:

1. Моноферментные реакции, катализируемые НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой (Р), алкогольдегидрогеназой (АДГ) или бутирилхолинэстеразой (БХЭ). Выбор этих ферментов связан с тем, что это ферменты принадлежат разным классам. При этом, НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза и алкогольдегидрогеназа могут быть сопряжены с бактериальной люциферазой и их активность может быть измерена по свечению. Бутирилхолинэстераза – фермент, активность которого не может быть измерена по интенсивности свечения.

2. Биферментная биолюминесцентная система: НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза (Р+Л), которая является основой для большого числа методов биолюминесцентного анализа.

3. Триферментные системы. Претендентами на включение комплексный тест стали две системы, отличающиеся механизмами взаимодействия между ферментами: НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза + алкогольдегидрогеназа (АДГ+Р+Л); трипсин + НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза (Тр+Р+Л).

В таблице 3.1 представлены значения токсикологических параметров IC_{20} для исследованных загрязнителей почвы при использовании моно-, би- и триферментных систем.

Исследование влияния сульфата меди показало, что ферментные системы по-разному реагируют на присутствие данного токсиканта в растворе, меняется не только чувствительность и характер зависимости от концентрации, но и кинетические свойства протекающих реакций. Так сульфат меди (II) ингибировал активность АДГ, причем зависимость активности от концентрации оказалась линейной (Рисунок 3.1а). В исследованном диапазоне концентраций водного раствора сульфата меди (II) система сохраняла свою стабильность, не изменялись характерные времена протекания реакций и форма спектра. Напротив, зависимость активности биферментной системы Р+Л от концентрации медного раствора оказалась логарифмической (рисунок 3.1б). Кроме того, водный раствор

сульфата меди (II) при концентрациях 0,88 мМ-0,88 мкМ/л вызывает сильное ингибирование ферментативной реакции. На кинетической кривой отсутствовали фазы «подъема» и «плато», максимум интенсивности свечения зарегистрировать не удалось. А моноферментная система БХЭ оказалась вовсе не пригодна к анализу меди вследствие специфического взаимодействия ионов меди, при котором происходит падение скорости гидролиза субстрата фермента, так как ионы тяжелых металлов изменяют форму красящего комплекса, вследствие чего создается ложное представление об ингибировании активности БХЭ (Nunes, 2011). Наибольшая чувствительность наблюдается у Р+Л системы ($IC_{20} = 0,03$ мг/кг, ПДК=3,0 мг/кг).

Таблица 3.1 - уровень чувствительности ферментативных систем к модельным токсикантам, IC_{20} , мг/кг

| | Ферментативная система | [Cu ²⁺] | «Децис» | Дизельное топливо |
|----------------|------------------------|---------------------|-------------------|--------------------|
| Моноферментные | АДГ | 0,8 | 1500 | н/ч (723) |
| | Р | 0,16 | 0,3 | н/ч (1420) |
| | БХЭ | - | н/ч (100000) | н/ч (1170) |
| Биферментная | Р+Л | 0,03 | 0,4 | ≈41 |
| Триферментные | АДГ+Р+Л | 2,2 | 0,2 | 72 |
| | Р+Л+Тр | н/ч (0,1) | н/ч (100000) | н/ч (740) |
| ПДК | | 3,0 ^б | 0,01 ^б | <1000 ^б |

Примечание. ПДК в почве согласно гигиеническим нормативам: ^аГН 2.1.7.2041-06, 2006; ^бГН 1.2.3539-18, 2018; ^вДопустимый уровень содержания нефтепродуктов в почве, ПДК не установлены

Примечание. н/ч – не чувствительно в данном диапазоне концентраций, в скобках указана максимально добавляемая концентрация

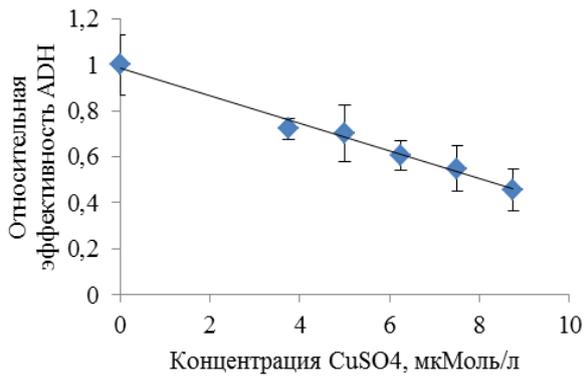


Рисунок 3.1а – Зависимость активности АДГ от концентрации водного раствора сульфата меди (II)

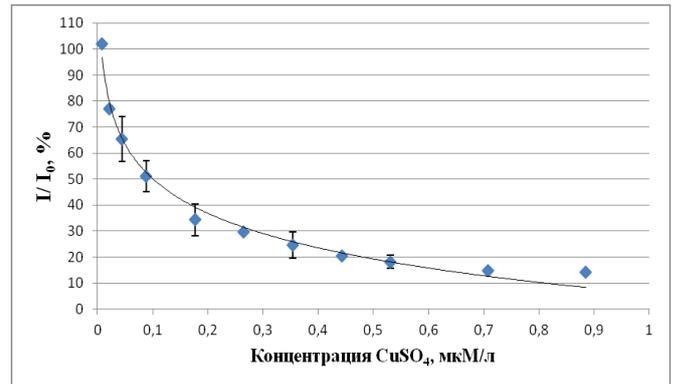


Рисунок 3.1б – Влияние водного раствора сульфата меди (II) на активность биферментной системы НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы + люциферазы

Исследование влияния пестицида «Децис» показало, что три системы (АДГ, БХЭ, Тр+Р+Л) не пригодны для анализа этого вещества. В частности, для АДГ и БХЭ ферментных систем наблюдается ингибирование ферментативной реакции не более чем на 20%. Дальнейшее увеличение концентрации водного раствора «Децис» вызвали затруднения в измерениях, связанные с высокой оптической плотностью раствора. Активность остальных ферментных систем препарат «Децис» ингибировал в большей степени. Для триферментной системы наблюдались изменения кинетических свойств. Так, добавление в реакционную смесь водного раствора пестицида вызвало первоначальное ингибирование интенсивности свечения системы в течение 15-20 с, после чего интенсивность свечения триферментной системы увеличивалась, достигая максимума. Три ферментные системы Р, Р+Л и АДГ+Р+Л, являлись чувствительными к пестициду «Децис» ($IC_{20} = 0,2-0,4$ мг/кг, ПДК=0,01 мг/кг).

Исследование влияния дизельного топлива выявило сложность при анализе этого вещества, связанную, в частности, с его гидрофобными свойствами. Так, при добавлении дизельного топлива к ферменту Р, наблюдалось сильное увеличение активности (рисунок 3.2), аналогичные результаты были получены для других моноферментных систем. Данный факт может объясняться

следующими эффектами: а) гидрофобное свойство раствора, не позволяющее раствориться ему в реакционной смеси, вследствие чего компоненты реакции находясь в меньшем объеме, сильнее взаимодействуют друг с другом (для Р системы) или препятствующее действию дизельного топлива на ферменты (для БХЭ); б) более специфическое взаимодействие растворимой фракции дизельного топлива с ферментом и субстратом (для Р системы); в) эффект замедления окисления восстановленного НАД⁺ вследствие медленной растворимости кислорода, вызванного расположением раствора дизельного топлива на поверхности реакционной смеси (для АДГ системы).

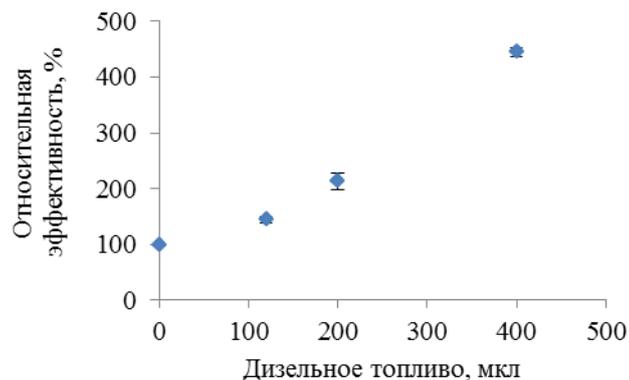


Рисунок 3.2 – Изменение активности НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы от концентрации дизельного топлива

Наибольшей чувствительностью к дизельному топливу обладает триферментная система АДГ+Р+Л. При добавлении в реакционную смесь 50 мкл дизельного топлива наблюдали ингибирование интенсивности свечения системы АДГ+Р+Л в течение 20-40 с и последующее увеличение интенсивности свечения до достижения максимального значения. Содержание дизельного топлива в реакционной смеси в количестве более 50 мкл приводит к быстрому снижению интенсивности свечения триферментной системы без выраженного максимума (рисунок 3.3). Изменение последовательности добавления компонентов системы в измерительную кювету на результаты исследований не влияло. Таким образом, триферментная система АДГ+Р+Л оказалась самой чувствительной к дизельному топливу ($IC_{20} = 72$ мг/кг, ПДК не установлено, допустимо до 1000 мг/кг)

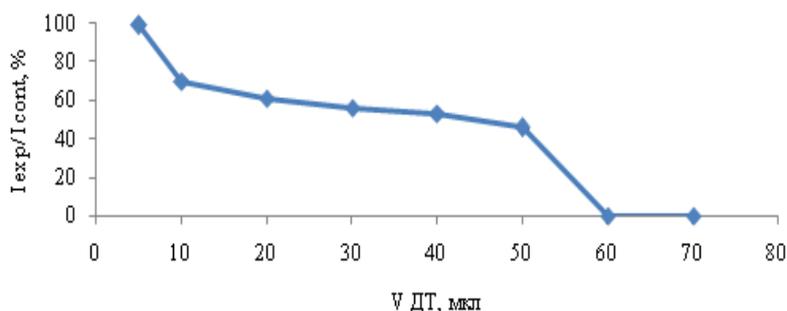


Рисунок 3.3 – Изменение остаточной интенсивности свечения триферментной системы АДГ+Р+Л при различных объемах дизельного топлива

Показано, что для триферментной системы Тр+Р+Л не подходит выбранный способ регистрации активности. Ограничения накладываются «нижестоящей» биферментной системой, на которой основан метод. Например, водный раствор сульфата меди (II) с концентрацией до 0,01 мМ/л вызывает сильное ингибирование интенсивности свечения биферментной системы, поэтому для исследования триферментной системы использовали водный раствор сульфата меди (II) в малых концентрациях - 1 и 2,5 мкМ/л. При внесении в реакционную смесь данных концентраций сульфата меди активность триферментной системы не изменялась, поэтому рассчитать токсикологические параметры для трипсина не удалось вследствие ограничения билюминесцентного метода анализа активности трипсина. То же наблюдалось для пестицида «Децис» и дизельного топлива.

Принцип сопряжения ферментов можно также использовать для установления механизмов действия токсикантов на биохимическую (метаболическую) цепочку. Рассмотрим пример цепочки из трех ферментов – АДГ+Р+Л. Для выявления механизмов необходимо изучить влияние токсикантов на: моноферментные системы АДГ и Р, биферментную систему Р+Л и триферментную систему АДГ+Р+Л. Ионы меди ингибируют все ферментные системы. При этом наибольшая чувствительность наблюдается у Р+Л ферментной системы, удлинение цепи, вероятно, стабилизирует работу ферментов. Ингибирующий эффект препарата «Децис» наблюдается также, начиная с

моноферментного уровня, но только для Р системы, АДГ система к данному веществу не чувствительна. Вследствие этого можно заключить, что фермент алкогольдегидрогеназа не является мишенью в триферментной системе и эффект обусловлен влиянием пестицида на фермент НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазу, а увеличение длины цепи в данном случае не целесообразно.

Другой эффект отмечается при исследовании влияния дизельного топлива. Ингибирующий эффект наблюдается только начиная с уровня биферментной системы, но зависимости от концентрации не выявлено. При этом при увеличении длины цепи до трех сопряженных ферментов, чувствительность увеличивается и появляется зависимость степени ингибирования от объема дизельного топлива, добавляемого в измерительную кювету.

3.2 Определение набора ферментативных систем для включения в состав комплексного биотеста для анализа загрязнения сельскохозяйственных почв

Во втором эксперименте применялись преимущественно сельскохозяйственные загрязнители: а) **тяжелые металлы** (на примере ионов меди Cu^{2+} ; медь входит в состав некоторых пестицидов и стимуляторов роста (Пат. РФ 2171579; Пат. РФ 2229807)), б) **фосфорорганические пестициды** (на примере малатиона (инсектицид и акарицид широкого спектра действия) и диазинона (инсектицид контактного и кишечного действия)), в) **хлорорганические пестициды** (на примере γ -изомера гексахлорциклогексана (γ -ГХЦГ); инсектицид комплексного действия, запрещен к производству), г) **наноматериалы** (на примере наночастиц TiO_2 ; используется при производстве красителей, косметики, продуктов питания и др., условно канцерогенен для человека; может применяться в качестве стимулятора роста растений (Owolade, Ogunletì, 2008)).

Для исследования возможности включения в состав комплексного биотеста были выбраны следующие модельные системы:

1) моноферментные реакции: катализируемая алкогольдегидрогеназой (АДГ), катализируемая НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой (Р), катализируемая трипсином (Тр), катализируемая бутирилхолинэстеразой (БХЭ), катализируемая глюкозо-6-фосфат дегидрогеназой (Г6ФДГ);

2) биферментная система НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза (Р+Л);

3) триферментные системы: лактатдегидрогеназа + НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза и люцифераза (ЛДГ+Р+Л).

В таблице 3.2 представлены значения токсикологических параметров IC_{20} для исследованных загрязнителей почвы при использовании моно-, би- и триферментных систем.

Таблица 3.2 – уровень чувствительности ферментативных систем к модельным токсикантам, IC_{20} , мг/кг

| | Ферментативная система | Малатион | Диазинон | γ-ГХЦГ | TiO ₂ | [Cu ²⁺] |
|----------------|------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---------------------|
| Моноферментные | АДГ | н/ч (11000) | н/ч (3750) | н/ч (625) | 1000 | 0,8 |
| | Р | 4400 | 25 | н/ч (1250) | 400 | 0,16 |
| | БХЭ | 0,005 | 0,7 | 55 | 1,75 | - |
| | Тр | н/ч (14500) | н/ч (500) | н/ч (400) | н/ч (150) | н/ч (110) |
| | Г6ФД | 1450 | н/ч (1000) | - | н/ч (65) | 110 |
| Биферментная | Р+Л | 39 | 1,35 | н/ч (220) | н/ч (350) | 0,03 |
| Триферментная | ЛДГ+Р+Л | 2 | 0,35 | н/ч (220) | н/ч (350) | 0,002 |
| ПДК | | 2,0 ^а | 0,1 ^а | 0,1 ^а | - | 3,0 ^б |

Примечание. ПДК в почве согласно гигиеническим нормативам: ^аГН 1.2.3539-18, 2018; ^бГН 2.1.7.2041-06, 2006.

Примечание. н/ч – не чувствительно в данном диапазоне концентраций, в скобках указана максимально добавляемая концентрация

Исследование влияния малатиона и диазинона на ферментные системы показало, что активности моноферментных систем, катализируемых АДГ и Тр, не изменяются в присутствии различных концентраций данных пестицидов. На рисунках 3.4а и 3.4б показаны графики зависимости остаточной активности Тр от концентрации пестицидов. В случае добавления в реакцию высокую концентрацию пестицидов наблюдаются ложные эффекты стимулирующего действия поллютантов на активность фермента, объясняющиеся высоким уровнем поглощения пестицидов на используемой в анализе длине волны регистрации сигнала. При уменьшении содержания пестицидов в реакционной смеси существенного отличия активности трипсина от контрольных значений не наблюдалось.

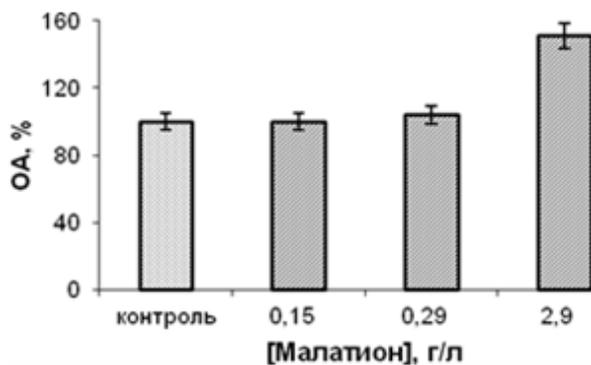


Рисунок 3.4а – Зависимость остаточной активности трипсина от концентрации малатиона

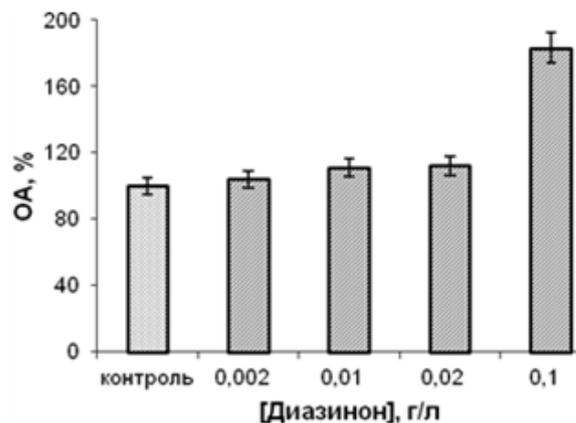


Рисунок 3.4б – Зависимость остаточной активности трипсина от концентрации диазинона

При использовании в качестве тест-системы моноферментных реакций, катализируемых Р и ГбФД были выявлены ограничения используемых аналитических методов для установления ингибирующего воздействия малатиона и диазинона на активности ферментов. Например, для анализа степени воздействия малатиона на активность фермента Р концентрация действующего вещества не должна превышать 2,64 г/л. В противном случае наблюдается высокая оптическая плотность растворов ($D=1,7-1,8$), что может привести к

искажению результатов. В свою очередь, для ГбФД было показано, что диазинон оказывает ингибирующий эффект только в случае добавления в реакционную смесь концентраций, существенно превышающих ПДК для данного вещества, которая составляет 0,05 мг/л.

Моноферментная система, катализируемая БХЭ, биферментная Р + Л и триферментная ЛДГ + Р + Л показали чувствительность к воздействию водных растворов пестицидов. Концентрация малатиона, вызывающая ингибирование работы фермента БХЭ на 20%, была на два порядка ниже транслокационного ПДК данного вещества в почве ($IC_{20} = 0,005$ мг/кг, ПДК=2,0 мг/кг). Самой чувствительной системой к диазину является триферментная система ЛДГ+ Р + Л ($IC_{20} = 0,35$ мг/кг, ПДК=0,1 мг/кг).

Исследование влияния ГХЦГ на активности использованных в работе ферментативных систем показало, что только БХЭ имеет чувствительность к данному пестициду. В отличие от тяжелых металлов и других поллютантов, принципы действия пестицидов хорошо изучены, так как они разрабатываются под конкретные задачи. Известно, что механизм действия фосфорорганических пестицидов, в частности малатиона и диазинона, основан на ингибировании активности холинэстеразы крови (Abdollahi et al., 2004). В частности, диизопропилфторфосфат, необратимо ингибирует ряд ферментов, в числе которых ацетилхолинэстераза, а также трипсин, хемотрипсин, эластаза, фосфоглюкомутаза и коконаза. При этом малатион, разработанный на основе диизопропилфторфосфата, избирательно воздействует только на холинэстеразу насекомых и неактивен для людей и животных (Ленинджер, 1985). Чувствительность бутирилхолинэстеразы к малатиону можно объяснить необратимым ингибированием фермента вследствие образования в его активном центре ковалентной связи «фосфорил-серин» (Лоншакова-Мукина и др., 2021). Поэтому ожидалось проявление ингибирующего действия малатиона и диазинона на моноферментные системы, катализируемые трипсином и бутирилхолинэстеразой. Однако, использованная в работе методика определения активности трипсина не позволила определить его чувствительность к данным

веществамисследованным пестицидам Механизм действия γ -ГХЦГ связан с конкурированием его с инозитолом (витаминоподобное вещество) в клетках за участие в биохимических процессах (Rajalakshmi, 1964), и действием на рецепторы гамма-аминомасляной кислоты и ацетилхолина ((Ca²⁺-Mg²⁺)-АТФаза) в мембране (Lee et al., 1991), однако бутирилхолинэстераза оказалась также чувствительна и к этому пестициду. Система БХЭ была единственной из исследованных, активность которой ингибировалась γ -ГХЦГ (IC₂₀ = 55 мг/кг, ПДК=0,1 мг/кг).

При исследовании действия на активности ферментативных систем наночастиц диоксида титана размером 100-190 нм было показано, что би- три- и моноферментные системы, за исключением БХЭ системы, обладают малой чувствительностью к TiO₂ (Приложение В, Таблица В.2) и ограничениями. Так, оказалось невозможным оценить степень действия наночастиц на активность АДГ. При высокой концентрации наночастиц (0,2 г/л) суспензия имеет слишком высокую оптическую плотность, что препятствует проведению анализа. Для достижения приемлемой для проведения анализа оптической плотности суспензию наночастиц концентрации 0,2 г/л необходимо было развести в 4 раза. Однако в этом случае ингибирующего эффекта TiO₂ на активность АДГ не наблюдалось.

Исследование действия водных растворов хлорида меди (II) показало ограничения и избирательное действие данного токсиканта на активности используемых ферментативных систем. В частности, использование БХЭ системы является непригодными для установления токсического эффекта хлорида меди (II), так как ионы тяжелых металлов изменяют форму красящего комплекса, вследствие чего создается ложное представление об ингибировании активности БХЭ (Nunes, 2011). Увеличение чувствительности к водным растворам хлорида меди (II) наблюдалось в следующей последовательности: АДГ <P <(P + Л) <(P + Л + ЛДГ) ферментные системы.

Как и в предыдущем эксперименте, можно проследить уровни влияния поллютантов на цепочку ферментов на примере триферментной системы

ЛДГ+Р+Л и её подуровней – биферментная система Р+Л и моноферментная система Р. Для пестицидов малатион и диазинон, а также для хлорида меди (II) было показано, что происходит увеличение чувствительности в ряду от моно- к триферментной системе на три порядка для пестицидов и на два порядка для ионов меди (Сутормин и др., 2018).

3.3 Выводы по главе

Таким образом, в результате исследований были определены ограничения при использовании ферментативных методов анализа и оптимальные составы комплексных тестов.

Так как активность моноферментных систем регистрируется спектрофотометрическим методом, то необходимо учитывать оптическую плотность исследуемых растворов. Поэтому, верхний предел концентраций пестицидов и наночастиц, добавляемых в реакционную смесь, был лимитирован уровнем ≈ 2 г/л. Для триферментной системы наблюдались изменения кинетических свойств, при добавлении в реакционную смесь водного раствора пестицидов. Выявлено ингибирование интенсивности свечения системы в течение 15-20 секунд с начала измерения с последующим ростом до фазы плато и достижением максимума. При добавлении в реакционную смесь дизельного топлива наблюдались различные эффекты, которые могут быть объяснены: а) гидрофобным свойством раствора, не позволяющим раствориться ему в реакционной смеси, вследствие чего компоненты реакции, находясь в меньшем объеме, сильнее взаимодействуют друг с другом (для Р системы) или препятствующим действию дизельного топлива на ферменты (для БХЭ); б) более специфическое взаимодействие растворимой фракции дизельного топлива с ферментом и субстратом (для Р системы); в) эффект замедления окисления восстановленного НАД⁺ вследствие медленной растворимости кислорода, вызванного расположением раствора дизельного топлива на поверхности реакционной смеси (для АДГ системы). Кроме того, моноферментная система

БХЭ не подходит для определения ионов меди, так как ионы тяжелых металлов изменяют форму красящего комплекса, вследствие чего создается ложное представление об ингибировании активности БХЭ. Для системы Р+Л+Тр выбранный метод регистрации активности трипсина, как ключевого фермента, не подходил под поставленные задачи.

Показано также, что чувствительность тестовой системы можно существенно повысить, если производить подбор ферментных систем исходя из предположений о возможных поллютантах, находящихся в почвах. Кроме того, некоторые ферменты могут быть индикаторами наличия определенных поллютантов. А применение триферментной системы позволяет повысить чувствительность теста. Таким образом, для обеспечения обнаружения загрязняющих почву веществ на уровне ПДК в комплексный ферментативный биотест для оценки загрязнения городских почв рекомендуется включить следующие ферментативные системы: моноферментную, катализируемую НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой (Р), биферментную систему НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза (Р+Л) и триферментную систему, например, алкогольдегидрогеназа + НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза и люцифераза (АДГ+Р+Л). А в комплексный ферментативный биотест для оценки загрязнения сельскохозяйственных почв рекомендуется включить следующие ферментативные системы: моноферментную, катализируемую бутирилхолинэстеразой (БХЭ), биферментную систему НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза (Р+Л) и триферментную систему, например, лактатдегидрогеназа + НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза (ЛДГ+Р+Л).

ГЛАВА 4 Закономерности влияния водных вытяжек из модельных почвенных смесей и природных почв и грунтов на моно-, би- и триферментные системы в присутствии модельных поллютантов и без них

4.1 Оценка влияния оптических и кислотных свойств водных вытяжек из почв

Особенностью использования в качестве методов биотестирования ферментов является учет влияния оптических (поглощение или рассеяние) и кислотных свойств анализируемых растворов, в том числе водных вытяжек из почв. Если для моноферментных реакций необходимо учитывать только значение оптической плотности, то для биолюминесцентных реакций также важно проверить возможное перекрывание спектров оптической плотности и биолюминесценции в диапазоне 400-600 нм.

Были измерены спектры поглощения водных экстрактов из почв, отобранных в районе объекта археологического наследия «Саяно-Пограничное б», горная система Западный Саян, Ермаковский район Красноярского края (см. 2.1.4, разрезы Р.1-14, Р.2-14, Р.5-14 и Р.6-14). Спектры сканировали с помощью спектрофотометра Cary 5000i (Agilent Technologies) при следующих условиях: диапазон 300-700 нм, шаг 1 нм, длина оптического пути 1 см, комнатная температура.

Было получено, что в изучаемой спектральной области поглощение экстрактов представляет собой монотонно спадающую кривую, без отдельно выраженных полос поглощения (рисунок 4.1).

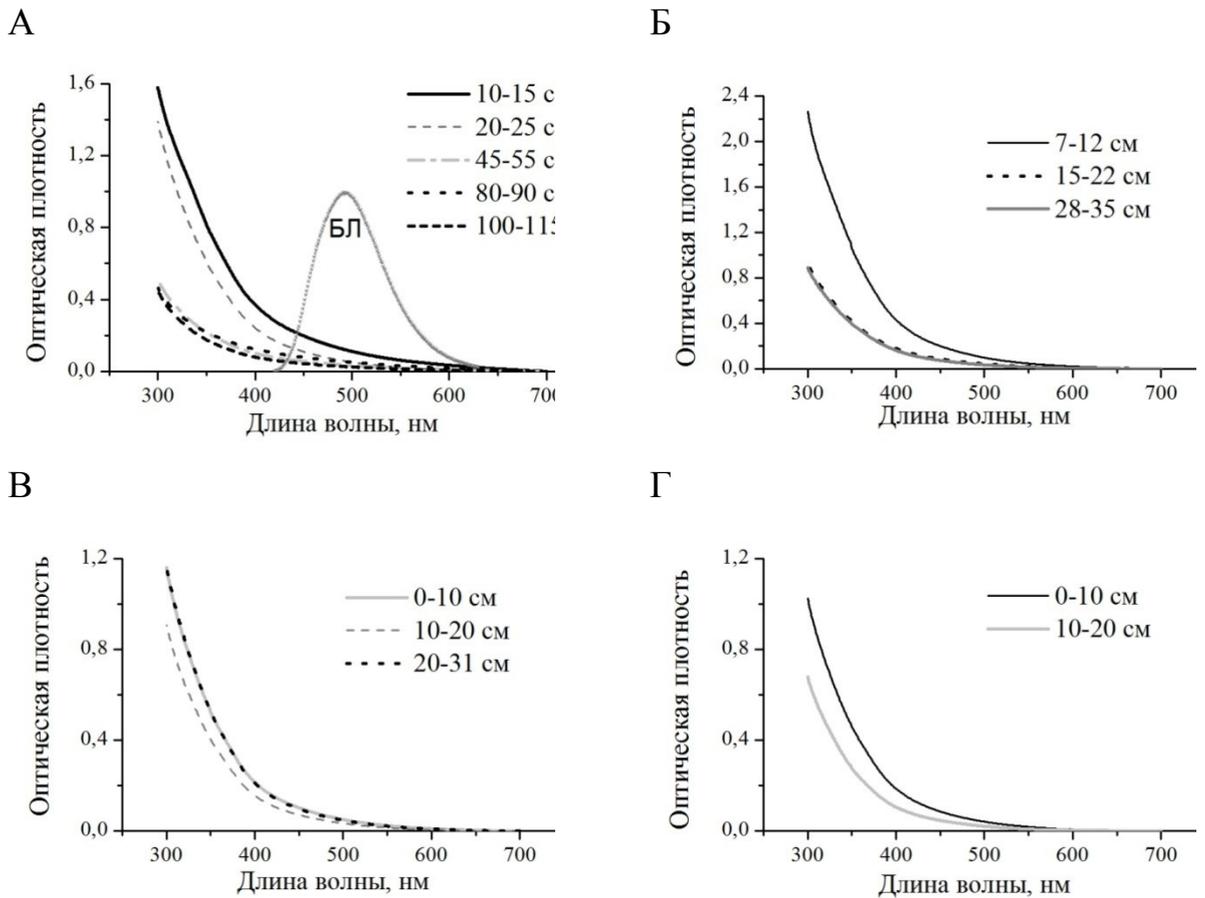


Рисунок 4.1 – Спектры поглощения водных экстрактов из образцов почв Р.1-14 (А), Р.2-14 (Б), Р.5-14 (В) и Р.6-14 (Г) при разной глубине взятия пробы. На (А) показано перекрывание поглощения со спектром бактериальной биолюминесценции, БЛ.

Для всех разрезов экстракты верхних горизонтов отличаются более высоким значением оптической плотности, что вероятно связано с высоким содержанием подвижного гумуса в данных образцах. Для сравнения спектров поглощения почвенных экстрактов используют значение оптической плотности при фиксированной (произвольной) длине волны и отношение оптических плотностей при двух длинах волн. В таблице 4.1 приведены эти значения для исследованных экстрактов (D_{300} и D_{300}/D_{400}). Получено, что крутизна спектра (D_{300}/D_{400}), в отличие от интенсивности поглощения (D_{300}), слабо зависит от глубины взятия образца и в большинстве образцов принимает значения из диапазона 5-6.

Таблица 4.1 – Характеристика спектров поглощения водных экстрактов из почв

| № | Глубина взятия пробы, см | D_{300}^* | D_{300}/D_{400}^{**} |
|--------|--------------------------|-------------|------------------------|
| P.1-14 | | | |
| 1 | 10–15 | 1,58 | 4,27 |
| 2 | 20–25 | 1,39 | 5,75 |
| 3 | 45–55 | 0,51 | 5,12 |
| 4 | 80–90 | 0,47 | 3,79 |
| 5 | 100–115 | 0,45 | 5,73 |
| P.2-14 | | | |
| 6 | 7–12 | 2,27 | 5,26 |
| 7 | 15–22 | 0,93 | 5,21 |
| 8 | 28–35 | 0,89 | 5,50 |
| P.5-14 | | | |
| 9 | 0–10 | 1,16 | 5,42 |
| 10 | 10–20 | 0,91 | 5,81 |
| 11 | 20–31 | 1,17 | 5,56 |
| P.6-14 | | | |
| 12 | 0–10 | 1,03 | 5,49 |
| 13 | 10–20 | 0,68 | 6,45 |

*Оптическая плотность при 300 нм

**Отношение оптических плотностей при 300 и 400 нм

Для экстрактов почв P.1-14, P.2-14, P.5-14 и P.6-14 были получены коэффициенты коррекции (по Алешина, 2010):

$$k = \frac{1}{\sum_{i=1}^n \frac{g(\lambda_i)}{D_i(\lambda_i) \left(\frac{L}{l}\right)} \left[1 - \exp\left(-D_i(\lambda_i) \left(\frac{L}{l}\right)\right)\right]}$$

где $g(\lambda_i)$ – доля интенсивности биолюминесценции на длине волны λ_i от суммарной интенсивности биолюминесценции при оптическом пути L ; $D(\lambda_i)$ – значение поглощения раствора наноматериала на длине волны λ_i при оптическом пути l .

Было установлено, что поглощение данных образцов приводит к ослаблению биолюминесцентного сигнала не более чем на 6%. С учетом того, что по методике биотестирования происходит разбавление данных образцов еще в 5 раз, можно утверждать, что эффект фильтра не вносит существенных искажений при анализе эталонных почвенных экстрактов. Поэтому был сделан вывод об

отсутствии необходимости расчета коэффициентов коррекции при каждом измерении биолюминесцентного сигнала.

Аналогичные результаты были получены при измерении оптических свойств экстрактов из почв, отобранных на территории г. Красноярска (Байгина и др., 2017). Измеряли оптическую плотность растворов в диапазоне 420-630 нм, учитывали абсорбцию на длине волны 420 нм. Коэффициент корректировки на мутность раствора для всех водных вытяжек также не превышал 6%.

Не смотря на отсутствие необходимости контролировать эффект фильтра, исследование спектров поглощения и других оптических характеристик экстрактов почв представляется перспективным в качестве альтернативного метода оценки качественного и количественного состава экстрагированных веществ.

Другим важным свойством почвы является показатель её кислотности. Традиционно выделяют актуальную и потенциальную кислотность (разделяется на обменную и гидролитическую). Актуальную кислотность измеряют при взаимодействии с почвой дистиллированной воды (pH_{H_2O}), а обменную – с соевым раствором KCl ($pH_{сол}$). Обменная кислотность всегда выше актуальной (Апарин, 2012). От величины pH зависит растворимость металлов (Высоцкий, Степаненко, 2016), подвижность химических веществ и выход их в почвенный раствор. Поэтому при исследовании для максимального приближения к естественным условиям необходимо сохранять собственную кислотность почвы.

Однако особенностью ферментных биотестов является наличие pH-оптимума работы фермента. Поэтому важным этапом эксперимента является проверка возможности использования экстрактов из почв с неизменным искусственно значением pH.

Было показано (Байгина и др., 2017), что кислотные свойства почвы не влияют на процесс протекания реакции и конечный результат, в частности из-за особенности тест-системы (наличие буферного раствора, соотношение реакционной смеси и объема добавляемого экстракта, отсутствие значимой корреляции).

4.2 Оценка влияния водных вытяжек из условно чистых почв на активность моно-, би- и триферментных систем

Многие ферментативные системы, в том числе биолюминесцентные, ранее не использовались для определения загрязнения почв, поэтому необходимо было проверить, будут ли водные вытяжки из условно чистых почв влиять на активность протекания ферментативных реакций.

Оценена чувствительность моно-, би- и триферментных систем к водным вытяжкам из пяти образцов почв. Для большинства исследованных в работе моноферментных систем водные вытяжки из почвы не приводят к изменениям в активности более чем на 20% относительно контрольного образца (рисунок 4.2).

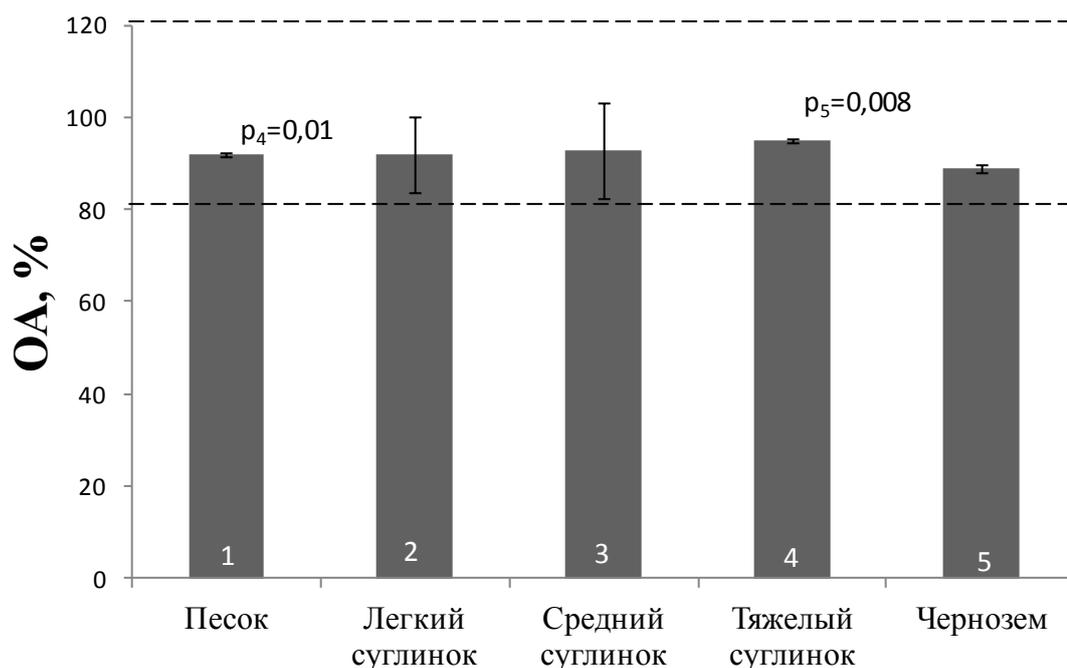


Рисунок 4.2 – Зависимость остаточной активности глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы от типа водной вытяжки из почвы. Горизонтальными линиями обозначен диапазон допустимого изменения активности ферментов относительно контроля

Однако, для моноферментной системы Р, водная вытяжка из чернозема ингибирует активность фермента на 35% (рисунок 4.3).

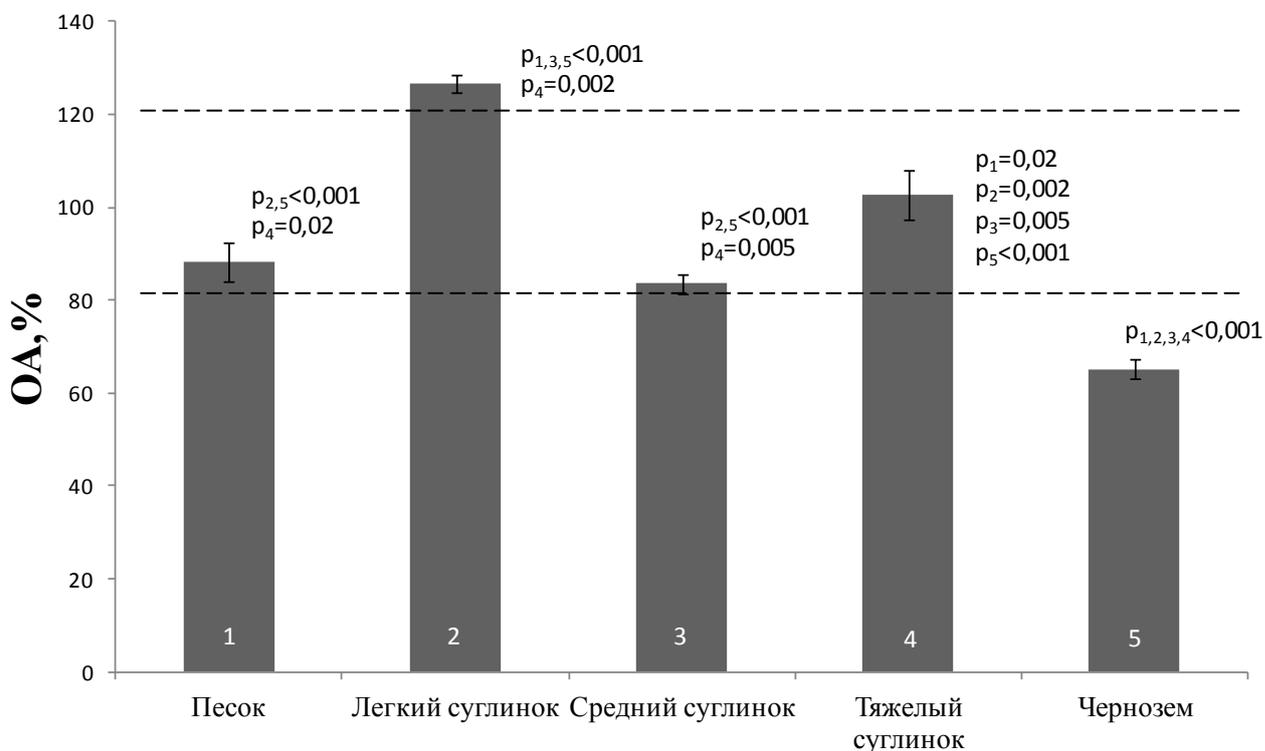


Рисунок 4.3 – Зависимость остаточной активности НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы от типа водной вытяжки из почвы

Начиная с уровня биферментной системы Р+Л, наблюдается значительная чувствительность к различным водным вытяжкам из почв (рисунок 4.4). При этом, степень ингибирования активности фермента зависит как от гранулометрического состава, так и от содержания гумуса в образцах. Известно, что гуминовые вещества увеличивают скорость расходования эндогенного восстановителя реакции НАДН, за счёт чего снижается интенсивность биолюминесценции, показывая ложное загрязнение (Тарасова, 2012; Tarasova et al., 2011, 2012).

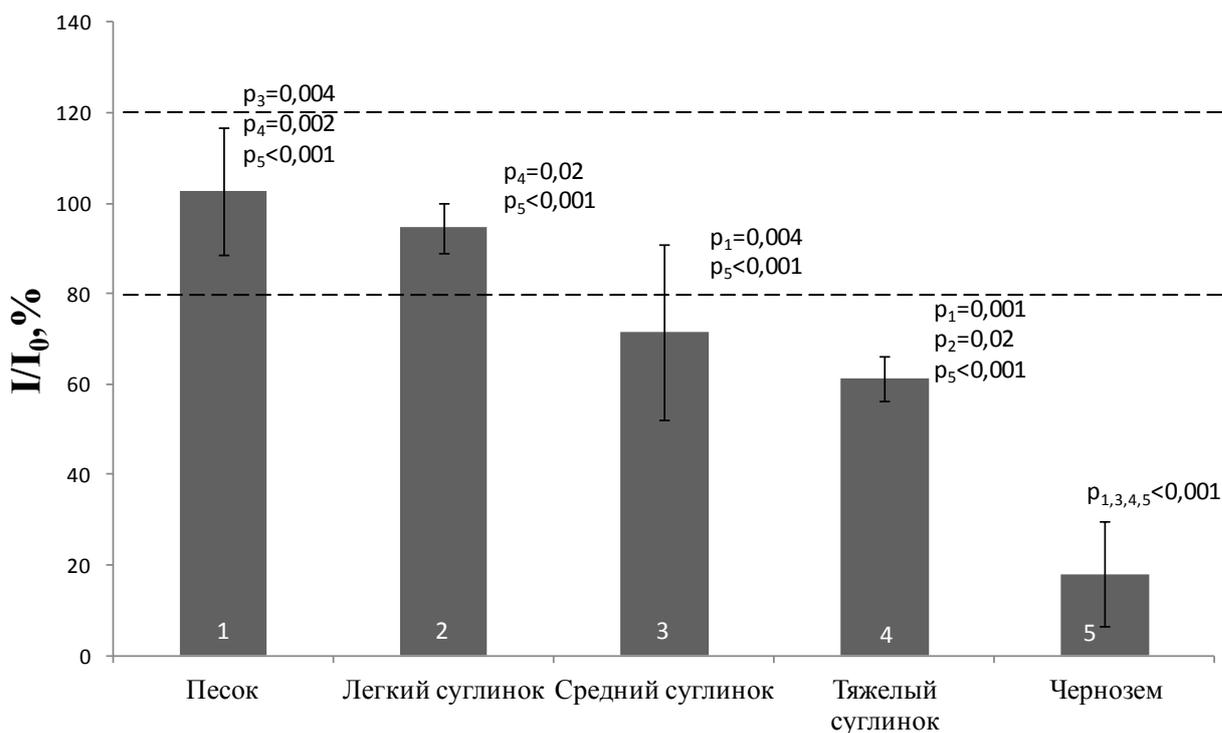


Рисунок 4.4 – Зависимость остаточной активности биферментной системы NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы + люциферазы от типа водной вытяжки из почвы. Горизонтальными линиями обозначен диапазон допустимого изменения активности ферментов относительно контроля

Таким образом, для достоверной интерпретации результатов биотестирования необходимо использовать почвенные стандарты сравнения, что также подтверждается результатами, представленными в таблице 4.2. Измерение чувствительности трех ферментных систем к поллютантам в присутствии водных вытяжек из почв были выполнены относительно чистых почвенных вытяжек (в отсутствие поллютантов).

Установлено, что при добавлении поллютантов в различные водные вытяжки из почв, в большинстве случаев происходит снижение их ингибирующего действия на ферментные системы. Особенно выражен данный эффект для ионов меди, чувствительность к ним падает на три и один порядок при тестировании этого поллютанта, добавленного в водную вытяжку из чернозема с помощью моно- и биферментной систем соответственно, а также на один порядок

при его тестировании в водной вытяжке из среднего суглинка с помощью системы ЛДГ+Р+Л. Данный факт связан с тем, что гуминовые вещества с одной стороны являются самостоятельным ингибитором биолюминесцентной реакции, с другой стороны выступают в качестве ремедиатора почвы, т.е. инактивируют ионы меди (Портнова, Вольхин, 2008; Tarasova et al., 2012; Степанов, Якименко, 2016). Данный факт нельзя обнаружить без сравнения с чистым, фоновым образцом.

Таблица 4.2 – Параметр IC₂₀ (мг/кг) для исследованных загрязнителей при использовании ферментных тест-систем Р, Р+Л, ЛДГ+Р+Д (Сутормин и др., 2018)

| Образец | Малатион | | | Диазинон | | | Cu ²⁺ | | |
|-------------------|------------------|-------------|-------------|------------------|-------------|-------------|------------------|-------------|-------------|
| | Р | Р+Л | ЛДГ+ Р+Л | Р | Р+Л | ЛДГ+ Р+Л | Р | Р+Л | ЛДГ+ Р+Л |
| дН ₂ О | 4400 | 39 | 2 | 350 | 1,3 | 0,35 | 0,16 | 0,03 | 0,002 |
| Песок | - | 30 | 1 | 1500 | 1,15 | 0,15 | 169,8 | 0,21 | 0,004 |
| Легкий суглинок | - | 600 | 20 | 300 | 9 | 3 | 6,35 | 0,12 | 0,004 |
| Средний суглинок | - | 130 | 20 | 1800 | 2,4 | 0,5 | 17 | 0,03 | 0,16 |
| Тяжелый суглинок | - | 18,5 | 8 | 300 | 16,5 | 0,15 | 21,25 | 0,55 | 0,04 |
| Чернозем | - | 39 | 1 | 3000 | 1,7 | 0,3 | 255 | 0,7 | 0,004 5 |
| ПДК | 2,0 ^a | | | 0,1 ^a | | | 3,0 ^b | | |

Примечание. ПДК в почве согласно гигиеническим нормативам: ^aГН 1.2.3539-18, 2018; ^bГН 2.1.7.2041-06, 2006.

Может наблюдаться также и обратный эффект, особенно выраженный при исследовании влияния пестицидов. Так, чувствительность ферментных систем к поллютантам может повышаться в присутствии водных вытяжек из почв (таблица 4.2, подчеркнута). В большинстве случаев таким эффектом обладает водная вытяжка из песка. Известно, что биодоступность и степень деградации пестицидов в почвах зависит от её свойств. Для малатиона было показано, что деградация его в почве происходит по химическому механизму, напрямую связанному с адсорбцией. Также разложение малатиона на продукты увеличивается в ряду от кислых до сильнощелочных почв (Konrad et al., 1969).

Кроме того, особенностью ферментного метода является анализ действия веществ в микрообъемах. Соли меди хорошо распадаются на ионы в воде, вследствие чего раствор становится гомогенным. Однако растворы пестицидов представляют собой суспензию, контролировать концентрацию действующего вещества, находящегося в забираемом с помощью микродозатора анализируемом объеме, становится затруднительным. Возможно, при взаимодействии малатиона и диазинона с водными вытяжками из некоторых почв повышается его биодоступность относительно водного раствора.

Для решения вышеперечисленных вопросов был составлен банк модельных почвенных грунтов, в широком диапазоне различающийся по гранулометрическому составу и содержанию гумуса (рисунок 4.5).



Схема опыта 1

1. Супесь.
2. Легкий суглинок.
3. Средний суглинок.
4. Тяжелый суглинок.
5. Исходная высокогумусная почва (содержание гумуса 9,5-10%).

Схема опыта 2

1. Супесь + почва (1% гумуса).
2. Супесь + почва (3% гумуса).
3. Супесь + почва (5% гумуса).
4. Легкий суглинок + почва (1% гумуса).
5. Легкий суглинок + почва (3% гумуса).
6. Легкий суглинок + почва (5% гумуса).
7. Средний суглинок + почва (1% гумуса).
8. Средний суглинок + почва (3% гумуса).
9. Средний суглинок + почва (5% гумуса).
10. Тяжелый суглинок + почва (1% гумуса).
11. Тяжелый суглинок + почва (3% гумуса).
12. Тяжелый суглинок + почва (5% гумуса).

Рисунок 4.5 – Внешний вид модельного опыта №1, описания схем модельных опытов №1 и №2

Образцы почвенных грунтов имели разный гранулометрический состав, pH_{KCl} и сильно отличались по содержанию гумуса, которое изменялось в широких пределах, от 0,37 до 8,50%, с переходом через 1, 3, 5%. Содержание физической

глины колебалось от 8,6 до 47,5%, а разновидности были представлены связным песком, супесью, легким, средним и тяжелым суглинками. рН солевой суспензии также было различным, от 5,45 до 8,00 ед., что указывает на слабокислую, близкую к нейтральной, нейтральную, слабощелочную и щелочную реакцию среды. Значение оптической плотности D_{250} (оптическая плотность при длине волны 250 нм, мера общего количества растворенного вещества) варьирует в диапазоне от 0,16 до 1,59.

Такие модельные почвы могут являться эталонами сравнения почв Красноярского края, необходимы для учета влияния чистой почвы на биотест и могут быть использованы также для оценки биодоступности поллютантов.

4.3 Выводы по главе

Оценено влияние физико-химических свойств почв и почвенных экстрактов. Оптические свойства растворов и кислотные свойства почв не оказывают существенное влияние на результат биотестирования. Спектры поглощения водных экстрактов из почв не перекрывают спектры биолюминесценции, а коэффициент корректировки на мутность раствора для всех исследованных водных вытяжек из почв не превышает 6%. В связи с особенностями биолюминесцентной тест-системы (наличие буферного раствора, соотношения реакционной смеси и объема добавляемой пробы) при биотестировании можно сохранять естественные значения актуальной кислотности почв.

По результатам исследования влияния водных вытяжек из почв на ферментные системы различной сложности показано, что они не оказывают существенного влияния на большинство исследованных моноферментных систем, за исключением системы, катализируемой НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой. Начиная с уровня биферментной системы Р+Л, наблюдается значительная чувствительность к различным водным вытяжкам из почв.

Установлено также, что при добавлении поллютантов в различные водные вытяжки из почв, в большинстве случаев происходит снижение их ингибирующего действия на ферментные системы. Однако, может наблюдаться и обратный эффект, особо выраженный при добавлении пестицидов.

Таким образом, можно заключить, что при проведении ферментативного биотестирования необходимо использовать в качестве сравнения водные вытяжки из схожих по составу и свойствам незагрязненных почв. А предложенный в данной работе банк модельных почвенных грунтов будет способствовать решению проблемы учета влияния состава и свойств почв, поэтому он также включен в состав комплексного ферментативного биотеста.

ГЛАВА 5 Разработка программного продукта, реализующего комплексный ферментативный тест для анализа загрязнения почв.

Апробация ферментативного биотеста

5.1 Разработка программного обеспечения

Трудности, возникающие при анализе сред сложного состава, связаны с большим числом параметров и данных, которые необходимо анализировать и интерпретировать. При использовании в качестве аналитического метода комплексного биотеста (или сочетание биотеста с химическими методами) сложность интерпретации возрастает.

В литературе описано несколько различных подходов к формализации данных результатов оценки состояния почв. Например, получил распространение индекс ТВІ (Toxicity test Battery integrated Index), который определяется как среднее от всех откликов биотестов с различными весовыми коэффициентами (Manzo et al., 2014; Prato et al., 2015). В случае определения токсикологических параметров по степени ингибирования токсикантами предлагают использовать экологические баллы (*Ecoscores*) (Lors et al., 2011). Так называемый метод “Триад” учитывает данные химических, биоиндикационных и токсикологических исследований, определяя в итоге интегральный индекс состояния. Индикаторами являются химические вещества, значение тест-функции биотеста и тест-функции биоиндикатора в пробе (Terekhova et al., 2014). Существенным ограничением перечисленных выше подходов является то, что для расчета почвенных индексов необходимо знать концентрацию токсикантов в почвах, что не всегда возможно определить, тем более, если используется не специфический, а интегральный метод биотестирования.

Наиболее перспективным методом для хранения, идентификации и управлением данных об образцах почвы с помощью интегральных методов биотестирования является система на основе штрихкодирования и технологии WebGIS. Такая система работает как удобный инструмент по принципу

глобальной базы данных, каждому образцу из которой присваивается индивидуальный номер (штрих-код) (Guo et al., 2010).

Логичным развитием системы методологии биотестирования с помощью комплексного биотеста является объединение перечисленных выше подходов – стандартов почв для сравнения с программами для их анализа и визуализации – в единый инструмент. В данной части работы описывается исследование, направленное на разработку нового подхода для улучшения помощи в интерпретации результатов ферментативного биотестирования, применяемого к анализу сред сложного состава на примере почвенных образцов. Результатом настоящего исследования является специализированное программное обеспечение, реализующее комплексный ферментативный биотест.

В качестве основы для создания программы принимались следующие принципы:

1) программное обеспечение должно включать информацию о свойствах стандартных почвенных грунтов (приложение В) и результатах чувствительности репрезентативных ферментных тест-систем к этим стандартным грунтам;

2) программное обеспечение должно позволять сравнивать результаты исследуемых почв по отношению к стандартным, т.е. обеспечивать оптимальный алгоритм поиска стандартного образца;

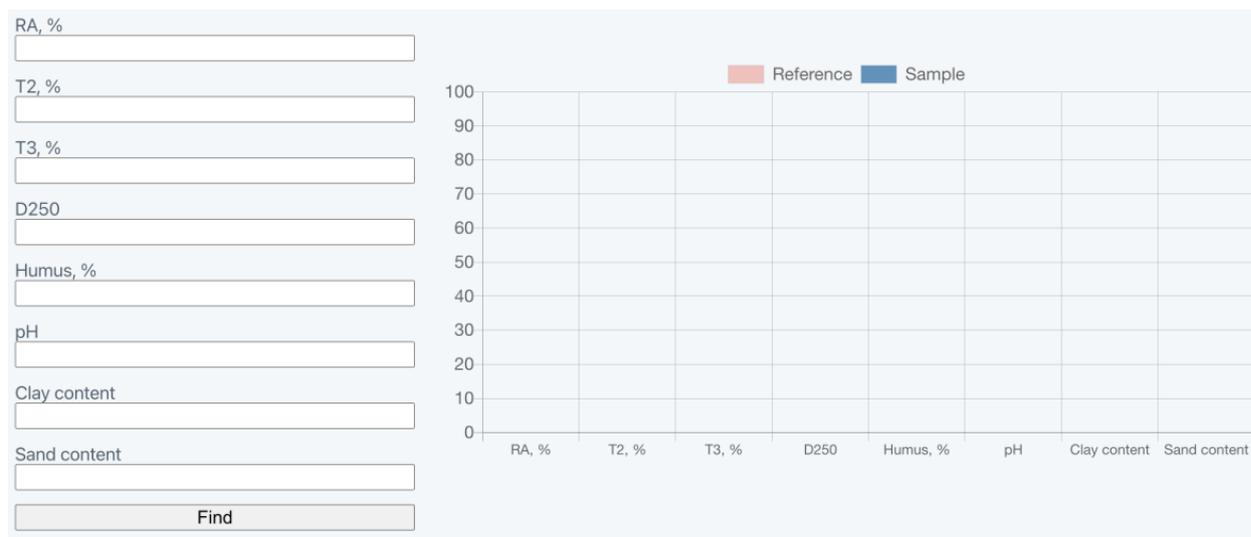
3) программа должна позволять работать с данными в любом интернет-браузере независимо от используемой операционной системы и платформы.

Алгоритм создания ПЭВМ подробно описан в статье Kratasyuk et al. (2021), в качестве метода сравнения выбрано евклидово пространство. Программа, написанная на языке программирования JavaScript, находится в открытом доступе и доступна для скачивания (<https://github.com/actime135/barcode>). Программа, написанная на языке C# .NET 3.5. защищена авторским правом (Свидетельство № 2021660358, 2021).

Внешний вид приложения включает поля ввода, кнопку «Выходные данные» и область диаграммы (рисунок 5.1). Когда приложение запускается, поля ввода не заполнены (рисунок 5.1а). В качестве предлагаемых для заполнения

строк выступают выбранные ранее показатели, по которым можно сделать вывод о наличии или отсутствии загрязнения почв, а именно: остаточная активность моноферментной реакции, катализируемой бутирилхолинэстеразой (RA, %), остаточное свечение биферментной реакции НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза (T2,%), остаточное свечение трехферментной реакции НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза + лактатдегидрогеназа (T3, %), оптическая плотность водных экстрактов из почв на длине волны 250 нм (D250), содержание органического вещества (гумуса) в процентах (Humus, %), pH экстракта из почв в 1 М растворе хлорида калия (pH), гранулометрический состав – содержание глины и песка (clay content, sand content). Указанные выше параметры измерены для модельных почвенных грунтов (приложение В) и внесены в программу.

Пользователь приложения (исследователь) вводит экспериментально полученные данные характеристических измерений исследуемой почвы в соответствующие поля. После того, как пользователь нажимает кнопку «Найти» (Find), программа выполняет поиск соответствующего стандарта на основе включенного в программу алгоритма. После поиска приложение выводит диаграмму и в нижней части диаграммы кодовое название стандартного почвенного грунта (рисунок 5.1б). На диаграмме одновременно отображаются значения характеристик почвы для стандартного образца (розовые столбцы) и исследуемой почвы (синие столбцы). Стоит отметить, что данные о характеристиках исследуемого грунта и стандартного грунта унифицированы, то есть, приведены к одной шкале, где максимальное значение характеристики стандартного образца принято за 100%. Эта унификация связана с тем, что процентное отклонение исследуемой выборки от стандарта более информативно, чем конкретное абсолютное значение. Для удобства сравнения фиолетовым цветом показано перекрытие значений. Кроме того, при наведении курсора мыши на любой столбец, отображается его числовое значение (рисунок 5.1б).



(a)



(б)

Рисунок 5.1 – Внешний вид приложения: (а) при запуске в браузере; (б) при заполнении полей ввода и выборе подходящего стандартного грунта.

Такая программа предназначена в первую очередь для помощи в интерпретации результатов анализа сред сложного состава. Как было показано ранее, ферменты могут появлять как неспецифическую, так и специфическую реакцию. Так, было показано, что бутирилхолинэстераза (БХЭ) обладает высокой чувствительностью к действию фосфорорганических и карбаматных пестицидов (Arduini et al., 2006; Kumanar, Morita, 1995), чувствительность БХЭ к параксону и хлорофосу составляет 0,37 мг/л и 0,005 мг/л соответственно (Arduini et al., 2006). В свою очередь ранее нами также была показана возможность использования

ферментативных систем различной сложности в качестве индикаторных системы для оценки степени загрязнения почв солями тяжелых металлов, пестицидами и наноматериалами почвенных образцов (Колосова и др., 2019; Сутормин и др., 2018; Esimbekova et al., 2017). Кроме того изменения можно отслеживать и по различиям в характеристиках почв и водных экстрактах из них.

Открытый код программы подразумевает возможность включения в базу данных стандартных почвенных грунтов образцов, характерных для других регионов, а также вносить другие изменения. В результате такой подход может приблизить к решению проблем анализа сред сложного состава, связанных с их комплексным влиянием на биотесты.

5.2 Биотестирование почв промышленных городских районов

Образцы почв были отобраны в зоне техногенного влияния крупного промышленного предприятия Красноярский алюминиевый завод (КрАЗ), а также в непосредственной близости от тепловой электростанции Красноярской ТЭЦ-1 (ТЭЦ-1) (Kolossova et al., 2021).

Результаты химического анализа исследованных образцов почв представлены в таблице 5.1. Из таблицы видно, что в соответствии с содержанием гумуса все образцы почвы попадают в категорию от слабо до высоко гумусированных. Кроме того, отобранные образцы почвы в зависимости от содержания глины можно охарактеризовать как средние и тяжелые суглинки. Уровни рН водных экстрактов из почв (pH_{H_2O}) находились в диапазоне от нейтральной до щелочной реакции среды. В соответствии со столбцом концентрации поллютантов 59 проб почвы, отобранных на территории от 0 до 2 км от Красноярского алюминиевого завода, загрязнение фтором было в 18 раз выше, чем федеральный уровень предельно допустимой концентрации (ПДК), равный 10,0 мг / кг для водорастворимого фтора (ГН 2.1.7.2041-06). В целом, образцы почв, загрязненных фтором, имели уровень загрязнения от 11,4 до 44,4 раза выше по сравнению с уровнем ПДК, в связи с чем их можно отнести к зоне с

чрезвычайной экологической ситуацией. Загрязнение проб почвы мышьяком и свинцом было в 2,6 раза и в 2,9 раза выше допустимого (уровень ПДК для мышьяка составляет 2,0 мг / кг, уровень ПДК для свинца составляет 32,0 мг / кг (ГН 2.1.7.2041-06)).

Таблица 5.1 – Химические характеристики и гранулометрический состав образцов техногенных урбостратоземов (X_{\min} - X_{\max}) $\pm s$

| Образец почвы, загрязненный поллютантом | Гумус, % | pH _{H2O} | Физическая глина, % | Концентрация поллютантов, мг/кг |
|---|----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------------------|
| Почвы, загрязненные фтором (n=59) | (1,0-11,5) \pm 2,8 | (6,9-8,5) \pm 0,4 | (22,3-46,9) \pm 6,6 | (112,0-444,0) \pm 2,3 |
| Почвы, загрязненные мышьяком (n=56) | (1,2-12,4) \pm 2,6 | (7,4-8,9) \pm 0,4 | (31,5-51,6) \pm 5,1 | (3,1-15,4) \pm 1,6 |
| Почвы, загрязненные свинцом (n=46) | (3,9-9,7) \pm 1,4 | (7,2-8,7) \pm 0,4 | (23,3-36,9) \pm 3,7 | (45,7-315,6) \pm 1,3 |

Исследовано влияние водных вытяжек из почв на активность ферментной системы Р + Л. Результаты исследования представлены в таблице 5.2. По полученной величине остаточного свечения практически все исследованные водные экстракты из почв были отнесены к загрязненным в той или иной степени.

Однако необходимо понять, с чем конкретно может быть связано такие результаты: с концентрацией поллютантов и/или с проявлением собственных свойств почвы. Для этого провели корреляционный анализ. Коэффициент корреляции между величиной остаточного свечения и валовым содержанием мышьяка в почве был сильным и обратным ($r=-0,73$). Значимой корреляции для других групп образцов не выявлено ($r=-0,05$ для почв, содержащих водорастворимый фтор, $r=-0,08$ для почв, содержащих свинец).

Учитывая, что почва представляет собой сложную систему, также был проведен корреляционный анализ между концентрациями загрязняющих веществ, химическими характеристиками и гранулометрическим составом образцов техногенных урбостратоземов (таблица 5.3).

Таблица 5.2 – Оценка загрязнения образцов техногенных урбостратоземов методом биолюминесцентного анализа и сопоставление уровней ПДК.

| Образец почвы, загрязненный поллютантом | Диапазон загрязнений по сравнению с уровнем ПДК (раз) | Значение остаточного свечения $((I/I_0)_{\min} \pm s - (I/I_0)_{\max} \pm s)$, % | Результат биолюминесцентного тестирования | | |
|---|---|---|---|--------------------|---------------------------|
| | | | Не загрязненные (шт.) | загрязненные (шт.) | Сильно загрязненные (шт.) |
| Почвы, загрязненные фтором (n=59) | 11,2-44,4 | 11,5±0,8 – 75,2±7,9 | 0 | 21 | 38 |
| Почвы, загрязненные мышьяком (n=56) | 1,6-7,7 | 5,3±1,7 – 88,0±0,6 | 2 | 24 | 30 |
| Почвы, загрязненные свинцом (n=46) | 1,5-10,5 | 5,5±0,4 – 75,4±1,0 | 0 | 35 | 11 |

Таблица 5.3 – Результаты корреляционного анализа между концентрациями загрязняющих веществ, химическими характеристиками и гранулометрическим составом образцов техногенных урбостратоземов

| Характеристика образцов техногенных урбостратоземов | Коэффициент корреляции | | |
|--|--|------------------------------------|-----------------------------------|
| | Содержание водорастворимой формы фтора | Валовое содержание мышьяка в почве | Валовое содержание свинца в почве |
| Содержание гумуса, % | 0,05 | 0,45 | 0,47 |
| Гранулометрический состав, % | -0,71* | -0,36 | -0,08 |
| pH _{H2O} | -0,25 | -0,11 | -0,56* |
| Примечание: символом (*) обозначена сильная достоверная корреляция между параметрами | | | |

Значимая корреляция наблюдалась только между содержанием фтора в образцах почвы и гранулометрическим составом, а также между содержанием свинца и pH_{H2O} (p < 0,05). Следовательно, значения биолюминесцентного биотеста зависят не только от содержания поллютантов в образцах почвы, но и от

химических характеристик и гранулометрического состава исследуемых образцов техногенных урбостратоземов.

Приведенные в таблицах 5.1 и 5.2 концентрации поллютантов указывают на то, что образцы сильно загрязнены. Следует отметить, что подобное загрязнение почв характерны не только для отдельных участков отбора проб, расположенных в г. Красноярске, но и для многих территорий, где расположены алюминиевые заводы, причем уровень загрязнения с расстоянием уменьшается. Например, концентрация фтора в пробах почв Республике Хакасия, отобранных на расстоянии 1-2 км от источников эмиссий (Саяногорского и Хакасского алюминиевых заводов, одних из крупнейших алюминиевых заводов в России) составляла от 100 до 300 мг / кг. Падение уровня загрязнения до значений ПДК наблюдалось только для расстояний, превышающих 15 км (Давыдова и др., 2013). Аналогичная картина наблюдается в Иркутской области. В 2011 году было зарегистрировано загрязнение почв фтором, превышающее в 6-7 раз значение ПДК, на расстоянии 20 км от г. Иркутска (г. Шелехов, Иркутская область, Россия) (Козлова и др., 2011). При этом в 2013 году превышение составило от 10 до 20 раз больше ПДК (Naprashnikova, 2013). Основной причиной столь сильного загрязнения почв фтором стали выбросы Иркутского алюминиевого завода. Следует отметить, что фторидное загрязнение образцов почвы выше ПДК обнаружено по всему почвенному профилю. В то же время, причинами загрязнения почв свинцом и мышьяком могут являться автомобильные выбросы, а также электростанции, работающие на угле. Так, в пгт Жилкино (Иркутская область) максимальные зарегистрированные значения загрязнения почв мышьяком и свинцом составили 2-6 ПДК на поверхности, а также описано двукратное превышение ПДК внутри слоя почвы до 20 см (Максимова, Лопатовская, 2017).

Данные биолюминесцентного ферментативного биотеста 59 образцов почв, загрязненных фтором, показали большой разброс значений остаточного свечения биферментной системы (от $11,5 \pm 0,8$ до $75,2 \pm 7,9\%$). Несмотря на то, что все образцы оказывали значительный ингибирующий эффект на P+L систему,

достоверных корреляций с концентрацией фтора в образцах не выявлено ($r=-0,05$). Кроме того, было показано отсутствие отрицательного влияния высоких концентраций фтора на люминесцентную активность (Harvey, 1941) и рост (Thomulka et al., 1993) бактерий *Vibrio harveyi*. В то же время известно, что фтор оказывает отрицательное воздействие на различные части человеческого организма, такие как зубы, кости, пищеварительный тракт, почки, эндокринную и репродуктивную системы. Он является наиболее активным неметаллом и наиболее электроотрицательный атомом, который способен образовывать прочные водородные связи и легко образовывать комплексы с различными элементами. Влияние фтора на микроорганизмы можно описать тремя основными механизмами: (а) он напрямую подавляет активность гликолитических ферментов; (б) он может действовать как аналог фосфора и влиять на активность транслоказ; и (в) вызывает диссоциацию окислительного фосфорилирования (Marquis et al., 2003). Также фторид может вызывать образование активных форм кислорода, что приводит к повышению уровня лактатдегидрогеназы в сперматозоидах (Kim et al., 2015) и снижать их активность и жизнеспособность. Принимая во внимание вышеупомянутые публикации, предполагается, что ферменты должны иметь чувствительность к фторидному загрязнению. Однако из-за отсутствия чувствительности люминесцентных бактерий к фтору, описанных в ранних исследованиях, изучение выделенной системы светящихся бактерий в модельных исследованиях не проводилось. В то же время, сильное ингибирующее действия водных экстрактов из почвы на ферментную систему Р+Л может быть вызвана не только содержанием фтора в образцах почвы, но и огромным разнообразием параметров почвы, которые влияют на активность ферментов. Следовательно, до тех пор, пока не будет проведено исследование зависимости реакции от концентрации фтора для оценки их прямого воздействия на биолюминесцентную ферментную систему в модельном эксперименте, нельзя однозначно утверждать о наличии или отсутствии чувствительности к фтору системы Р+Л.

При рассмотрении всей группы почвенных образцов, загрязненных мышьяком, значимой корреляции между содержанием мышьяка в почвах и активностью системы Р+Л обнаружено не было. Учитывая тот факт, что накопление мышьяка в почвах и его выход в раствор сильно зависит от почвенных характеристик, таких как процент глинистой фракции и содержание гумуса, а также уровня рН (Thanabalasingam, Pickering, 1986; Zhang et al., 2020), все образцы разделили на четыре группы по содержанию гумуса и гранулометрическому составу. Показано, что в группе 1 (низко и средне гумусированные, среднесуглинистые) между валовым содержанием мышьяка и активностью Р+Л системы наблюдается достоверная сильная и обратная корреляция ($r = -0,72$, $p < 0,01$). Поэтому по данной группе можно утверждать, что ингибирование системы было вызвано не столько влиянием почв, сколько чувствительностью ферментов к мышьяку. Потенциально он может ингибировать работу ферментов светящихся бактерий, так согласно данным литературы, мышьяк разных валентностей способен влиять на SH-группы ферментов и изменять процесс фосфорилирования, выступая в качестве аналога фосфора (Ochiai, 1987). Однако в модельном эксперименте не удалось определить параметр IC_{20} для ферментной системы Р+Л при тестировании ее чувствительности к растворам мышьяка в диапазоне 0,095–0,105 мг/л.

Не смотря на то, что валовое содержание свинца в исследованных почвах было высоким (от 47 до 297 мг/кг), концентрации свинца в водных вытяжках не превышали 0,14 мг/кг (0,028 мг/л водной вытяжки из почвы), т.е. выход свинца в водный раствор составил 0,1% от его общей концентрации (Рисунок 5.2).

Ранее было показано, что чувствительность к свинцу (IC_{50} , половина максимальной ингибирующей концентрации) светящихся бактерий составляет 0,3 мг/л в остром эксперименте (Fulladosa et al., 2005) и 669 мг/л в случае хронического эксперимента (Hsieh et al., 2004). Рассчитанная ингибирующая на 50% ферментная активность Р+Л системы концентрация свинца $IC_{50} = 0,6$ мг/л в условиях модельного эксперимента (Kalyabina et al., 2019). При исследовании урбостратоземов, несмотря на высокие значения общего содержания свинца в

образцах почвы (от 47 до 297 мг/кг), указанные выше значения IC_{50} не были достигнуты из-за низкой растворимости свинца в воде. Концентрации свинца в водных вытяжках из почвы имели низкий коэффициент корреляции с величинами остаточного свечения ферментной системы ($r = 0,2$, $p < 0,05$). И нельзя говорить о том, что ингибирование ферментной системы вызвано именно этим поллютантом, хотя к нему и существует потенциальная чувствительность.

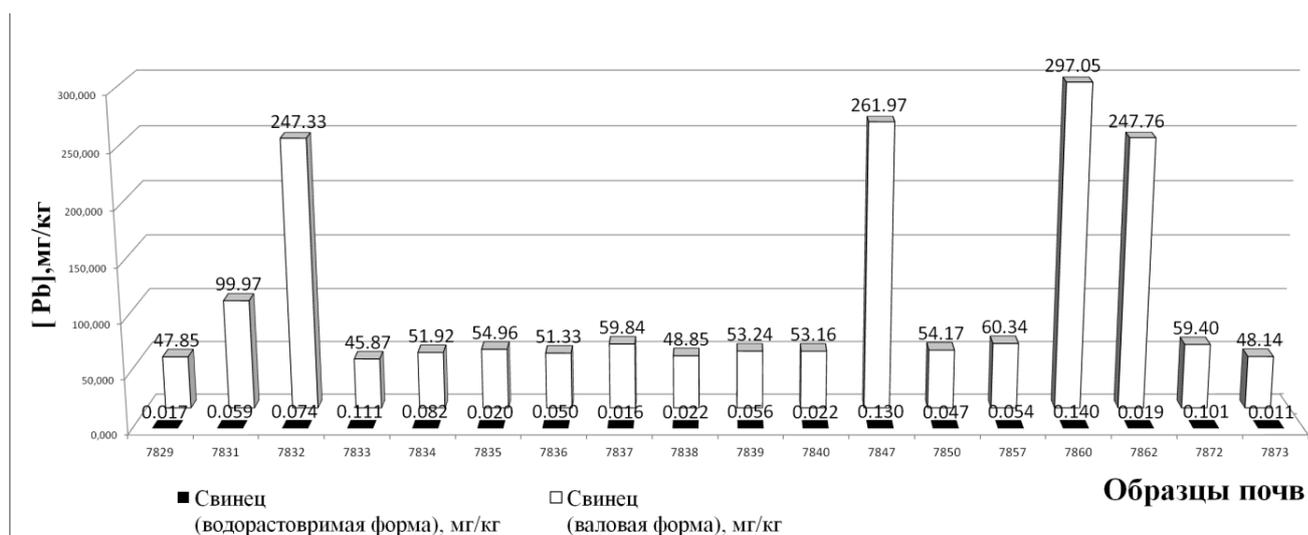


Рисунок 5.2 – Содержание свинца (Pb) в образцах почвы с указанием количества:

белый цвет – общее содержание Pb в каждой почве; черный цвет – экстрагированная водорастворимая форма Pb

5.3 Биотестирование почв сельскохозяйственного назначения

Для апробации метода для оценки загрязнения почв сельскохозяйственного назначения были заложены и исследованы полнопрофильные почвенные разрезы целинных, пахотных и 10-летних залежных участков в ОПХ «Соляное» (Рыбинский район, Красноярский край, Россия) (Шпедт и др.,). Форма профиля, результаты ферментативного биотестирования, а также химические свойства исследуемых почв приведены в таблице 5.4 и рисунке 5.3.

Таблица 5.4 - Строение профиля, химические свойства и величина остаточного свечения агропочв

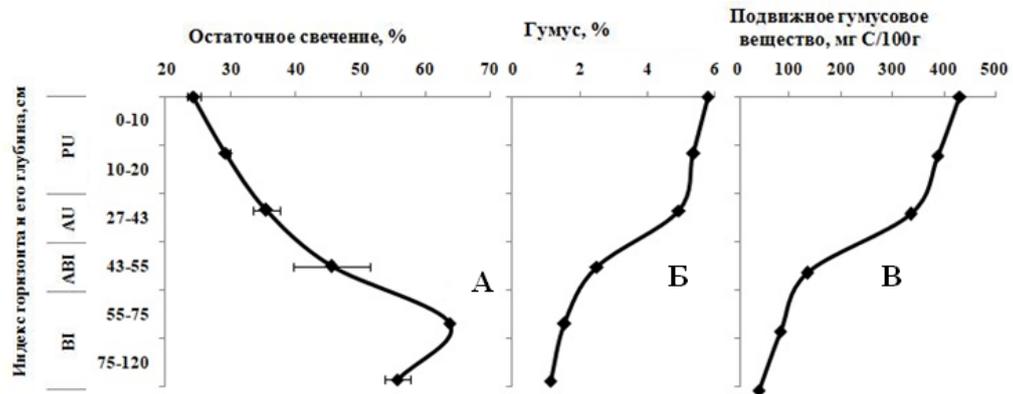
| Индекс горизонта, его мощность | Глубина взятия образца, см | Гумус, % | pH _{KCl} | ПГВ, мг С/100г | | | | I/I ₀ % | I/I ₀ ср. |
|---|----------------------------|----------|-------------------|----------------|-----|-----|-------|-----------------------|----------------------|
| | | | | сумма | ГК | ФК | ГК:ФК | | |
| Отдел аккумулятивно-гумусовых почв. Агрочернозем глинисто-иллювиальный, среднемощный, сильно гумусированный, тяжелосуглинистый, на глине. Пашня (мн. травы) | | | | | | | | | |
| PU, 0-20 | 0-10 | 5,78 | 5,76 | 431 | 242 | 189 | 1,28 | 24,2 | 42,3 |
| | 10-20 | 5,35 | 5,70 | 388 | 210 | 178 | 1,18 | 29,2 | |
| AU, 27-43 | 27-43 | 4,92 | 5,57 | 336 | 147 | 189 | 0,78 | 35,4 | |
| ABI, 43-55 | 43-55 | 2,47 | 5,35 | 135 | 41 | 94 | 0,44 | 45,5 | |
| BI, 55-120 | 55-75 | 1,52 | 5,06 | 82 | 31 | 51 | 0,61 | 63,7 | |
| | 75-120 | 1,09 | 4,47 | 40 | 20 | 20 | 1,00 | 55,7 | |
| Отдел аккумулятивно-гумусовых почв. Агрочернозем маломощный, сильно гумусированный, тяжелосуглинистый, на карбонатном тяжелом суглинке. Залежь 10 лет | | | | | | | | | |
| AU (PU), 0-26 | 0-12 | 6,31 | 5,44 | 304 | 168 | 136 | 1,24 | 36,9 | 67,0 |
| | 12-26 | 5,99 | 5,64 | 304 | 179 | 125 | 1,43 | 38,0 | |
| ABI, 26-52 | 35-40 | 2,37 | 5,77 | 50 | 25 | 25 | 1,00 | 75,0 | |
| BCA, 52-140 | 70-80 | 0,77 | 7,19 | 19 | 9 | 10 | 0,90 | 85,5 | |
| | 115-125 | 0,77 | 7,25 | 19 | 9 | 10 | 0,90 | 99,7 | |
| Отдел аккумулятивно-гумусовых почв. Агрочернозем маломощный, тучный, тяжелосуглинистый, на карбонатной глине. Пастбище | | | | | | | | | |
| AU, 0-34 | 0-7 | 9,40 | 5,83 | 568 | 348 | 220 | 1,58 | 32,7 | 63,2 |
| | 15-30 | 7,48 | 5,92 | 283 | 115 | 168 | 0,68 | 56,9 | |
| ABI, 34-45 | 34-45 | 2,26 | 5,52 | 103 | 31 | 72 | 0,43 | 49,7 | |
| BI, 45-67 | 50-65 | 1,62 | 5,62 | 82 | 20 | 62 | 0,32 | 64,2 | |
| BCA, 67-120 | 72-82 | 1,41 | 7,11 | 50 | 10 | 40 | 0,25 | 95,5 | |
| | 100-110 | 1,20 | 7,29 | 40 | 10 | 30 | 0,33 | 80,0 | |

Влияние водных вытяжек из почв, отобранных на пахотном участке, на активность ферментативной системы P+L представлена на рисунке 5.3А (пашня). Значения остаточной интенсивности ферментативной системы I/I₀ слабо коррелировало с глубиной отбора проб. Минимальное значение (I/I₀ = 24%) было зафиксировано для образцов, отобранных с глубины от 0 до 10 см. Максимальное значение I/I₀ составило 63%. Уровень гумуса и содержание ПГВ в исследуемых образцах уменьшается сверху вниз почвенного профиля (рисунок 5.3Б, рисунок 5.3В – (пашня)). Гумус, который находится в верхнем слое почвы, характеризуется как относящийся к фульватно-гуматному типу. На меньшей глубине он переходит в гуматно-фульватный. Значение pH_{KCl} было классифицировано как слабокислое по всему профилю почвы.

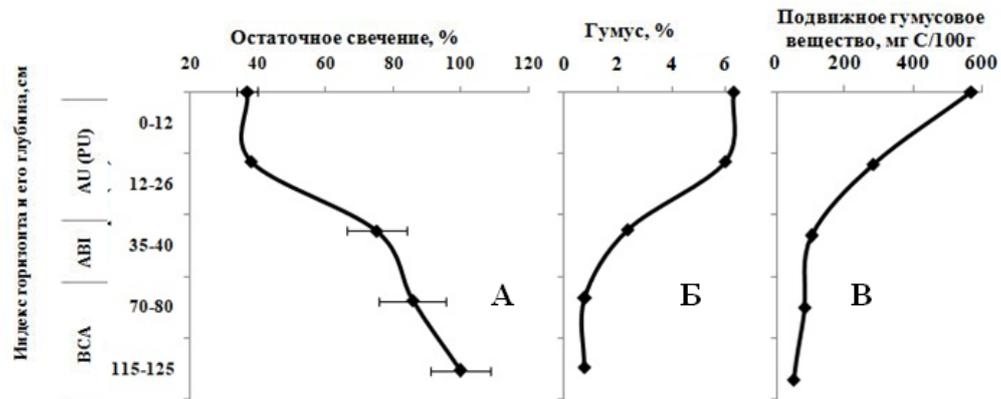
Влияние водных вытяжек из почв, отобранных на участке 10-летней залежи, на активность ферментативной системы Р+Л представлено на рисунке 5.3А (залежь). Значения остаточной интенсивности ферментативной системы I/I_0 слабо коррелировало с глубиной отбора проб. Минимальные и максимальные значения I/I_0 , а именно 36% и 99%, были зарегистрированы при тестировании образцов почвы, отобранных на глубине от 0 до 10 см и от 75 до 120 см соответственно. Уровень гумуса и содержание ПГВ в верхнем слое почвы выше, чем в нижних (рисунок 5.3Б, рисунок 5.3В – (залежь)). Тип гумуса варьирует от фульватно-гуматного до гуматно-фульватного. Значение pH_{KCl} в верхнем слое почвы было определено как слабокислое, с глубиной значение pH_{KCl} повысилось до нейтрального.

Влияние водных вытяжек из почв, отобранных на участке 10-летней залежи, на активность ферментативной системы Р+Л представлено на рисунке 5.3А (целина). Изменение остаточной интенсивности свечения по глубине было аналогично залежному участку. Уровень гумуса и содержание ПГВ резко убывали вниз по профилю почв (рисунок 5.3Б, рисунок 5.3В – (целина)). Тип варьирует от фульватно-гуматного до фульватного. Значение pH_{KCl} в верхнем слое почвы было определено как слабокислое, с глубиной значение pH_{KCl} повысилось до нейтрального.

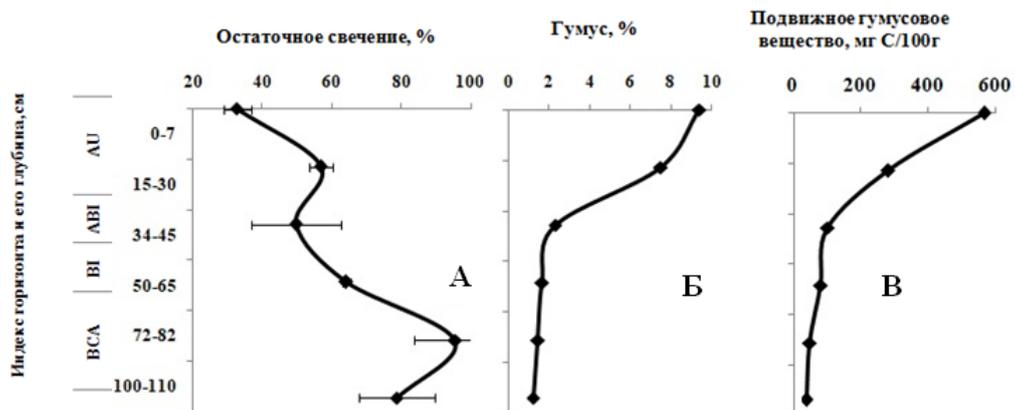
Как было описано ранее, наличие большого содержания гуминовых веществ в образцах может вызывать ингибирование даже в отсутствии поллютантов (Тарасова, 2012; Tarasova et al., 2011, 2012). С другой стороны известно, что гуминовые вещества могут сорбировать химические вещества, снижая их биодоступность, тем самым общий уровень ингибирования уменьшается (Steinberg et al., 2003). Исходя из результатов анализа почв под залежью и целиной, с уровня ниже 27-30 см эффект гуминовых веществ не значителен из-за их низкого содержания. Содержание гумусовых веществ в почве менее 0,77-1,41%, а подвижных гумусовых веществ менее 50 мг С/100г не приводит к ингибированию биоллюминесцентного свечения.



(пашня)



(залежь)



(целина)

Рисунок 5.3 – Изменение остаточного свечения ферментативной системы (А), содержания гумуса (Б) и подвижного гумусового вещества (В) в полнопрофильном разрезе почвы пашни, 10-летней залежи и целины

Величина остаточного свечения увеличивается вниз по профилю (рисунок 5.3), однако для почв под пашней она не достигает 100% даже в самом нижнем горизонте, где содержание гумуса и подвижных гумусовых веществ минимально. Высокая степень ингибирования свечения биферментной системы связана с тем, что сельскохозяйственная обработка распаханной почвы проходила с использованием минеральных удобрений и пестицидов. Что также подтверждается более низким значением рН нижних горизонтов под пашней, вплоть до кислого (рН=4,47), не типичного для данного типа почвы. Кислый уровень рН нижних слоев связан с накоплением сульфатов, которое оказывает негативное влияние на рост и развитие растений и изменяет баланс доступных для них элементов почвы (Naque et al., 2018). Таким образом, можно заключить, что почва под пашней загрязнена по всему профилю почв вплоть до самых низших слоев.

Таким образом, можно заключить, что ферментативный биотест применим для анализа почв по всему почвенному профилю из-за его высокой чувствительности и экспрессности (Kolosova et al., 2022). При этом эффект гуминовых веществ можно нивелировать используя набор ферментных систем и разработанную программу.

5.4 Биотестирование лесных почв

Природные почвы лесов характеризуются различными процессами почвообразования, которые зависят, в том числе и от видов деревьев, произрастающих на данной местности.

Биотестирование проводилось на двух различных типах лесных почв – дерново-подзолистых и серых лесных, чистых и загрязненных.

Серые лесные почвы распространены в северной части лесостепной зоны. По морфологическим признакам занимают промежуточное положение от дерново-подзолистых почв к черноземам. Имеют особый верхний горизонт, представленный подстилкой. Гумусовый горизонт состоит из двух частей –

собственно гумусового горизонта и переходного (гумусово-оподзоленного). Серые почвы характеризуются кислой реакцией среды, преобладанием гуминовых кислот в составе гумуса, обеднение верхних горизонтов илистой фракцией (Александрова и др., 1969).

Описание образцов представлено в разделе 2.1.1. Кислотность почвы 5,88; содержание нитратного азота исходной почвы 0,63 мг/кг, аммиачного азота 4,96 мг/кг, содержание общего азота в минеральном горизонте 0,18%, углерода – 2,86%. При приготовлении экстрактов из почв соотношение почвы и растворителя (воды) было 1:4.

По результатам биотестирования (рисунок 5.4) все образцы почв, в том числе без добавления азота, ингибировали биферментную биолюминесцентную систему в значительной степени. Характер зависимости величины остаточного свечения от концентрации вносимого азота не линеен. Наибольшее ингибирование наблюдалось при концентрации 10 кг/га азота, наименьшее при 500 кг/га.

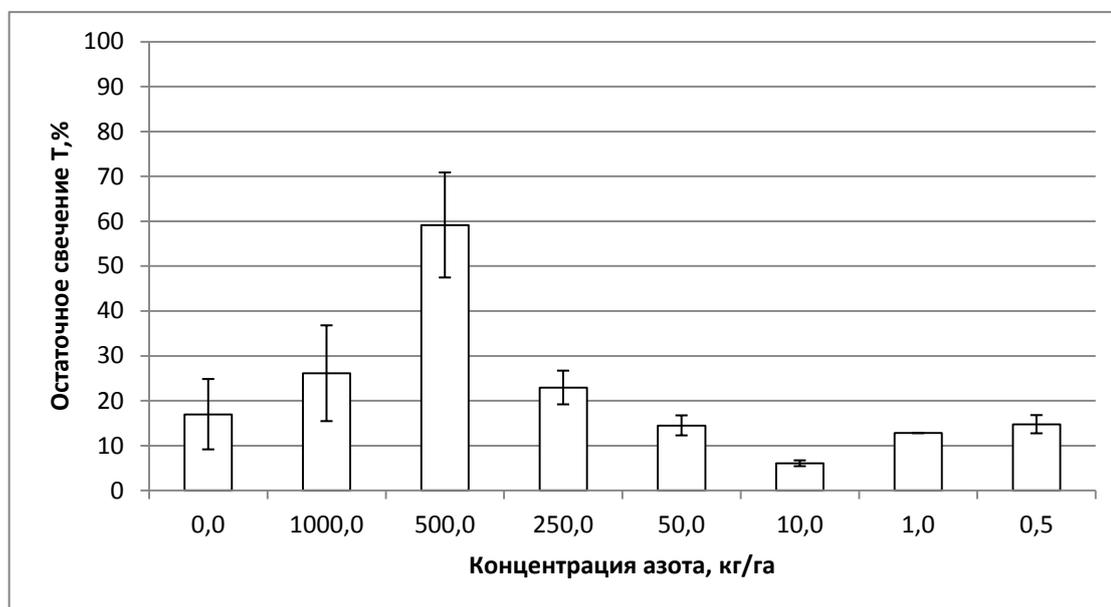


Рисунок 5.4 – Биотестирование серых лесных почв

В оригинальном исследовании, из которого получены данные образцы почвы (Матвиенко, 2017), изучали влияние добавления различных концентраций

азота на минерализацию углерода. Добавление азота в подстилки (данные не представлены) увеличивало активность минерализации углерода на 20-40% независимо от концентрации. Однако данный эффект отсутствовал в минеральных горизонтах почв. Также указывается на наличие нелинейного эффекта влияния концентраций азота на минерализацию углерода, объясняемого сочетанием разнонаправленных процессов, стимулирующих и ингибирующих минерализацию. Кроме того, процессы преобразования вносимого азота в почве в сильной степени зависят от концентрации уже находящегося в ней азота.

Поэтому такой характер ингибирования биOLUMИнесцентной системы может быть объяснен не столько влиянием концентрации азота, сколько процессами его преобразования в почве.

Дерново-подзолистый тип почвы встречается в южной части таежно-лесной зоны. Развиваются под действием дернового и подзолистого процессов. Дерновые процессы характерны для почв лугов и характеризуются накоплением гумуса, питательных веществ, созданием водопрочной структуры в верхнем горизонте. Подзолистые процессы наблюдаются в таежных лесах с временным избыточным увлажнением и характеризуются наличием под лесной подстилкой малопродуктивного горизонта с кислой реакцией, низким содержанием питательных веществ.

В верхней части дерново-подзолистые почвы имеют гумусо-аккумулятивный (дерновый) горизонт, ниже – подзолистый с резким снижением содержания гумуса. Такие почвы обладают низким содержанием гумуса и питательных веществ, кислой реакцией и наличием малопродуктивного подзолистого горизонта (Александрова и др., 1969).

Описание образцов дерново-подзолистых почв представлено в разделе 2.1.2. Исследуемые дерново-подзолистые почвы имеют низкое и очень низкое содержание гумуса (таблица 5.5), что обусловлено генезисом данных почв. По профилю почв содержание гумуса резко убывающее. В почве под вырубкой небольшое содержание гумуса прослеживается до глубины 120-130см. Имеет место вымывание гумусовых веществ, что может быть связано с трансформацией

гумуса, в результате деградации поверхности почвы при лесозаготовительных работах. pH солевой суспензии изменяется вниз по профилю от нейтральной и слабокислой до сильнокислой. В почве нарушенного участка кислотность существенно выше. Дерново-подзолистые почвы очень плохо обеспечены нитратным азотом. Содержание подвижного фосфора изменяется в разных горизонтах почвы, от низкого до высокого значения.

Таблица 5.5 – Химические свойства и величина остаточного свечения почв (Погорельский бор)

| Горизонт, его мощность, см | Глубина взятия образца, см | Гумус, % | pH _{KCl} | pH _{H2O} | N- NO ₃ | P ₂ O ₅ | T | T _{ср} |
|--|-------------------------------------|-------------|-------------------|-------------------|-----------------------|-------------------------------|-------|-----------------|
| | | | | | мг/кг | мг/100г | % | |
| Отдел текстурно-дифференцированных почв. Дерново-подзолистая типичная, среднемощная, слабо гумусированная среднесуглинистая на супеси. Хвойный лес. (56°22'38,58"N и 92°57'26,49"E) | | | | | | | | |
| AY, 0-55 | 10-15 | 1,55 | 5,90 | 6,62 | 3,1 | 2,5 | 29,7 | 58,1 |
| | 20-25 | 0,83 | 6,20 | 6,99 | 2,8 | 14,0 | 52,4 | |
| EL, 55-73 | 60-65 | 0,31 | 4,90 | 6,15 | 2,4 | 4,5 | 68,5 | |
| BT, 73-120 | 90-95 | 0,10 | 4,70 | 6,75 | 2,5 | 2,5 | 81,8 | |
| Отдел текстурно-дифференцированных почв. Дерново-подзолистая типичная, средне мелкая, слабо гумусированная, среднесуглинистая на супеси. Вырубка в хвойном лесу. (56°22'34,27"N и 92°57'29,45"E) | | | | | | | | |
| AY, 0-22 | 10-20 | 2,41 | 5,00 | 5,90 | 2,9 | 12,5 | 54,1 | 79,6 |
| EL, 22-44 | 25-35 | 0,55 | 4,40 | 5,60 | 1,8 | 11,8 | 77,1 | |
| BT, 44-144 | 50-60 | 0,64 | 3,70 | 5,40 | 1,8 | 6,0 | 76,8 | |
| | 80-90 | 0,50 | 4,00 | 5,70 | 2,0 | 9,50 | 88,8 | |
| | 120-130 | 0,36 | 4,25 | 6,20 | 1,8 | 16,5 | 101,4 | |

Дерново-подзолистые почвы в целом ингибируют биолюминесцентную ферментативную системы в меньшей степени, чем серые лесные почвы. Величина остаточного свечения увеличивается вниз по профилю. Зависимость остаточного свечения от концентрации азота в дерново-подзолистой почве линейна, коэффициент линейной корреляции составил $r=-0,86$. Чуть менее сильная, но также обратная, зависимость наблюдается между остаточным свечением и pH_{KCl} ($r=-0,8$).

5.5 Выводы по главе

Предложен подход для решения проблем анализа сред сложного состава (на примере почвы), создана формализация и конечный программный продукт. Разработанная программа является непосредственной частью комплексного ферментативного биотеста и позволяет его реализовывать.

По результатам апробации части комплексного ферментативного биотеста, а именно биферментной биолюминесцентной системы Р+Л, показано, что данный метод является перспективным для включения в систему экологического мониторинга.

Результаты биолюминесцентного биотестирования урбостратоземов, в значительной степени загрязненных фтором, мышьяком и свинцом, указывают на важные моменты, которые следует учитывать при анализе почвы любыми методами биотестирования. Необходимо обращать внимание на состав и структуру почвы, от которых зависит сорбция поллютантов, учитывать содержание гумуса, что показано для почв, загрязненных мышьяком. Кроме того, необходимо принимать во внимание растворимость поллютантов, так как в большинстве методов биотестирования используют в качестве растворителя дистилцированную или культивационную воду. Так, концентрация водорастворимых форм свинца была на несколько порядков ниже, чем валовая концентрация. Таким образом, необходимо уделять большое внимание пробоподготовке проб почв к анализу для исключения ложных результатов и корректного сравнения результатов, полученных различными методами анализа.

При исследовании загрязнения агропочв показано, что в условиях Канского природного округа верхние горизонты агропочв, интенсивно используемых под сельскохозяйственные угодья, имеют сильное загрязнение. По степени ингибирования биферментной системы водными вытяжками из почв наиболее загрязненными на протяжении всего почвенного профиля оказались агропочвы под пашней. Величина остаточного свечения не достигала 100% даже при

исследовании самых низших почвенных горизонтов, где содержание гуминовых веществ минимально и оно не оказывает действие на активность ферментов. Агропочвы под залежью и целиной ингибируют Р+Л систему в меньшей степени. С глубиной, вниз по профилю ингибирующее действие почв резко ослабевает, и в агропочвах под залежью и целинным участком с глубины 70см не наблюдается.

При исследовании лесных почв показано, что верхние горизонты этих почв оказывают сильный ингибирующий эффект на биферментную систему (серые лесные почвы ингибируют сильнее). При анализе влияния содержания азота в лесных почвах выявлено, что ингибирование ферментной системы от концентрации азота при искусственном добавлении его в серую лесную почву и инкубировании в течение 3 суток зависит не линейно, что может объясняться сложными процессами, происходящими с только что добавленным азотом в почве (нестационарная система). Зависимость же степени ингибирования от присутствующего в дерново-подзолистых почвах азота (стационарная система) оказалась линейной, а связь достаточно сильной.

Ограничения, выявленные в ходе апробации, в частности связанные с влиянием гумусовых веществ, еще раз указывают на то, что необходим комплексный подход, при котором репрезентативные ферментативные методы, стандартные почвенные грунты и специализированная программа входят в состав единого инструмента – комплексного ферментативного биотеста.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе предложена концепция и составы комплексного ферментативного биотеста для анализа загрязнения почв различного назначения. Такая концепция постулирует необходимость перехода от одиночных биотестов к набору репрезентативных ферментных систем, составляющих комплексный ферментативный биотест, и предполагает также объединение двух подходов – стандартов почв для сравнения с программами для их анализа и визуализации – в единый инструмент. Такой комплексный подход может быть применен для оценки качества любых сложных по составу экологических объектов, а полученные результаты могут внести вклад в развитие системы методологии биотестирования.

Показано также, что необходимо учитывать ограничения методов при использовании поллютантов с особыми свойствами. Выбор ферментных систем должен основываться на спектре предполагаемых загрязнителей и соответствовать критерию оптимальности. Если целью анализа является установление механизмов действия веществ на биохимическую (метаболическую) цепочку, то необходимо использовать принцип сопряжения ферментов, начиная с моноферментных реакций.

Новый подход поможет в решении актуальных проблем сельского хозяйства и экологического мониторинга, так как основан на решении фундаментальной научной проблемы поиска и выделения существенных биологических переменных при комплексном мониторинге взаимного действия друг на друга почвы, поллютантов и живых организмов. Использование ферментов вместо живых организмов открывает возможность разработке новых устройств – биосенсоров – для автоматизированного анализа загрязнения почв.

ВЫВОДЫ

1) На основе анализа чувствительности моно-, би- и триферментных систем, ответственных за разные метаболические функции организма, к модельным почвенным поллютантам, были выбраны ферментативные системы для комплексного ферментативного биотеста для оценки загрязнения почвенных систем. Ферментативные системы (моноферментные, катализируемые НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой и бутирилхолинэстеразой, биолюминесцентная биферментная и сопряженная с ней триферментная) обладают чувствительностью к модельным почвенным поллютантам на уровне ПДК, что обеспечивает возможность их включения в состав комплексного ферментативного биотеста.

2) Комплексные ферментативные биотесты для оценки загрязнения почв различаются по составу в зависимости от назначения. Для оценки промышленного загрязнения применяют оксидоредуктазу, биферментную систему Р+Л и триферментную систему, сопряженную с алкогольдегидрогеназой, для оценки сельскохозяйственного загрязнения применяют бутирилхолинэстеразу, биферментную биолюминесцентную систему Р+Л и триферментную систему, сопряженную с лактатдегидрогеназой.

3) Изучение закономерностей влияния водных вытяжек из модельных почвенных смесей и природных почв и грунтов на моно-, би- и триферментные системы в присутствии модельных поллютантов и без них показало, что результаты ферментативного биотестирования зависят от типа и разновидности почвы. Наибольшее влияние оказывает содержание гумусовых веществ более 0,77-1,41%, а подвижных гумусовых веществ более 50 мгС/100г. Мутность водной вытяжки из почв и его кислотные свойства не оказывают существенного влияния на результаты биотестирования.

4) Создан банк из 68 модельных почвенных грунтов в качестве контрольных образцов для учета влияния типа и разновидности почвы при проведении

ферментативного биотестирования, отличающихся в широком диапазоне содержанием гумусовых веществ и гранулометрическим составом.

5) Создана информационная платформа, позволяющая сравнивать результаты ферментативного биотестирования загрязненных почв с референтными «чистыми» контрольными показателями. Разработанная программа хранит сведения о банке стандартных почвенных образцов, обеспечивает оптимальный поиск стандарта почвы по содержанию гумуса и гранулометрическому составу и визуализирует результаты сравнения исследуемого образца со стандартом.

6) Разработанный комплексный ферментативный биотест, состоящий из набора репрезентативных ферментных систем, обеспечивающих оптимальный уровень чувствительности, банка модельных почвенных образцов в качестве контроля при проведении анализа, а также программы, которая учитывает и сравнивает показатели модельных почвенных грунтов с исследуемыми, был апробирован и показал эффективность при оценке загрязнения сельскохозяйственных и городских почв Красноярского края, подверженных длительному антропогенному влиянию.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

| | |
|-------------------|--|
| ПДК | – предельно допустимая концентрация |
| ОДК | – ориентировочно допустимая концентрация |
| ОПХ | – опытно-производственное хозяйство |
| Р. | – почвенный разрез |
| МПГ | – модельный почвогрунт |
| ПГВ | – подвижные гумусовые вещества |
| ГК | – гуминовые кислоты |
| ФК | – фульвовые кислоты |
| НАД ⁺ | – никотинамидаденинуклеотид окисленный |
| НАДН | – никотинамидаденинуклеотид восстановленный |
| ФМН | – флаavinмононуклеотид |
| ФМНН ₂ | – флаavinмононуклеотид восстановленный |
| РСНО | – тетрадеканаль |
| РСНООН | – тетрадекакарбоновая кислота |
| АДГ | – алкогольдегидрогеназа |
| ЛДГ | – лактатдегидрогеназа |
| Р | – НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза |
| БХЭ | – бутирилхолинэстераза |
| Г6ФД | – глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа |
| Тр | – трипсин |
| Р+Л | – НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза |
| ЛДГ+Р+Л | – лактатдегидрогеназа + НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза и люцифераза |
| АДГ+Р+Л | – алкогольдегидрогеназа + НАД(Ф)Н:ФМН- оксидоредуктаза + люцифераза |
| Тр+Р+Л | – трипсин + НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза |

| | |
|-----------------------------------|---|
| IC ₂₀ | – концентрации анализируемых веществ, вызывающих снижение активности системы (ингибирование) на 20% |
| IC ₅₀ | – концентрации анализируемых веществ, вызывающих снижение активности системы (ингибирование) на 50% |
| A | – активность моноферментной реакции |
| OA | – остаточная активность, % |
| I | – интенсивность биолюминесценции |
| T | – величина остаточного свечения, % |
| ГХЦГ | – гексахлорциклогексан |
| TiO ₂ | – наночастицы диоксида титана |
| Ферментативный | – в данной работе термин «ферментативный» принимается тождественным термину «ферментный» и означает «составленный из ферментов, использующий ферменты» |
| Поллютант (загрязняющее вещество) | – «вещество или смесь веществ и микроорганизмов, которые в количестве и (или) концентрациях, превышающих установленные для химических веществ, в том числе радиоактивных, иных веществ и микроорганизмов нормативы, оказывают негативное воздействие на окружающую среду, жизнь, здоровье человека» (Федеральный закон от 10.01.2002 N 7-ФЗ); |

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Агрохимические методы исследования почв: Руководство / Под ред. А. В. Соколова. – М.: Наука, 1975. – 656 с.

Александрова, Л. Н. Почвоведение / Л. Н. Александрова, И. П. Гречин, И. С. Кауричев, М. П. Мершин, В. Ф. Непомилуев, Н. П. Панов, Н. Н. Поддубный, Н. Н. Розов, М. В. Стратанович, А. А. Тарунтаева. – М.: Издательство "Колос", 1969. – 543 с., с илл.

Алешина, Е. С. Коррекция результатов билюминесцентного анализа с учетом оптических свойств исследуемых углеродных наноматериалов / Е.С. Алешина, И.П. Болодурина, Д.Г. Дерябин, М.Г. Кучеренко //Вестник Оренбургского государственного университета. – 2010. – N 112. – С. 141-146.

Анализ загрязненной почвы и опасных отходов: практическое руководство / Ю. С. Другов, А. А. Родин. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 469 с.: ил. – (Методы в химии).

Ананьева, Т. А. Физическая география Красноярского края: учеб. пособие для студентов высших учебных заведений / Т. А. Ананьева, В. П. Чеха, О. Ю. Елин и др.; под ред. Т. А. Ананьевой; Краснояр. гос. пед. ун-т им. В.П. Астафьева. – Красноярск, 2016. – 296 с.: ил. ISBN 978-5-85981-993-5

Апарин, Б. Ф. Почвоведение: учебник для образоват. учреждений сред. проф. образования / Б. Ф. Апарин – М.: Издательский центр «Академия», 2012. – 256 с., с. цв. ил.: ил. ISBN 978-5-7695-7259-3

Байгина, Е.М. Анализ возможности применения билюминесцентных ферментативных биотестов для оценки загрязнения почвы (на примере почв г. Красноярск) / Байгина Е.М., Римацкая Н.В., Степанова Л.В., Кратасюк В.А. // Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология. – 2017. – Т. 21. – С. 21-30.

Байкалова, Т. В. Содержание тяжелых металлов в почвенном покрове, листьях березы под воздействием промышленности г. Красноярск / Т. В.

Байкалова, П. С. Байкалов, И. С. Коротченко // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2017. – N 5. – С. 123-130.

Баранов, М. Е. Микробиология загрязненных соединениями азота почв / М. Е. Баранов, Л. А. Герасимова, С. В. Хижняк, П. А. Дубынин, И. А. Клешнина // Сибирский журнал науки и технологий. – 2017. – Т. 18. – N 4.

Безруких, В. А. Географические особенности устойчивого развития аграрного природопользования Красноярского края / В. А. Безруких, О. Ю. Елин // Вестник Тюменского государственного университета. Социально-экономические и правовые исследования. – 2012. – N 7. – С. 24-29

Биофизика: учеб. для студентов высш. учеб. заведений / под ред. проф. В.Ф. Антонова. — М. : Гуманитар. изд. центр ВЛАДОС, 1999. — 288 с.

Бутенко, Г. С. Содержание 3, 4-бенз (а) пирена в почвах техногенно загрязненных территорий / Г. С. Бутенко, Д. Е. Полонская // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2012. – N 7. – С. 86-90.

Ваганов, Е. А. Оценка загрязнения почвы в районах нефтегазовых месторождений северных территорий Красноярского края / Е. А. Ваганов, С. В. Михайлюта, В. В. Заворуев // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. – 2013. – N 10. – С. 4-5.

Вальков, В. Ф. Почвоведение: Учебник для вузов / В. Ф. Вальков, К.Ш. Казеев, С.И. Колесников — Москва: ИКЦ «МарТ», Ростов н/Д: Издательский центр «МарТ», 2004. – 496с. (Серия «Учебный курс»).

Виноградова, Л. И. Экологические проблемы в Красноярском крае при добыче полезных ископаемых / Л. И. Виноградова // Современные проблемы землеустройства, кадастров, природообустройства и повышения безопасности труда в АПК. – 2021. – С. 86-89.

Водянова, М. А. Анализ существующих микробиологических препаратов, используемых для биodeградации нефти в почве / М. А. Водянова, Е. И. Хабарова, Л. Г. Донерьян // Горный информационно-аналитический бюллетень (научно-технический журнал). – 2010. – N 7. – С. 253-258

Волгина, Т. Н. Пути распространения пестицидов в объектах окружающей среды й автономной области / Т. Н. Волгина, В. Т. Новиков, Д. В. Регужева // Региональные проблемы. – 2010. – Т. 13. – N 1. – С. 76-81.

Волошин, Е. И. Особенности фонового содержания микроэлементов в пахотных почвах Красноярского края / Е. И. Волошин // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2012. – N 5. – С. 147-149

Волошин, Е. И. Мониторинг содержания тяжелых металлов и фтора в почвах сельскохозяйственных угодий учхоза «Миндерлинское» / Е. И. Волошин, В. К. Ивченко, Ю. К. Пикулин // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2020. – N 5 (158). – С. 10-16.

Высоцкий, С. П. Влияние различных факторов на растворимость металлов и степень удаления соединений железа из раствора / С. П. Высоцкий, Т. И. Степаненко // Вестник Донецкого национального технического университета. – 2016. – N 1. – С. 21-26.

Гигиенические нормативы ГН 2.1.7.2041-06. Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в почве. – М.: Минздрав России, 2006. – 68 с.

Горбунов, А. В. Ядерно-физические методы анализа в экологии: воздействие геоэкологических факторов на микроэлементный баланс организма человека / А. В. Горбунов, С. М. Ляпунов, О. И. Окина, М. В. Фронтасьева, С. С. Павлов // Физика элементарных частиц и атомного ядра. – 2012. – Т. 43. – N 6.

Горбылева, А. И. Почвоведение: учеб. пособие / А. И. Горбылева, В. Б. Воробьев, Е. И. Петровский; под ред. А. И. Горбылевой. – 2-е изд., перераб.- Минск: Новое знание; М.: ИНФРА-М, 2014. – 400 с., [2] л. ил. : ил. – (Высшее образование: Бакалавриат).

Горлушкина, К. С. Содержание тяжелых металлов в почвах промышленных предприятий г. Красноярска / К. С. Горлушкина, С. Э. Бадмаева // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2018. – N 6 (141). – С. 254-258.

ГОСТ 17.4.4.02-2017 Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа. – М.: Стандартиформ. – 2018. – 9 с.

ГОСТ 17.4.1.02-83 Охрана природы. Почвы. Классификация химических веществ для контроля загрязнения. – М.: Стандартиформ. – 2008. – 3 с.

ГОСТ 26213-2021 Почвы. Методы определения органического вещества. – М.: Российский институт стандартизации. – 2021. – 7 с.

ГОСТ 26483-85 Почвы. Приготовление солевой вытяжки и определение ее рН по методу ЦИНАО. – М.: Стандартиформ. – 1985. – 4 с.

ГОСТ 26423-85 Почвы. Методы определения удельной электрической проводимости, рН и плотного остатка водной вытяжки. – М.: Стандартиформ. – 2011. – 4 с.

Дабах, Е. В. Альго-микологическая оценка состояния почв в зоне влияния Кирово-Чепецкого химического комбината / Е. В. Дабах, Л. В. Кондакова, Л. И. Домрачева, С. С. Злобин // Почвоведение. – 2013. – N 2. – С. 187.

Давыдова, Н. Д. Выявление химических элементов-загрязнителей и их первичное распределение на территории степей юга Минусинской котловины / Н. Д. Давыдова, Т. И. Знаменская, Д. А. Лопаткин // Сибирский экологический журнал. – 2013. – Т. 20. – N 2. – С. 285-294.

Демиденко, Г. А. Агрехимический мониторинг сельскохозяйственных земель Красноярской лесостепи / Г. А. Демиденко // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2017. – N 7. – С. 3-9.

Дерябин, Д. Г. Особенности использования биолюминесцентных тест-систем при исследовании абиотических сред и биологических жидкостей / Д. Г. Дерябин, Е. Г. Поляков, И. Ф. Каримов // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2004. – N 5. – С. 101-104.

Дерябин, Д. Г. Влияние катионов k^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} на активность бактериальных биолюминесцентных систем *in vitro* и *in vivo* / Д. Г. Дерябин, Е. С. Алешина, И. Ф. Каримов // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2006. – N 12-2. – С. 77-82.

Добровольский, Г. В. Деградация почв угроза глобального экологического кризиса / Г. В. Добровольский // Век глобализации. – 2008. – N 2. – С. 54-65.

Добровольский, В. В. Роль органического вещества почв в миграции тяжелых металлов / В. В. Добровольский // Природа. – 2004. – N 7. – С. 35-39.

Егорова, Е. Н. Биотестирование и биоиндикация окружающей среды: учеб. пособие по курсу "Биотестирование" (для студентов спец. 013100) / Е. И. Егорова, В. И. Белолипецкая; М-во образования Рос. Федерации, Обнин, ин-т атом, энергетики. Фак, естеств, наук. - Обнинск: ИАТЭ, 2000. – 78 с.

Есимбекова, Е. Н. Исследование чувствительности трехферментных систем с бактериальной люциферазой при биотестировании водных экосистем : автореф. дис. канд. биол. наук: 03.00.02 / Е. Н. Есимбекова. – Красноярск, 2000. – 21 с.

Есимбекова, Е. Н. Ферментативное биотестирование: научные основы и применение / Е.Н. Есимбекова, И.Г. Торгашина, В.П. Калябина, В.А. Кратасюк // Сибирский экологический журнал. – 2021. – Т. 28. – N 3. – С. 364-382.

Ефремова, Т. Т. Эколого-геохимическая оценка уровней загрязнения тяжелыми металлами и серой бугристых торфяников юга Таймыра / Т. Т. Ефремова, С. П. Ефремов // Сибирский экологический журнал. – 2014. – Т. 21. – N 6. – С. 965-974.

Жирнова, Д. Ф. Оценка полиэлементного загрязнения почв рекреационных зон левобережной части города Красноярск / Д. Ф. Жирнова, Ю. А. Холдаенко // Эпоха науки. – 2017. – N 11. – С. 146-153.

Зазнобина, Т. В. Аккумуляция тяжелых металлов в почвах лесостепной зоны Красноярского края / Т. В. Зазнобина // Новости науки в АПК. – 2018. – N 2-2. – С. 61-62.

Зазнобина, Т. В. Содержание тяжелых металлов в почвах пригородной зоны г. Красноярска / Т. В. Зазнобина, О. В. Иванова, Е. В. Алхименко // Вестник пермского национального исследовательского политехнического университета. Прикладная экология. Урбанистика. – 2019. – N 2. – С. 59-68.

Захарова, О. Л. Пространственное распределение тяжелых металлов в почвах как геоэкологическая проблема предприятий теплоэнергетики / О. Л.

Захарова, И. Н. Савельева, В. И. Полонский, А. В. Сумина // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2018. – N 6 (141). – С. 266-270.

Ильичёв, Л. Ф. Философский энциклопедический словарь. — М.: Советская энциклопедия. Гл. редакция: Л. Ф. Ильичёв, П. Н. Федосеев, С. М. Ковалёв, В. Г. Панов. 1983.

Карпенко, Л. В. Современное состояние торфяной залежи болот лесотундровой подзоны Красноярского края и геохимическая оценка ее загрязнения / Л. В. Карпенко // Сибирский экологический журнал. – 2014. – Т. 21. – N 6. – С. 953-964.

Карпухин, М. М. Влияние компонентов почвы на поглощение тяжелых металлов в условиях техногенного загрязнения / М. М. Карпухин, Д. В. Ладонин // Почвоведение. – 2008. – N 11. – С. 1388-1398.

Козлова, А. А. Фторидное загрязнение серых лесных почв, находящихся в зоне влияния Иркутского алюминиевого завода / А. А. Козлова, О. Г. Лопатовская, Н. И. Гранина, Е. В. Чипанина, Е. В. Кучменко, А. Н. Бобров // Известия Иркутского государственного университета. Серия «Биология. Экология». – 2011. – Т.4. – N 1. – С. 87-94.

Колесников, С. И. Влияние загрязнения тяжелыми металлами и нефтью на биологические свойства чернозема выщелоченного слитого / С. И. Колесников, З. Р. Тлехас, К. Ш. Казеев, Е. Н. Ротина, В. Ф. Вальков // Агрохимия. – 2010. – N 7. – С. 62-67.

Колосова, Е. М. Комплексный ферментативный биотест для оценки загрязнения почвы / Е. М. Колосова, О. С. Сутормин, Е. Н. Есимбекова, В. И. Лоншакова-Мукина, В. А. Кратасюк // Доклады академии наук. – 2019. – N 1. – С. 103-107.

Корнилова, А. Г. Элементный анализ почв с их предварительной деструкцией химическими методами / А. Г. Корнилова, Т. З. Лыгина, А. А. Шинкарев, А. С. Гордеев, О. В. Михайлов // Вестник Казанского технологического университета. – 2011. – N. 6. – С. 36-43.

Коротченко, И. С. Тяжелые металлы в техногенных поверхностных образованиях Красноярской агломерации / И. С. Коротченко, Е. Я. Мучкина // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – N 4. – С. 224-224.

Косицина, А. А. Влияние водорастворимого фтора на загрязнение почв и растений: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.00.16 / А. А. Косицина – Красноярск, 2009. – 19 с.

Космаков, В. И. Этапы лесохозяйственной рекультивации земель, нарушенных при открытой добыче полезных ископаемых / В. И. Космаков, С. Э. Бадмаева, А. А. Бакач // International agricultural journal. – 2021. – Т. 64. – N 6. – С. 765-784.

Кратасюк, В. А. Изучение механизма действия 2, 4-динитрофторбензола на бактериальную люминесценцию *in vitro* / В. А. Кратасюк, А. М. Фиш // Биохимия. – 1980. – Т. 45. – N 7. – С. 1175-1182.

Кратасюк, В. А. Биолюминесцентный ингибиторный микроанализ : автореферат дис. канд. биол. наук : 03.00.02 : защищена 15.03.1985 / В. А. Кратасюк ; науч. рук.: И. И. Гительзон, А. М. ; Акад. наук СССР, Сиб. отд-ние, Ин-т биофизики. - Красноярск, 1985. - 17 с.

Кратасюк, В. А. Использование светящихся бактерий в биолюминесцентном анализе / В. А. Кратасюк, И. И. Гительзон // Успехи микробиологии. – 1987. – Т. 21. – С. 3-30.

Крушель, Е. Г. Исследование алгоритма расчета выбросов загрязняющих веществ от автотранспорта на примере центральной магистрали города Камышина / Е. Г. Крушель, И. В. Степанченко, А. Э. Панфилов, О. В. Степанченко // Сборник научных трудов Sworld. – 2013. – Т. 6. – N 2. – С. 76-83.

Ленинджер, А. Основы биохимии: в 3-х т. Т. 1. / А. Ленинджер. Пер. с англ. – М.: Мир, 1985. – 367 с., ил.

Лоншакова-Мукина, В. И. Ферментативный реагент на основе иммобилизованной бутирилхолинэстеразы для определения фосфорорганических соединений / В.И. Лоншакова-Мукина, Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк // экологический мониторинг: методы и подходы: материалы Международной

сателлитной конференции «Экологический мониторинг: методы и подходы» и XX Международного симпозиума «Сложные системы в экстремальных условиях». Красноярск, Сибирский федеральный университет, 20–24 сентября 2021 г. – 2021. – С. 131-134.

Лысанова, Г. И. Потенциал земельных ресурсов регионов Сибири / Г. И. Лысанова, А. А. Сороковой // География и природные ресурсы. – 2015. – Т. 2. – С. 149-155.

М-МВИ 80-2008 Методика выполнения измерений массовой доли элементов в пробах почв, грунтов и донных отложениях методами атомно-эмиссионной и атомно-абсорбционной спектроскопии. – ООО «Мониторинг». – С.-П. – 2008. – 27 с.

Максимова, Е.Н. Современное состояние городских почв, на примере пос. Жилкино (г. Иркутск) / Е. Н. Максимова, О. Г. Лопатовская // Почвенные ресурсы Сибири: вызовы XXI века. Томск: Издательский дом Томского гос. ун-та, – 2017. – Ч. 2. – С. 83-86.

Матвиенко, А. И. Влияние азота на минерализацию углерода в почвах под лиственницей сибирской и сосной обыкновенной / дисс. канд. биол. наук. – Красноярск, 2017. – 147 с.

Микайылов, Ф. Моделирование некоторых почвенных процессов / Ф. Микайылов // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2014. – N 7 (117). – С. 59-64

Морозова, О. Г. Экологические проблемы загрязнения почв территорий Красноярского края / О. Г. Морозова, М. А. Янова, П. В. Миронов, Н. С. Веселкова, А. С. Савельев // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2017. – N 3. – С. 101-105.

МР Методические рекомендации по выявлению деградированных и загрязненных земель / А. С. Яковлев, В. Н. Шептухов, Ю. М. Матвеев и др. // Сборник нормативных актов "Охрана почв". – РЭФИА Москва, 1996. – С. 174–198.

МУ 2.1.7.730-99. Почва, очистка населенных мест, бытовые и промышленные отходы, санитарная охрана почвы // Гигиеническая оценка качества почвы населенных мест: методические указания. – М., 1999. – 38 с.

О состоянии и использовании земель Красноярского края за 2018 г. [Электронный ресурс]: доклад Федеральной службы государственной регистрации, кадастра и картографии (Росреестр), Управления Федеральной службы государственной регистрации, кадастра и картографии по Красноярскому краю (Управление Росреестра по Красноярскому краю). – Красноярск. – 2019. Систем. требования: Adobe Acrobat Reader. URL: <https://goo-gl.me/vbRB0> (дата обращения: 24.03.2022)

Олькова, А. С. Разработка стратегии биотестирования водных сред с учетом многофакторности ответных реакций тест-организмов: автореф. дис. д-р. биол. наук: 03.02.08 / А. С. Олькова. – Киров, 2020. – 22 с.

Патент 2413771 Российская Федерация, МПК С12Q 1/00. Экспресс-способ биотестирования природных, сточных вод и водных растворов / В. А. Кратасюк, Е. Н. Есимбекова; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ", Кратасюк Валентина Александровна, Есимбекова Елена Николаевна. – заявл. 10.04.2009; опубл. 10.03.2011.

Патент 2171579 Российская Федерация. Состав для стимулирования роста сельскохозяйственных культур / А. А. Антоненко, А. П. Сафонов. заявл. 1999-06-16; опубл. 10.08.2001

Патент РФ 2229807. Состав для стимулирования роста и развития сельскохозяйственных культур / И. А. Гайсин, В. И. Реут, Р. Н. Сагитова, Т. М. Лузанова, Ф. А. Хисамеева, М. Л. Пономарева, Р. А. Асрутдинова, А. М. Козин. Патентообладатель(и): Общество с ограниченной ответственностью Научно-производственная фирма "ТОРС". Заявл. 2002-07-10; опубл. 10.06.2004

Патент 2258676 Российская Федерация, МПК С2, С02F3/34, С12Q1/04, G01N33/18. Способ оценки очистки сточных вод от хрома, цинка, меди / Г. Н.

Соловых, Е. А. Рябцева, В. В. Минакова; заявитель и патентообладатель Оренбургская Государственная медицинская академия (ОГМА). – N 2003126248.13; заявл. 27.08.2003; опубл. 20.08.2005.

Патент 2202619 Российская Федерация, МПК ⁷ C12Q1/18, C12Q1/06 C12Q1/18, C12R1:07. Способ определения общей токсичности твердой, жидкой и газообразной сред/ А. А. Туманов, М. Н. Глухова, Г. М. Субботина, П. А. Крестьянинов, А. С. Туманов; заявитель и патентообладатель Научно-исследовательский институт химии Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского. – № 2001100968/13; заявл. 09.01.2001; опубл. 20.04.2003

Патент 2039825 Российская Федерация, МПК C1, C12Q1/02, G01N33/18. Способ определения токсичности объектов внешней среды/ Д. О. Виноходов, В. О. Виноходов; заявитель и патентообладатель Виноходов Дмитрий Олегович; Виноходов Владимир Олегович. – № 5036054/13; заявл. 25.03.1992; опубл. 20.07.1995.

Патент 2232805 Российская Федерация, МПК C2, C12N1/20, C12Q1/02. Штамм бактерий вида *acinetobacter calcoaceticus* var. *Iwoffii* 12r, используемый в качестве индикаторного при биотестировании питьевой воды (r-резистентный) / заявитель и патентообладатель Федеральное государственное учреждение науки и здравоохранения “Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. акад. И. Н. Блохиной”. – № 2002116708/13; заявл. 21.06.2002; опубл. 20.07.2004

ПНД Ф. Т. 14.1: 2: 3: 4.11-04 (ПНД Ф Т 16.1: 2.3: 3.8-04) Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-системой " Эколюм" на приборе" Биотокс-10" // ООО НЦ" Экологическая перспектива. – 2007.

ПНД Ф 14.1:2:4:15-09 (16.1:2:2.3:3.13-09) ФР.1.31.2009.06301. Методика выполнения измерений индекса токсичности почв, почвогрунтов вод и отходов по

изменению подвижности половых клеток млекопитающих *in vitro* / А. П. Еськов, М. А. Тимофеев, Р. И. Каюмов, В. А. Терехова. — Москва: Москва, 2009. — 28 с.

Побилат, А. Е. Кадмий в почвах и растениях Средней Сибири / А. Е. Побилат, Е. И. Волошин // Микроэлементы в медицине. — 2017. — Т. 18. — N 3. — С. 36-41.

Побилат, А. Е. Марганец в почвах и растениях южной части Средней Сибири / А. Е. Побилат, Е. И. Волошин // Микроэлементы в медицине. — 2017. — Т. 18. — N 2. — С. 43-47.

Побилат, А. Е. Особенности содержания свинца в почвах и растениях Средней Сибири / А. Е. Побилат, Е. И. Волошин // Микроэлементы в медицине. — 2017. — Т. 18. — N 4. — С. 36-40.

Побилат, А. Е. Экологическая оценка содержания ртути в агроценозах Средней Сибири / А. Е. Побилат, Е. И. Волошин // Микроэлементы в медицине. — 2019. — Т. 20. — N 4. — С. 57-62.

Полевой определитель почв России. — М.: Почвенный ин-т им. В. В. Докучаева, 2008. — 182 с.

Портнова, А. В. Иммобилизация ионов меди (II) гуминовой кислотой, переведенной в малорастворимое состояние / А. В. Портнова, В. В. Вольхин // Вестник Нижегородского университета им. НИ Лобачевского. — 2008. — N 4. — С. 71-75.

Потапов, А. Д. Экология: Учебник/ А. Д. Потапов. — 2-е изд., испр. и доп. — М.: Высш. шк., 2004. — 528 с.: ил. ISBN 5-06-003858-0

Припутина, И. В. Применение математических моделей ROMUL и Romul_Num для оценки эмиссии CO₂ и динамики органического вещества в серой лесной почве под листовенным лесом в южном Подмоскowie / И. В. Припутина, С. С. Быховец, П. В. Фролов, О. Г. Чертов, И. Н. Курганова, В. О. Гереню, Д. В. Сапронов, Т. Н. Мякшина // Почвоведение. — 2020. — N 10. — С. 1262-1275.

Приходько, А. П. Математическое моделирование биологических систем / А. П. Приходько, В. О. Попов, Г. А. Тереньтев // Актуальные научные исследования в современном мире. – 2021. – N 6-8. – С. 11-14.

Прокофьева, Т. В. Введение почв и почвоподобных образований городских территорий в классификацию почв России / Т. В. Прокофьева, М. И. Герасимова, О. С. Безуглова, К. А. Бахматова, А. А. Гольева, С. Н. Горбов, Е. А. Жарикова, Н. Н. Матинян, Е. Н. Наквасина, Н. Е. Сивцева // Почвоведение, 2014. – N 10. – С. 1155-1164.

Путилина, В. С. Адсорбция тяжелых металлов почвами и горными породами. Характеристики сорбента, условия, параметры и механизмы адсорбции / В. С. Путилина, И. В. Галицкая, Т. И. Юганова // Экология. Серия аналитических обзоров мировой литературы. – 2009. – N 90. – С. 1-155.

Родичева, Э.К. Билюминесцентные биотесты на основе светящихся бактерий для экологического мониторинга / Э. К. Родичева, А. М. Кузнецов, С. Е. Медведева // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2004. – 5 (30). – С. 96-100.

СанПиН 2.1.7.1287-03. Почва, очистка населенных мест, бытовые и промышленные отходы, санитарная охрана почвы. Санитарно-эпидемиологические требования к качеству почвы. [Электронный ресурс]. – режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/901859456>.

Сариев, А. Х. Восстановление почвенно-растительного покрова нарушенных тундровых земель / А. Х. Сариев, Н. Н. Чербакова, Н. Ю. Терентьева // Вестник КрасГАУ. – 2021. – N 7. – С. 73-81.

Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2021660358 Российская Федерация. Программное обеспечение для сопоставления стандартных результатов ферментативной активности сенсоров для анализа загрязнения почв : № 2021615905 : заявл. 20.04.2021 : опубл. 24.06.2021 / М. М. Байгин, Е.М. Колосова ; заявитель Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ).

Сергеева, Н. А. Теория систем и системный анализ : учеб. пособие / Н. А. Сергеева. – Красноярск : Сиб. федер. ун-т, 2013. – 110 с.

Советов, Б.Я. Моделирование систем: Учеб. для вузов / Б. Я. Советов, С. А. Яковлев – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. шк., 2001. – 343 с: ил.

Степанов, А. А. Ремедиация загрязненных городских почв с применением гуминовых препаратов / А. А. Степанов, О. С. Якименко // Живые и биокосные системы, 2016. – N 18. – С. 5.

Степановских, А. С. Экология: Учебник для вузов / А. С. Степановских – М.: ЮНИТИ-ДАНА, 2001. – 703 с.

Степин, В. С. Философия науки. Общие проблемы : учебник для аспирантов и соискателей ученой степени кандидата наук / В. С. Степин. — М.: Гардарики, 2006. — 384 с.

Сутормин, О. С. Ферментативное биотестирование почв: сравнение чувствительности к токсикантам моно-, би- и триферментной систем / О. С. Сутормин, Е. М. Колосова, Е. В. Немцева, О. В. Искорнева., А. Е. Лисица., В. С. Матвиенко, Е.Н. Есимбекова, В. А. Кратасюк // Цитология. – 2018. – N 10. – С. 826-829.

Тарасова, А. С. Использование биолюминесцентных систем для изучения закономерностей детоксикации растворов модельных поллютантов гуминовыми веществами: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.01.02 / А. С. Тарасова. – Красноярск, 2012. – 22 с.

Терехова, В. А. Биотестирование почв: подходы и проблемы / В. А. Терехова // Почвоведение. – 2011. – N 2. – С. 190-198.

Туманов, А. А. Разработка основ химико-биологических методов анализа / А. А. Туманов, О. В. Барина, М. Н. Глухова, И. Е. Постнов, Г. М. Субботина. – отчет о НИР № 96-03-32619 (Российский фонд фундаментальных исследований), 1996.

Устюгов, В. А. История и философия науки. Хрестоматия [Электронный ресурс] / сост. В. А. Устюгов. – Красноярск: Сиб. федер. ун-т, 2013. – Систем.

требования: PC не ниже класса Pentium I; 128 Mb RAM; Windows 98/XP/7; Adobe Reader V8.0 и выше. – Загл. с экрана. –250 с.

Федеральный закон от 10.01.2002 N 7-ФЗ (ред. от 29.07.2017) "Об охране окружающей среды" : принят Гос. Думой 20 дек. 2001 г.: одобрен Советом Федерации 26 дек. 2001 г.

Фомина, Н. В. Комплексная экологическая характеристика почвы техногенно-загрязненного ландшафта / Н. В. Фомина, М. В. Чижевская // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2013. – N 5. – С. 142-147.

ФР 1.31.2017.27474 Количественный химический анализ почв. Методика измерений массовой доли водорастворимых форм фторидов в пробах почв методом потенциометрии. – ФГБУ «ЦЛАТИ по СФО». – Красноярск. – 2017. – 18 с.

Фрид, А. С. Анализ процессов сорбции и миграции веществ в почве с помощью математических моделей / А. С. Фрид // Почвоведение. – 2012. – N 9. – С. 953-953.

Химический анализ почв : учебное пособие / О. Г. Растворова, Д. П. Андреев, Э. И. Гагарина, Г. А. Касаткина, Н. Н. Федерова // Издательство С.-Петербургского университета, 1995. – 264 с. ISBN 5-288-01019-6.

Цугленок, Н. В. Пути миграции тяжелых металлов в водных объектах и почвах юго-западной части Красноярского края / Н. В. Цугленок, Т. Ф. Солохина, В. В. Матюшев, М. В. Родионов, О. Г. Морозова // Вестник КрасГАУ. – 2003. – N 2. – С. 143-145.

Чупрова, В. В. Оценка агроэкологического состояния почв, вовлеченных в разработку песчано-гравийных карьеров Канского района Красноярского края / В. В. Чупрова, А. А. Белоусов, Е. Н. Белоусова, Ю. В. Горбунова // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2019. – N 3 (144). – С. 16-21.

Шапченкова, О. А. Тяжелые металлы и сера в почвах техногенных ландшафтов севера Средней Сибири / О. А. Шапченкова, Ю. И. Ершов, А. А.

Цуканов // Водные и экологические проблемы Сибири и Центральной Азии. – 2017. – С. 115-118.

Шахова, Т. С. Оценка загрязнения почв в окрестностях нефтеперерабатывающих предприятий (гг. Омск, Ачинск, Павлодар) / Т. С. Шахова // Проблемы геологии и освоения недр: труды XXII Международного симпозиума имени академика МА Усова студентов и молодых ученых, посвященного 155-летию со дня рождения академика В. А. Обручева, 135-летию со дня рождения академика М. А. Усова, основателей Сибирской горно-геологической школы, и 110-летию первого выпуска горных инженеров в Сибири, Томск, 2-7 апреля 2018 г.. – 2018. – Т. 1. – С. 873-875.

Шеин, Е. В. Математические физически обоснованные модели в почвоведении: история развития, современное состояние, проблемы и перспективы (аналитический обзор) / Е. В. Шеин // Почвоведение. – 2015. – N 7. – С. 816-816.

Шеин, Е. В. Оценка чувствительности, настройка и сравнение математических моделей миграции пестицидов в почве по данным лизиметрического эксперимента / Е. В. Шеин, А. А. Кокорева, В. С. Горбатов, А. Б. Умарова, В. Н. Колупаева, К. А. Перевертин // Почвоведение. – 2009. – N 7. – С. 826-835.

Шишов, Л. Л. Классификация и диагностика почв России / Авторы и составители: Л. Л. Шишов, В. Д. Тонконогов, И. И. Лебедева, М. И. Герасимова. – Смоленск: Ойкумена, 2004. – 342 с.

Шорина, Т. С. Влияние нефти на физические свойства чернозема обыкновенного степной зоны Урала / Т. С. Шорина, А. М. Русанов, А. М. Сулейманова // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2010. – N 6 (112). – С. 137-140.

Шпедт, А. А. Мониторинг плодородия почв и охрана земель: учеб. пособие // Краснояр. Гос. аграр. ун-т. – 2010. – 128 с.

Экологическая биофизика. Учебное пособие: В 3 т. Под ред. И.И. Гительзона, Н.С. Печуркина. Т. 1. Фотобиофизика экосистем / И.И. Гительзон,

В.А. Кратасюк, В.Н. Лопатин, А.Д. Апонасенко, В.С. Филимонов, В.В. Фишов, З.Г. Холостова, Н.А. Гаевский, Ю.С. Григорьев, А.А. Тихомиров. – М.: Логос, 2002. – 328 с.: ил.

Яковлев, А. С. Экологическое нормирование почв и управление их качеством / А. С. Яковлев, М. В. Евдокимова // Почвоведение. – 2011. – N 5. – С. 582-596.

Abdollahi, M. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following subchronic exposure to Malathion / M. Abdollahi, S. Mostafalou, S. Pournourmohammadi, & S. Shadnia // Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. – 2004. – Vol. 137. – N 1. – P. 29-34.

Alcorta, D. A. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts / D. A. Alcorta, Y. Xiong, D. Phelps, G. Hannon, D. Beach, J. C. Barrett // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1996 – Vol. 93, – N 24. – P. 13742–13747.

Antunes, S. C. Structural effects of the bioavailable fraction of pesticides in soil: suitability of elutriate testing / S. C. Antunes, L. Pereira Joana, A. Cachada, C. Duarte Armando, F. Goncalves, P. Sousa José, R. Pereira // Journal of hazardous materials. – 2010. – Vol. 184. – N 1. – P. 215-225.

Arduini, F. Detection of carbamic and organophosphorous pesticides in water samples using a cholinesterase biosensor based on Prussian Blue-modified screen-printed electrode / F. Arduini, F. Ricci, C. S. Tuta, D. Moscone, A. Amine, G. Palleschi // Analytica Chimica Acta. – 2006. – Vol. 580. – N 2. – P. 155-162.

Atlas, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective / R. M. Atlas // Microbiological reviews. – 1981. – Vol. 45. –N. 1. – P. 180-209.

Bierkens, J. Comparative sensitivity of 20 bioassays for soil quality / J. Bierkens, G. Klein, P. Corbisier, R. Van Den Heuvel, L. Verschaeve, R. Weltens, G. Schoeters // Chemosphere. – 1998. – Vol. 37. – N 14-15. – P. 2935-2947.

Bliss, C. I. Some principles of bioassay / C. I. Bliss // American Scientist. – 1957. – Vol. 45. – N 5. – P. 449-466.

Blondin, G. A. An in vitro submitochondrial bioassay for predicting acute toxicity in fish / G. A. Blondin, L. M. Knobeloch, H. W. Read, J. M. Harkin // Aquatic Toxicology and Environmental Fate: Eleventh Volume. – ASTM International, 1988.

Boluda, R., Soil plate bioassay: an effective method to determine ecotoxicological risks / R. Boluda, L. Roca-Pérez, L. Marimón // Chemosphere. – 2011. – Vol. 84. – N 1. – P. 1-8.

Bulich, A. A. Use of luminescent bacteria for determining toxicity in aquatic environments / A. A. Bulich // Aquatic Toxicology: Proceedings of the Second Annual Symposium on Aquatic Toxicology. – ASTM International, 1979.

Cairns, J. The myth of the most sensitive species / J. Cairns // BioScience. – 1986. – Vol. 36. – N 10. – P. 670-672.

Chang, J. C. Use of the Microtox® assay system for environmental samples / J. C. Chang, P. B. Taylor, F. R. Leach // Bulletin of environmental contamination and toxicology. – 1981. – V. 26. – №. 1. – P. 150-156.

Chapman, P. M. The sediment quality triad approach to determining pollution-induced degradation / P. M. Chapman // Science of the Total Environment. – 1990. – Vol. 97. – P. 815-825.

Danilov, V. S. The inhibition of bacterial bioluminescence by xenobiotics / V. S. Danilov, A. D. Ismailov, N. A. Baranova // Xenobiotica. – 1985. – Vol. 15. – N 4. – P. 271-276.

Douglas, L. A. A rapid method of evaluating different compounds as inhibitors of urease activity in soils / L. A. Douglas, J. M. Bremner // Soil Biology and Biochemistry. – 1971. – Vol. 3. – N 4. – P. 309-315.

Esimbekova, E. N. Bioluminescent enzymatic rapid assay of water integral toxicity / E. N. Esimbekova, A. M. Kondik, V. A. Kratasyuk // Environmental monitoring and assessment. – 2013. – Vol. 185. – N 7. – P. 5909-5916.

Esimbekova, E. Application of enzyme bioluminescence in ecology / E. Esimbekova, V. Kratasyuk, O. Shimomura // Adv Biochem Eng Biotechnol. – 2014. – Vol. 144. – P. 67-109.

Esimbekova, E. N. Bioluminescent enzyme inhibition-based assay to predict the potential toxicity of carbon nanomaterials / E. N. Esimbekova, E. V. Nemtseva, A. E. Bezrukikh, G. V. Jukova, A. E. Lisitsa, V. I. Lonshakova-Mukina, N. V. Rimatskaya, O. S. Sutormin, V. A. Kratasyuk // *Toxicology in Vitro*. – 2017. – Vol. 45. – P. 128-133.

Fernández-Piñas, F. Evaluation of the ecotoxicity of pollutants with bioluminescent microorganisms / F. Fernández-Piñas, I. Rodea-Palomares, F. Leganés, M. González-Pleiter, M. A. Muñoz-Martín // *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology-Vol. 2*. – Springer Berlin Heidelberg, 2014. – P. 65-135.

Fulladosa, E. Patterns of metals and arsenic poisoning in *Vibrio fischeri* bacteria / E. Fulladosa, J. C. Murat, M. Martínez, I. Villaescusa // *Chemosphere*. – 2005. – Vol. 60. – N 1. – P. 43-48.

Gaudino, S. The role of different soil sample digestion methods on trace elements analysis: a comparison of ICP-MS and INAA measurement results / S. Gaudino, C. Galas, M. Belli // *Accreditation and quality assurance*. – 2007. – Vol. 12. – N 2. – P. 84-93.

Gerasimova, M. A. Effects of potassium halides on bacterial bioluminescence / M. A. Gerasimova, N. S. Kudryasheva // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2002. – Vol. 66. – N 3. – P. 218-222.

Guo, W. Soil spatial information management system based on WebGIS and barcode technology / W. Guo, X. Yi, Y. Chen, X. Wang // *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*. – 2010. – Vol. 26. – N 9. – P. 251-256.

Haque, M. A. Variation in salinity through the soil profile in south coastal region of Bangladesh / M. A. Haque // *Journal of Bangladesh Academy of Sciences*. – 2018. – Vol. 42. – N 1. – P. 11-23.

Harvey, E. N. Review of bioluminescence / E. N. Harvey // *Annual Review of Biochemistry*. – 1941. – Vol. 10. – N 1. – P. 531-552.

Hassan, S. H. Toxicity assessment using different bioassays and microbial biosensors / S. H. Hassan, S. W. Van Ginkel, M. A. Hussein, R. Abskharon, S. E. Oh // *Environment international*. – 2016. – Vol. 92. – P. 106-118.

Holland, H. T. Use of fish brain acetylcholinesterase to monitor pollution by organophosphorus pesticides / H. T. Holland, D. L. Coppage, P. A. Butler // *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. – 1967. – Vol. 2. – N 3. – P. 156-162.

Hsieh, C. Y. Toxicity of the 13 priority pollutant metals to *Vibrio fisheri* in the Microtox® chronic toxicity test / C. Y. Hsieh, M. H. Tsai, D. K. Ryan, O. C. Pancorbo // *Science of the total environment*. – 2004. – Vol. 320. – N 1. – P. 37-50.

Huang, P. M. Handbook of soil sciences: properties and processes / P. M. Huang, Y. Li, M. E. Sumner (Ed.). – CRC Press, – 2011, – Vol. 2, – Chapter 8, – P. 157-186.

ISO 19204: 2017. Soil quality — Procedure for site-specific ecological risk assessment of soil contamination (soil quality TRIAD approach). – Geneva. – 2017.

Juvonen, R. A battery of toxicity tests as indicators of decontamination in composting oily waste / R. Juvonen, E. Martikainen, E. Schultz, A. Joutti, J. Ahtiainen, M. Lehtokari // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2000. – Vol. 47. – N 2. – P. 156-166.

Kalyabina, V. P. Principles for construction of bioluminescent enzyme biotests for analysis of complex media / V. P. Kalyabina, E. N. Esimbekova, I. G. Torgashina, K. V. Kopylova, V. A. Kratasyuk // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – Pleiades Publishing, 2019. – Vol. 485. – N 1. – P. 107-110.

Kannan, K. Trace organic contaminants, including toxaphene and trifluralin, in cotton field soils from Georgia and South Carolina, USA / K. Kannan, S. Battula, B. G. Loganathan, C. S. Hong, W. H. Lam, D. L. Villeneuve, K. M. Aldous // *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. – 2003. – Vol. 45. – N 1. – P. 30-36.

Khan, M. I. Biototoxicity assessment of pyrene in soil using a battery of biological assays / M. I. Khan, S. A. Cheema, X. Tang, C. Shen, S. T. Sahi, A. Jabbar, Y. Chen // *Archives of environmental contamination and toxicology*. – 2012. – Vol. 63. – N 4. – P. 503-512.

Kim, J. Effect of sodium fluoride on male mouse fertility / J. Kim, W. S. Kwon, M. S. Rahman, J. S. Lee, S. J. Yoon, Y. J. Park, Y. A. You, M. G. Pang // *Andrology*. – 2015. – Vol. 3. – N 3. – P. 544-551.

Ko, K. S. Evaluation of the toxic effects of arsenite, chromate, cadmium, and copper using a battery of four bioassays / K. S. Ko, P. K. Lee, I. C. Kong // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2012. – Vol. 95. – N 5. – P. 1343-1350.

Kohn, G. K. Bioassay as a monitoring tool / G. K. Kohn // *Residue reviews*. – Springer, New York, NY, 1980. – P. 99-129.

Kolosova, E. M. Bioluminescent enzyme inhibition-based assay for the prediction of toxicity of pollutants in urban soils / E. M. Kolosova, O. S. Sutormin, L. V. Stepanova, A. A. Shpedt, N. V. Rimatskaya, I. E. Sukovataya, V. A. Kratasyuk // *Environmental Technology & Innovation*. – 2021. – Vol. 24. – P. 101842.

Kolosova, E. M. Bioluminescent-inhibition-based biosensor for full-profile soil contamination assessment / E. M. Kolosova, O. S. Sutormin, A. A. Shpedt, L. V. Stepanova, V. A. Kratasyuk // *Biosensors*. – 2022. – Vol. 12. – P. 353.

Konrad, J. G. Soil Degradation of Malathion, a Phosphorodithioate Insecticide 1 / J. G. Konrad, G. Chesters, D. E. Armstrong // *Soil Science Society of America Journal*. – 1969. – Vol. 33. – N 2. – P. 259-262.

Krämer, U. Transition metal transport / U. Krämer, I. N. Talke, M. Hanikenne // *FEBS letters*. – 2007. – Vol. 581. – N 12. – P. 2263-2272.

Krämer, U. Metal hyperaccumulation in plants / U. Krämer // *Annual review of plant biology*. – 2010. – Vol. 61. – P. 517-534.

Kratasyuk, V. Applications of luminous bacteria enzymes in toxicology / V. Kratasyuk, E. Esimbekova // *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. – 2015. – Vol. 18, Issue 10. – P. 952-959.

Kratasyuk, V. A. Software for matching standard activity enzyme biosensors for soil pollution analysis / V. A. Kratasyuk, E. M. Kolosova, O. S. Sutormin, V. I. Lonshakova-Mukina, M. M. Baygin, N. V. Rimatskaya, I. E. Sukovataya, A. A. Shpedt // *Sensors*. – 2021. – Vol. 21(3). – P. 1017.

Kudryasheva, N.S. Bioluminescence and exogenous compounds: Physico-chemical basis for bioluminescent assay / N. S. Kudryasheva // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2006. – Vol. 83. – N 1. – P. 77-86.

Kumaran, S. Application of a cholinesterase biosensor to screen for organophosphorus pesticides extracted from soil / S. Kumaran, M. Morita // *Talanta*. – 1995. – Vol. 42. – N 4. – P. 649-655.

Kuznetsov, A. M. Analysis of river water by bioluminescent biotests / A. M. Kuznetsov, E. K. Rodicheva, S. E. Medvedeva // *Luminescence*. - 1999. - V.14. - N5. - P.263-265.

Ladd, J. N. Soil enzymes / J. N. Ladd // *Soil organic matter and biological activity*. – Springer, Dordrecht, 1985. – P. 175-221.

Ladyman, J. What is a complex system? / J. Ladyman, J. Lambert, K. Wiesner // *European Journal for Philosophy of Science*. – 2013. – V. 3. – N 1. – P. 33-67

Lee, A. G. Interactions of insecticides with biological membranes / A. G. Lee, J. Malcolm East, P. Balgavy // *Pesticide Science*. – 1991. – Vol. 32. – N 3. – P. 317-327.

Lors, C. Comparison of solid and liquid-phase bioassays using ecoscores to assess contaminated soils / C. Lors, J. F. Ponge, M. M. Aldaya, D. Damidot // *Environmental pollution*. – 2011. – Vol. 159. – N 10. – P. 2974-2981.

Magdaleno, A. Phytotoxicity and genotoxicity assessment of imazethapyr herbicide using a battery of bioassays / A. Magdaleno, M. P. Gavensky, A. V. Fassiano, M. C. R. de Molina, M. Santos, H. March, Á. B. Juárez // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2015. – Vol. 22. – N 23. – P. 19194-19202.

Makemson, J. Inhibition of bacterial bioluminescence by pargyline / J. Makemson, J. W. Hastings // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 1979. – Vol. 196. – N 2. – P. 396-402.

Manzo, S. Investigation of ZnO nanoparticles' ecotoxicological effects towards different soil organisms / S. Manzo, A. Rocco, R. Carotenuto, F. De Luca Picione, M. L. Miglietta, G. Rametta, G. Di Francia // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2011. – Vol. 18. – N 5. – P. 756-763.

Manzo, S. Application of a toxicity test battery integrated index for a first screening of the ecotoxicological threat posed by ports and harbors in the southern Adriatic Sea (Italy) / S. Manzo, S. Schiavo, P. Aleksi, A. Tabaku // *Environmental monitoring and assessment*. – 2014. – Vol. 186. – N 11. – P. 7127-7139.

Marquis, R. E. Fluoride and organic weak acids as modulators of microbial physiology / R. E. Marquis, S. A. Clock, M. Mota-Meira // FEMS microbiology reviews. – 2003. – Vol. 26. – N 5. – P. 493-510.

Naprasnikova, E. V. Chemical Trace of Emissions from Aluminum Production (Soil Ecology Aspect) / E. V. Naprasnikova // Chemistry for sustainable development. – 2013. – V. 21. – N 3. – P. 323-328.

Nakashima, Y. Non-destructive analysis of oil-contaminated soil core samples by X-ray computed tomography and low-field nuclear magnetic resonance relaxometry: a case study / Y. Nakashima, Y. Mitsuhashi et al. // Water, Air, & Soil Pollution. – 2011. – Vol. 214. – N 1-4. – P. 681-698.

Nealson, K. H. The inhibition of bacterial luciferase by mixed function oxidase inhibitors / K. H. Nealson, J. W. Hastings // Journal of Biological Chemistry. – 1972. – Vol. 247. – N 3. – P. 888-894.

Nel, A. E. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface / A. E. Nel, L. Mädler, D. Velegol, T. Xia, E. M. Hoek, P. Somasundaran, M. Thompson // Nature materials. – 2009. – Vol. 8. – N 7. – P. 543-557.

Nunes, B. The use cholinesterases in ecotoxicology / B. Nunes // Reviews of environmental contamination and toxicology. – 2011. – P. 29-55.

Ochiai, E. I. General principles of biochemistry of the elements / E. I. Ochiai. – Plenum Press, New York, 1987. – Vol. 7.

Owolade, O. Effects of titanium dioxide on the diseases, development and yield of edible cowpea / O. Owolade, D. Ogunletti // Journal of plant protection research. – 2008. – Vol. 48. – N 3. – P. 329-336.

Papaefthimiou, C. Comparison of two screening bioassays, based on the frog sciatic nerve and yeast cells, for the assessment of herbicide toxicity / C. Papaefthimiou, M. de Guadalupe Cabral, C. Mixailidou, C. A. Viegas, I. Sá-Correia, G. Theophilidis // Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal. – 2004. – Vol. 23. – N 5. – P. 1211-1218.

Perminova, I. V. et al. (Ed.). Use of humic substances to remediate polluted environments: from theory to practice / eds I. V. Perminova, K. Hatfield, N. Hertkorn. – Netherlands: Springer, 2005. – P. 285-309.

Poli, A. Heavy metal resistance of some thermophiles: potential use of α -amylase from *Anoxybacillus amylolyticus* as a microbial enzymatic bioassay / A. Poli, A. Salerno, G. Laezza, P. di Donato, S. Dumontet, B. Nicolaus // *Research in microbiology*. – 2009. – Vol. 160. – N 2. – P. 99-106.

Pons, M. A new cellular model of response to estrogens: a bioluminescent test to characterize (anti) estrogen molecules / M. Pons, D. Gagne, J. C. Nicolas, M. Mehtali // *Biotechniques*. – 1990. – Vol. 9. – N 4. – P. 450-459.

Prato, E. Ecotoxicological evaluation of sediments by battery bioassays: application and comparison of two integrated classification systems / E. Prato, I. Parlapiano, F. Biandolino // *Chemistry and Ecology*. – 2015. – Vol. 31. – N 7. – P. 661-678.

Rajalakshmi, S. Mechanism of action of γ -hexachlorocyclohexane in *Neurospora crassa* / S. Rajalakshmi, D. S. R. Sarma, P. S. Sarma // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. – 1964. – V. 93. – №. 3. – P. 670-672.

Ren, S. Kinetics of the toxicity of metals to luminescent bacteria / S. Ren, P. D. Frymier // *Advances in Environmental Research*. – 2003. – Vol. 7. – N 2. – P. 537-547.

Ribeiro, S. Novel bioassay based on acetylcholinesterase and lactate dehydrogenase activities to evaluate the toxicity of chemicals to soil isopods / S. Ribeiro, L. Guilhermino, J. P. Sousa, A. M. V. M. Soares // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 1999. – Vol. 44. – N 3. – P. 287-293.

Riedel, B. Effect of selected water toxicants and other chemicals upon adenosine triphosphatase activity in vitro / B. Riedel, G. Christensen // *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. – 1979. – Vol. 23. – N 1. – P. 365-368.

Ronnpagel, K. Microbial bioassays to assess the toxicity of solid-associated contaminants / K. Ronnpagel, W. Liss, W. Ahlf // *Ecotoxicology and Environmental safety*. – 1995. – Vol. 31. – N 2. – P. 99-103.

Rodriguez-Ruiz, A. Toxicity assessment through multiple endpoint bioassays in soils posing environmental risk according to regulatory screening values / A. Rodriguez-Ruiz, V. Asensio, B. Zaldibar, M. Soto, I. Marigómez // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2014. – Vol. 21. – N 16. – P. 9689-9708.

Shpedt, A. A. Agroecosystems of Krasnoyarsk Krai: Natural resource potential, environmental stability, optimization of functioning / A. A. Shpedt, A.N. Petin, Yu. N. Trubnikov, Yu. V. Aksenova, L.G. Smirnova, T.A. Polyakova // *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)*. – 2017. – Vol. 11. – N 03. – P. 610-614

Steinberg, C. E. W. Pure humic substances have the potential to act as xenobiotic chemicals-A review / C. E. Steinberg, A. Paul, S. Pflugmacher, T. Meinelt, R. Klöcking, C. Wiegand // *Fresenius Environmental Bulletin*. – 2003. – Vol. 12. – N 5. – P. 391-401.

Tarasova, A. S. Effect of humic substances on toxicity of inorganic oxidizer. Bioluminescent monitoring / A. S. Tarasova, D. I. Stom, N. S. Kudryasheva // *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2011. – Vol.30. – N 5. – P.1013-1017

Tarasova, A.S. Bioluminescence as a tool for studying detoxification processes in metal salt solutions involving humic substances / A. S. Tarasova, S. L. Kislan, E. S. Fedorova, A. M. Kuznetsov, O. A. Mogilnaya, D. I. Stom, N. S. Kudryasheva // *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 2012. –Vol. 117. – N 5. – P. 164-170.

Thanabalasingam, P. Arsenic sorption by humic acids / P. Thanabalasingam, W. F. Pickering // *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical*. – 1986. – Vol. 12. – N 3. – P. 233-246.

Thiour-Mauprivez, C. Effects of herbicide on non-target microorganisms: Towards a new class of biomarkers? / C. Thiour-Mauprivez, F. Martin-Laurent, C. Calvayrac, L. Barthelmebs // *Science of The Total Environment*. – 2019. – Vol. 684. – P. 314-325

Thomulka, K. W. Detection of biohazardous materials in water by measuring bioluminescence reduction with the marine organism *Vibrio harveyi* / K. W. Thomulka, D. J. McGee, J. H. Lange // *Journal of Environmental Science & Health Part A*. – 1993. – Vol. 28. – N 9. – P. 2153-2166.

Tejeda-Benitez, L. *Caenorhabditis elegans*, a biological model for research in toxicology / L. Tejeda-Benitez, J. Olivero-Verbel // *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. – Vol. 237. – Springer, Cham, 2016. – P. 1-35.

Terekhova, V. A. Engineered nanomaterials in soil: Problems in assessing their effect on living organisms / V. A. Terekhova, M. M. Gladkova // *Eurasian soil science*. – 2013. – Vol. 46. – N 12. – P. 1203-1210.

Terekhova, V. A. The triad approach to ecological assessment of urban soils / V. A. Terekhova, M. A. Pukalchik, A. S. Yakovlev // *Eurasian Soil Science*. – 2014. – Vol. 47. – N 9. – P. 952-958.

Tyler, G. Heavy metal pollution, phosphatase activity, and mineralization of organic phosphorus in forest soils / G. Tyler // *Soil Biology and Biochemistry*. – 1976. – Vol. 8. – N 4. – P. 327-332.

Vaajasaari, K. Comparisons of terrestrial and aquatic bioassays for oil-contaminated soil toxicity / K. Vaajasaari, A. Joutti, E. Schultz, S. Selonen, H. Westerholm // *Journal of Soils and Sediments*. – 2002. – Vol. 2. – N 4. – P. 194-202.

Vodyanitskii, Y. N. Soil contamination with emissions of non-ferrous metallurgical plants / Y. N. Vodyanitskii, I. O. Plekhanova, E. V. Prokopovich, A. T. Savichev // *Eurasian Soil Science*. – 2011. – Vol. 44. – N 2. – P. 217-226.

Van Gestel, C. A. The use of acute and chronic bioassays to determine the ecological risk and bioremediation efficiency of oil-polluted soils / C. A. Van Gestel, J. J. van der Waarde, J. G. M. Derksen, E. E. van der Hoek, M. F. Veul, S. Bouwens, G. N. Stokman // *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*. – 2001. – Vol. 20. – N 7. – P. 1438-1449.

Van Gestel, C. A. M. Soil ecotoxicology: state of the art and future directions / C. A. M. Van Gestel // *ZooKeys*. – 2012. – N 176. – P. 275-296.

Verbruggen, N. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants / N. Verbruggen, C. Hermans, H. Schat // *New phytologist*. – 2009. – Vol. 181. – N 4. – P. 759-776.

Vondráček, J. Monitoring river sediments contaminated predominantly with polyaromatic hydrocarbons by chemical and in vitro bioassay techniques / J.

Vondráček, M. Machala, K. Minksová, L. Bláha, A. J. Murk, A. Kozubík, J. Neča // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2001. – Vol. 20. – N 7. – P. 1499-1506.

Whiting, S. N. Assessment of Zn mobilization in the rhizosphere of *Thlaspi caerulescens* by bioassay with non-accumulator plants and soil extraction / S. N. Whiting, J. R. Leake, S. P. McGrath, A. J. Baker // *Plant and Soil*. – 2001. – Vol. 237. – N 1. – P. 147-156.

Xiao, R. Soil screening for identifying ecological risk stressors using a battery of in vitro cell bioassays / R. Xiao, Z. Wang, C. Wang, G. Yu // *Chemosphere*. – 2006. – Vol. 64. – N 1. – P. 71-78.

Yuan, C. G. Evaluation of extraction methods for arsenic speciation in polluted soil and rotten ore by HPLC-HG-AFS analysis / Chun-Gang Yuan, Bin He, Er-Le Gao, Jian-Xia Lu, Gui-Bin Jiang // *MicrochimicaActa*. – 2007. – Vol. 159. – N 1-2. – P. 175-182.

Zhang, X. Predicting the modifying effect of soils on arsenic phytotoxicity and phytoaccumulation using soil properties or soil extraction methods / X. Zhang, E. A. Dayton, N. T. Basta // *Environmental Pollution*. – 2020. – Vol. 263. – P. 114501.

Приложение А

(справочное)

Таблица А.1 – Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в почве и допустимые уровни их содержания по показателям вредности (по Шпедт, 2010)

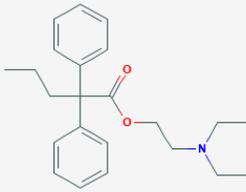
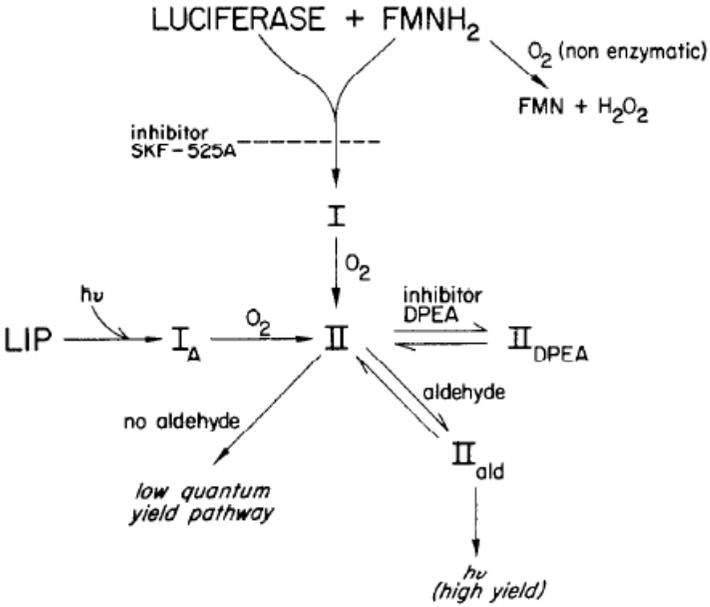
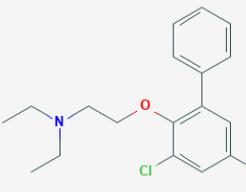
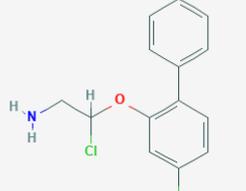
| Наименование вещества | ПДК мг/кг почвы с учетом фона (кларк) | Показатель вредности | | | Общесанитарный |
|------------------------------------|---------------------------------------|----------------------|----------------|-----------|----------------|
| | | Транслокационный | Миграционный | | |
| | | | Водный | Воздушный | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Подвижная форма | | | | | |
| Медь | 3,0 | 3,5 | 72,0 | - | 3,0 |
| Никель | 4,0 | 6,7 | 14,0 | - | 4,0 |
| Цинк | 23,0 | 23,0 | 200,0 | - | 37,0 |
| Кобальт | 5,0 | 25,0 | > 1000,0 | - | 5,0 |
| Водорастворимая форма | | | | | |
| Фтор | 10,0 | 10,0 | 10,0 | - | 25,0 |
| Валовое содержание | | | | | |
| Сурьма | 4,5 | 4,5 | 4,5 | - | 50,0 |
| Марганец | 1500,0 | 3500,0 | 1500,0 | - | 1500,0 |
| Ванадий | 150,0 | 170,0 | 350,0 | - | 150,0 |
| Марганец + ванадий | 1000,0 + 100,0 | 1500,0 + 150,0 | 2000,0 + 200,0 | - | 1000,0 + 100,0 |
| Свинец | 30,0 | 35,0 | 260,0 | - | 30,0 |
| Мышьяк | 2,0 | 2,0 | 15,0 | - | 10,0 |
| Ртуть | 2,1 | 2,1 | 33,3 | 2,5 | 5,0 |
| Свинец + ртуть | 20,0 + 1,0 | 20,0 + 1,0 | 30,0 + 2,0 | - | 30,0 + 2,0 |
| Хлористый калий (K ₂ O) | 560,0 | 1000,0 | 560,0 | 1000 | 5000,0 |
| Нитраты | 130,0 | 180,0 | 130,0 | - | 225,0 |
| Бенз(а)пирен (БП) | 0,02 | 0,2 | 0,5 | - | 0,02 |
| Бензол | 0,3 | 3,0 | 10,0 | 0,3 | 50,0 |
| Толуол | 0,3 | 0,3 | 100,0 | 0,3 | 50,0 |
| Изопропилбензол | 0,5 | 3,0 | 100,0 | 0,5 | 50,0 |
| Альфа-метилстирол | 0,5 | 3,0 | 100,0 | 0,5 | 50,0 |
| Стирол | 0,1 | 0,3 | 100,0 | 0,1 | 1,0 |
| Ксилолы | 0,3 | 0,3 | 100,0 | 0,4 | 1,0 |
| Сернистые соединения (S) | | | | | |
| Сероводород (H ₂ S) | 0,4 | 160,0 | 140,0 | 0,4 | 160,0 |
| Элементарная сера | 160,0 | 180,0 | 380,0 | - | 160,0 |
| Серная кислота | 160,0 | 180,0 | 380,0 | - | 160,0 |
| ОФУ* | 3000,0 | 9000,0 | 3000,0 | 6000,0 | 3000,0 |
| КГУ* | 120,0 | 800,0 | 120,0 | 800,0 | 800,0 |
| ЖКУ* | 80,0 | > 800,0 | 80,0 | > 800,0 | 800,0 |

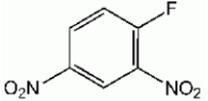
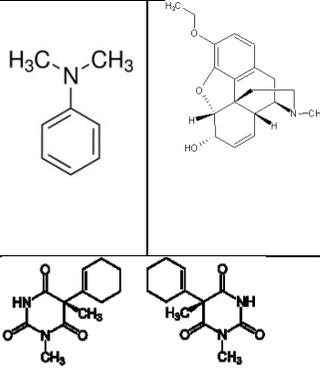
Примечание. * ОФУ – отходы флотации угля; ПДК ОФУ контролируется по содержанию бенз(а)пирена в почве; КГУ – комплексные гранулированные удобрения состава N:P:K = 64:0:15. ПДК КГУ контролируется по содержанию нитратов в почве, которое не должно превышать 76,8 мг/кг абсолютно сухой почвы. ЖКУ – жидкие комплексные удобрения состава N:P:K = 10:34:0. ПДК ЖКУ контролируется по содержанию подвижных фосфатов в почве, которое не должно превышать 27,2 мг/кг абсолютно сухой почвы.

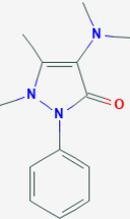
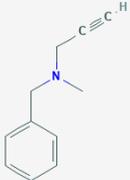
Приложение Б

(справочное)

Таблица В.1 – Ингибиторы бактериальной биолюминесценции

| Ингибитор | Формула (структура) | Механизм действия | Ссылки | |
|---|---|--|---------------------------|--|
| 2-диэтиламиноэтил-2,2-дифенил валерат (SKF 525-A) |  |  <p data-bbox="891 1117 1601 1372"> FIG. 3. Scheme depicting the hypothesized intermediates and pathways in bacterial bioluminescence and the sites of action by the two types of inhibitors. Intermediates are enzyme-bound, and designated by Roman numerals. Chemical generation of the intermediates occurs via FMNH₂ reaction with luciferase; the light-initiated pathway involves the interactions of photon(s) with a luciferase-related protein (<i>LIP</i> = light inducible protein) to produce an intermediate <i>I_A</i>, which after reaction with oxygen has properties similar to the analogous chemically generated intermediate <i>II</i>. </p> | (Nealson, Hastings, 1972) | |
| N, N-диэтил-2,4-дихлор (6-фенилфенокси) -этиламин (DPDA, Lilly 18947) |  | | | |
| 2,3-дихлор (6-фенилфенокси) этиламин (DPEA) |  | | | |
| Катионы K ⁺ , Na ⁺ , | | Развивающееся во времени и дозозависимое подавление интенсивности биолюминесценции. Неспецифический эффект на параметры ферментативной реакции, предположительно определяемый изменением | (Дерябин и др., 2006) | |

| Ингибитор | Формула (структура) | Механизм действия | Ссылки |
|--|--|--|------------------------|
| Катионы Mg^{2+} , Ca^{2+} | | ионной силы раствора Специфический эффект, определяемый прямым взаимодействием с молекулами фермента. | |
| 2,4-динитрофторбензол |  | Разобщение реакции восстановления ФМН и светоизлучения за счет конкурентного ингибирования активного центра фермента. | (Кратасюк, Фиш, 1980) |
| CdSO ₄ , CuCl ₂ , PbCl ₂ , NiCl ₂ , HgCl ₂ , CrO ₃ , ZnCl ₂ | Соли тяжелых металлов | Кинетика репрессии биолюминесценции Shk1, вызванной тяжелыми металлами, может быть математически описана как неконкурентное ингибирование определяющей скорость ферментативной реакции. Коэффициент ингибирования K _i можно использовать в качестве индикатора токсичности. Коэффициенты ингибирования для семи тяжелых металлов были получены из данных о токсичности. Токсичность семи тяжелых металлов, определенные по их значениям K _i , хорошо согласуется с токсичностью, определенной значениями EC ₅₀ , при этом значения K _i и EC ₅₀ коррелируют. При соответствующих условиях значения EC ₅₀ могут содержать кинетическую информацию, аналогичную тому, что содержится в K _i . | (Ren, Frymier, 2003) |
| Диметиланилин, этилморфин, гексобарбитал, аминопирин |  | Конкурентное ингибирование, при добавлении альдегида; не конкурентное при добавлении ФМНН ₂ ; связывание с гидрофобным сайтом люциферазы | (Danilov et al., 1985) |

| Ингибитор | Формула (структура) | Механизм действия | Ссылки |
|--|---|---|---------------------------------|
| |  | | |
| Паргилин (N-бензил-N-метил-2-пропиламин) |  | Ингибирование конкурирует с двумя субстратами, FMNH ₂ и альдегидом, и ингибитор связывается с промежуточным продуктом реакции фермента люциферазы с образованием стабильного, но обратимого аддукта. | (Makemson, Hastings, 1979) |
| KCl, KBr и KI | Галогениды калия | Ингибирование интенсивности биолюминесценции галогенидами калия увеличивается с увеличением атомного веса анионов. При этом параметры ингибирования возрастают, а параметры активации соответственно уменьшаются. | (Gerasimova, Kudryasheva, 2002) |

Приложение В

(обязательное)

Результаты анализа модельных почвенных грунтов

Таблица В.1 – Свойства МПГ и результаты биотестирования

| Название почвы | Номер пробы | pH сол | Гумус, % | Фракция 0,05-0,25 мелкий песок | Фракция 0,001 ил | ОА, % | T ² , % | T ³ , % | D ₂₅₀ |
|---------------------------------|-------------|--------|----------|--------------------------------|------------------|--------|--------------------|--------------------|------------------|
| Песок | 1 | 8 | 0,38 | 90,4 | 6,7 | 108,79 | 90,78 | 78,6 | 0,252 |
| | 2 | 7,9 | 0,33 | 85,4 | 5,9 | 101,10 | 102,81 | 86,8 | 0,157 |
| | 3 | 8 | 0,31 | 88,7 | 6,3 | 101,10 | 98,46 | 72,0 | 0,252 |
| Легкий суглинок | 5 | 5,3 | 0,55 | 81,7 | 8,5 | 104,95 | 101,59 | 71,9 | 0,480 |
| | 6 | 5,7 | 0,24 | 79,1 | 8,9 | 107,14 | 88,78 | 99,2 | 0,378 |
| | 7 | 5,2 | 0,38 | 77,4 | 8,3 | 94,51 | 94,61 | 99,3 | 0,411 |
| Средний суглинок | 9 | 7,3 | 0,48 | 57,3 | 17,3 | 106,04 | 71,49 | 44,8 | 1,287 |
| | 10 | 7,6 | 0,38 | 59,4 | 15,7 | 109,34 | 65,46 | 48,6 | 0,863 |
| | 11 | 7,3 | 0,56 | 58,9 | 16,8 | 109,34 | 49,36 | 63,4 | 1,021 |
| тяжелый суглинок | 13 | 7,5 | 0,73 | 28,3 | 26,4 | 104,07 | 61,28 | 44,4 | 1,402 |
| | 14 | 7 | 0,81 | 29,1 | 29,2 | 111,31 | 58,66 | 99,8 | 1,460 |
| | 15 | 7,2 | 1,01 | 24,5 | 29,2 | 109,50 | 64,98 | 58,2 | 1,402 |
| высокогумусная почва (чернозем) | 17 | 6,3 | 8,37 | 17,6 | 21 | 109,50 | 57,84 | 66,0 | 1,590 |
| | 18 | 7 | 7,96 | 19,1 | 20,4 | 107,69 | 76,37 | 39,4 | 1,030 |
| | 19 | 6,8 | 8,87 | 18,7 | 20,9 | 154,75 | 82,95 | 79,2 | 0,985 |
| песок, 1% | 21 | 7,8 | 0,55 | 84,8 | 6,2 | 95,48 | 75,65 | 73,5 | 0,372 |
| | 22 | 6,9 | 1,34 | 84 | 9,8 | 102,26 | 70,35 | 79,2 | 0,337 |
| | 23 | 6,9 | 1,04 | 84,5 | 7 | 95,93 | 89,63 | 47,9 | 0,459 |
| песок, 3% | 25 | 6,7 | 4,72 | 67,9 | 12,8 | 111,93 | 82,56 | 51,2 | 0,537 |
| | 26 | 6,7 | 2,26 | 69,2 | 13,1 | 109,17 | 97,48 | 39,1 | 0,427 |
| | 27 | 6,8 | 1,95 | 79,4 | 9,7 | 106,42 | 78,53 | 21,8 | 0,795 |
| песок, 5% | 29 | 6,7 | 5,32 | 53,4 | 16,9 | 115,60 | 96,99 | 96,3 | 0,468 |
| | 30 | 6,8 | 3,09 | 74,3 | 10,8 | 106,42 | 81,28 | 83,9 | 0,603 |
| | 31 | 6,7 | 4,21 | 68 | 13 | 103,67 | 48,83 | 85,8 | 0,497 |
| легкий суглинок, 1% | 33 | 6,6 | 1,24 | 77,3 | 8,4 | 110,09 | 73,45 | 71,3 | 0,346 |
| | 34 | 6,4 | 1,58 | 77,1 | 9 | 100,92 | 98,65 | 60,7 | 0,559 |
| | 35 | 6,3 | 1,33 | 75,6 | 9,8 | 105,50 | 97,17 | 52,6 | 0,467 |
| легкий суглинок, 3% | 37 | 7 | 2,5 | 70,3 | 9,7 | 121,67 | 75,36 | 67,5 | 0,316 |
| | 38 | 6,3 | 3,46 | 59 | 14,2 | 122,78 | 76,62 | 66,5 | 0,227 |
| | 39 | 6,2 | 1,84 | 70 | 11,5 | 127,22 | 75,9 | 71,2 | 0,273 |
| легкий суглинок, 5% | 41 | 6,3 | 5,22 | 54,1 | 16,1 | 128,89 | 66,27 | 61,5 | 0,531 |
| | 42 | 6,3 | 3,5 | 58 | 12,9 | 120,56 | 54,81 | - | 0,598 |
| | 43 | 6,8 | 4,01 | 58,1 | 14,1 | 122,78 | 56,01 | - | 0,617 |
| средний суглинок, 1% | 45 | 6,3 | 1,52 | 60,6 | 13,9 | 128,89 | 61,14 | 48,0 | 0,727 |
| | 46 | 7,1 | 1,2 | 58,4 | 16,1 | 127,22 | 64,99 | 59,1 | 0,639 |
| | 47 | 6,5 | 0,86 | 59 | 15,1 | 122,22 | 60,76 | 77,1 | 0,689 |
| средний суглинок, 3% | 49 | 6,8 | 1,81 | 54,1 | 16,6 | 111,58 | 75,94 | 62,2 | 0,712 |
| | 50 | 6,8 | 3,32 | 53 | 16,2 | 102,11 | 76,49 | 75,2 | 0,686 |

| Название почвы | Номер пробы | pH сол | Гумус, % | Фракция 0,05-0,25 мелкий песок | Фракция 0,001 ил | ОА, % | T ² , % | T ³ , % | D ₂₅₀ |
|----------------------|-------------|--------|----------|--------------------------------|------------------|--------|--------------------|--------------------|------------------|
| | 51 | 6,8 | 2,81 | 53,6 | 16,2 | 102,63 | 74,31 | 87,9 | 0,732 |
| средний суглинок, 5% | 53 | 7 | 3,5 | 48,3 | 18,2 | 97,37 | 74,6 | 98,3 | 0,896 |
| | 54 | 6,9 | 4,92 | 45,8 | 17,2 | 96,32 | 82,25 | 98,0 | 0,757 |
| | 55 | 6,9 | 5,22 | 43,8 | 18,7 | 96,84 | 77,38 | 62,4 | 0,744 |
| тяжелый суглинок, 1% | 57 | 7,1 | 2,69 | 26,6 | 27,8 | 94,74 | 57,97 | 97,3 | 1,128 |
| | 58 | 7,2 | 1,84 | 29,2 | 27,1 | 141,24 | 69,4 | 72,5 | 1,342 |
| | 59 | 7,2 | 1,64 | 25,7 | 28,7 | 115,46 | 77,71 | 83,1 | 0,900 |
| тяжелый суглинок, 3% | 61 | 7,2 | 4,01 | 25 | 28,2 | 111,34 | 77,2 | 78,1 | 0,825 |
| | 62 | 7,2 | 2,76 | 24 | 26,1 | 121,65 | 55,55 | 46,5 | 1,066 |
| | 63 | 7 | 4,03 | 24,4 | 23,8 | 95,88 | 76,14 | 37,2 | 0,864 |
| тяжелый суглинок, 5% | 65 | 7,2 | 5,42 | 21,6 | 25 | 119,59 | 85,59 | 67,5 | 0,503 |
| | 66 | 7,1 | 4,92 | 23,1 | 24,2 | 130,93 | 90,06 | 69,5 | 0,538 |
| | 67 | 7,1 | 6,03 | 21,5 | 26,6 | 124,74 | 81,35 | 54,6 | 0,588 |