

КРАТКИЕ НАУЧНЫЕ СООБЩЕНИЯ

А. Ш. ГАЛСТЯН, Г. П. ЦЮПА

НЕКОТОРЫЕ ВОПРОСЫ ИЗУЧЕНИЯ АКТИВНОСТИ АМИДАЗ  
В ПОЧВЕ

Нами изучены некоторые вопросы, связанные с активностью аспарагиназы и уреазы в почве. Проводились сравнительные определения активности амидаз с целью предложения точного и быстрого метода для широкого применения в исследованиях энзиматической активности почвы.

Для определения активности амидаз к образцу почвы прибавляется субстрат и через некоторое время образовавшийся аммиак определяется или по методу Конвея, или перегонкой [2, 3].

При определении активности амидаз в почве по Дробнику [1] инкубация производится следующим образом: навеска почвы помещается в стеклянные трубки, закрытые с обоих концов резиновыми пробками, туда же добавляется 5 мл 10%-ного раствора мочевины (5 мл 3%-го раствора аспарагина в случае определения аспарагиназы) и 0,75 мл толуола. Инкубация происходит в термостате при температуре 42°C в течение 48 ч. Контролем служит почва без субстрата и субстрат. После инкубации для сравнительного определения активности амидаз в почве образовавшийся в результате ферментативной реакции аммиак нами учитывался диффузионным методом и перегонкой. Для определения аммиака диффузионным методом во внутреннюю полость чашки Конвея приливается 5 мл 0,5 н НСl. Содержимое трубки с помощью 10 мл дистиллированной воды переносится в наружную полость чашки, туда же добавляется 1 мл 50%-го раствора трихлоруксусной кислоты (для прекращения ферментативной реакции) и 5 мл насыщенного раствора  $K_2CO_3$ . Затем чашки осторожно встряхиваются и оставляются при комнатной температуре еще на 48 ч. По прошествии этого времени остаток соляной кислоты оттитровывается 0,2н Ва (ОН)<sub>2</sub> в присутствии фенолфталеина. Таким образом, определение активности амидаз в почве диффузионным методом длится четверо суток.

При определении аммиака перегонкой после инкубации содержимое трубки переносится в перегонную колбу для отгона аммиака. Количество аммиака учитывается обратным титрованием.

Следует отметить, что учет количества аммиака перегонкой и диффузионным методом широко применяется при определении общего азота

в различных объектах и их сравнение дает хорошую сходимость результатов [4]. Однако несколько иная картина получается при применении этих методов для определения активности амидаз в почве. Сравнительное определение уреазы показывает, что при учете аммиака диффузионным методом получаются заниженные результаты (табл. 1).

Таблица 1  
Сравнительное определение активности уреазы в почве  
(среднее из шести определений)

Почва, угодие и пункт взятия образца	Уреазы, мг $\text{NH}_3$ на 1 г почвы за сутки		Расхождения между определениями перегонкой и диф- фузионным ме- тодом
	диффузион- ный метод	перегонка	
Бурая, культурно-поливная. Люцерна. Эчмиадзин . . . . .	0,62	2,51	1,89
Каштановая. Озимая пшеница. Аштарак	1,65	4,90	3,25
Чернозем. Озимая пшеница. Гукасян .	2,37	6,50	4,13
Лесная. Буковый лес. Дилижан . . . .	6,35	19,58	13,23
Торфо-болотная, лугово-болотная расти- тельность. Амасия . . . . .	7,30	28,60	21,30

Значительные расхождения между определениями активности амидаз перегонкой и диффузионным методом связано с тем, что при переносе содержимого трубки в чашку Конвея имеют место потери аммиака (последнее можно установить по запаху). Кроме того, аммиак из среды диффундирует не полностью, потому что его диффузия происходит из гетерогенной системы (почва+субстрат). С подобными же недостатками мы сталкиваемся при определении активности аспарагиназы в почве. В этом случае также диффузионный метод дает значительно более заниженные результаты, чем перегонка (табл. 2).

Таблица 2  
Сравнительное определение активности аспарагиназы в почве  
(среднее из шести определений)

Почва, угодие и пункт взятия образца	Аспарагиназы, мг $\text{NH}_3$ на 1 г почвы за сутки		Расхождения между определениями перегонкой и диф- фузионным ме- тодом
	диффузион- ный метод	перегонка	
Каштановая. Озимая пшеница. Аштарак	0,032	0,12	0,088
Чернозем. Озимая пшеница. Гукасян .	0,033	0,24	0,207
Торфо-болотная. Лугово-болотная ра- стительность. Амасия . . . . .	1,46	5,86	4 +

Одновременно следует указать также на ряд неудобных моментов процесса анализа диффузионным методом: а) при определении активности амидаз в почве с тяжелым механическим составом — (глинистая и тяжелоглинистая) почва сильно прилипает к стенкам трубки и с тру-

дом переносится в чашку Конвея; б) в случае почв с большой влагоемкостью прибавленный субстрат (5 мл) едва смачивает ее, в результате чего значительное количество аммиака улетучивается; в) если почва обладает высокой активностью амидаз, взятого объема соляной кислоты не хватает для связывания аммиака в чашке Конвея, что обнаруживается лишь в конце анализа. Следовательно, при каждом таком случае пропадает четверо суток.

Учитывая все вышеуказанные недостатки диффузионного метода определения активности амидаз в почве, мы предлагаем видоизмененный метод перегонки, который лишен этих недостатков. Активность амидаз по этому методу определяется следующим образом: в колбочки объемом 50 мл помещается навеска почвы (5 г), приливается 10 мл фосфатного буфера (рН=6,7), 0,5 мл толуола и 10 мл 10%-ного раствора мочевины (10 мл 3%-ного аспарагина, в случае определения аспарагиназы). Колбочки закупориваются пробками, встряхиваются и ставятся в термостат при 37—38°C на 24 ч. В опыте контролем служила предварительно стерилизованная сухим жаром (при 180°C в течение 3 ч. почва и субстрат без почвы. В течение инкубации колбочки необходимо периодически встряхивать. После инкубации производится отгон аммиака. В приемник приливается 20 мл 4%-ного раствора  $H_3BO_3$ . Содержимое колбочки с помощью воды (около 0,5 л) переносится в перегонную колбу, прибавляется 3 г  $MgO$  (или 10 мл 1%-ного раствора  $NaOH$ ). Время перегонки 15 мин. (с момента кипения). После перегонки аммиак в приемнике титруется 0,1 н  $HCl$  в присутствии индикатора Ташира. Активность амидаз выражается в мг  $NH_3$  на 1 г сухой почвы за сутки.

Предложенный метод имеет некоторые преимущества: во-первых, активность фермента определяется за сутки, во-вторых, при инкубации прибавляется буфер, создающий оптимальный рН действия фермента, в-третьих, прибавленный объем растворов субстрата и буфера способствует растворению аммиака, тем самым значительно снижая его потери.

Для выяснения целесообразности применения перегонки при определении активности амидаз в почве после инкубации почвы с субстратом при 38°C, аммиак, определенный перегонкой, сравнивался с диффузионным методом по Дробнику (табл. 3).

Сравнение этих данных показывает, что диффузионным методом получаются заниженные результаты. Следовательно, диффузионный метод учета аммиака при определении активности амидаз в почве не оправдывает себя.

Активность амидаз в почве мы изучали также в связи с ее окультуренностью, содержанием карбонатов и по профилю (табл. 4).

Бурая, культурно-поливная, бескарбонатная почва характеризуется несколько большей активностью уреазы и аспарагиназы, чем бурая карбонатная. Определение активности уреазы и аспарагиназы в окультуренной и целинной темно-каштановой почве показало, что при окуль-

Таблица 3

Сравнительное определение активности уреазы в почве  
(среднее из шести определений)

Почва и пункт взятия образца	Уреазы, мг $\text{NH}_3$ на 1 г почвы в сутки		Расхождения между определениями перегонкой и диффузионным методом
	диффузионный метод	перегонка	
Чернозем. Гукасян . . . . .	4,25	8,18	3,93
Лесная. Дилижан . . . . .	6,35	18,30	11,95
Торфо-болотная. Амасия . . . . .	7,30	38,30	31,0

Таблица 4

Активность уреазы и аспарагиназы в почве

Почва и пункт взятия образца		Уреазы, мг $\text{NH}_3$ на 1 г почвы за сутки	Аспарагиназы, мг $\text{NH}_3$ на 1 г почвы за сутки
Бурая, культурно-поливная, бескарбонатная. Эчмиадзин . . . . .		2,51	0,17
Бурая, культурно-поливная, карбонатная. Октемберян . . . . .		1,00	0,10
Темно-каштановая,	окультуренная	0,75	0,10
Шамшадин	целина	3,02	1,63
	2--11	19,58	2,50
Лесная,	11--33	0,31	0,27
Разрез Л-3.	33--84	0,0	0,03
Дилижан			

туренности снижается их активность. По профилю почвы активность уреазы и аспарагиназы снижается, самая высокая активность обнаруживается в верхнем горизонте.

Проведенные исследования показывают, что существует коррелятивная связь между активностью уреазы и аспарагиназы в почве. Самая высокая активность амидаз обнаруживается в торфоболотных и лесных почвах, затем в черноземах, в остальных типах почв их активность соответственно низкая. В результате исследований предлагается сравнительно быстрый и точный метод определения амидаз, который можно широко использовать для исследования ферментативной активности почвы.

Лаборатория агрохимии  
Академии наук Армянской ССР

Поступило 8 VI 1959 г.

Ա. Շ. ԳԵԼՍՏԻՆԵ, Գ. Պ. ՅՅՈՒՊԱ

## ՀՈՂԻ ՄԵՋ ԱՄԻՊԱԶՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՀԵՏԱԶՈՏՄԱՆ ՄԻ ԲԱՆԻ ՀԱՐՅԵՐ

Ա մ փ ո փ ո ս մ

Հողի ֆերմենտների ուսումնասիրությունը հնարավորություն է տալիս պարզելու նրա մեջ ընթացող բիոքիմիական պրոցեսների ուժգնությունը և ուղղությունը: Ֆերմենտներից՝ ամիդազները մասնակցում են օրգանական ազոտ պարունակող նյութերի քայքայման պրոցեսին: Նրանց գործունեության հետևանքով ստացվում է ամոնիակ, որը սնունդ է հանդիսանում բույսերի և հողի միկրոօրգանիզմի համար: Այս տեսակետից, հողի ամիդազների ակտիվության հետ կապված հարցերի ուսումնասիրությունը որոշակի հետաքրքրություն է ներկայացնում:

Ամիդազների ակտիվությունը որոշելու համար հողի կշռաքանակին ավելացնում են համապատասխան սուբստրատ և որոշակի մամանակից հետո ֆերմենտի գործունեության հետևանքով զոլացած ամոնիակը որոշում են կա՛մ կոմվեյի եղանակով, կա՛մ թորման միջոցով: Առաջարկված երկու եղանակների ղեկավարում էլ հողի և սուբստրատի ինկուբացիան կատարվում է սարքեր պայմաններում: Հողում ամիդազների ակտիվության որոշման դիֆուզիոն եղանակի ղեկավարում անալիզի ընթացքը սկսում է չորս օր և, թորման եղանակի հետ համեմատած, ստացվում են ցածր արդյունքները: Ներկա աշխատության մեջ մենք առաջարկում ենք հողի ամիդազների ակտիվության որոշման համեմատաբար ճիշտ և արագ եղանակ: Այս եղանակով ֆերմենտների ակտիվության որոշումը տևում է մեկ օր: Ուսումնասիրություններից պարզվել է, որ ասպարտդինազալի և ուրեազալի բարձր ակտիվություն հայտնաբերվում է տորֆա-ճահճալի և անտառալի հողերում, ալյուհետե, սեահողերում: Մնացած տիպի հողերում նրանց ակտիվությունը համեմատաբար ցածր է: Հողի մեջ կարբոնատության ավելացման հետ այդ ֆերմենտների ակտիվությունն ընկնում է: Խոպան հողերում ամիդազների ակտիվությունն ավելի բարձր է, քան մշակվող հողերում: Ասպարազինազալի ու ուրեազալի ակտիվությունն ըստ հողի խորության ընկնում է, նրանց առավելագույն ակտիվությունը հայտնաբերվում է վարելաշերտում:

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Drobniak J. Štípeni asparaginu enzymatickym komplexem pŭd Ćsl. Mikrobiologic, 1, 1, 1956.
2. Hofmann E. und Schmidt W. Über des Enzymsystem unserer Kulturböden. II Urease. Biochemische Zeitschrift, Bd 324, H—2, 1953.
3. Галстян А. Ш. Об активности уреазы в почве. ДАН АрмССР, 26, 1, 1958.
4. Мяскина Н. В. Видоизмененный метод определения общего азота по Кьельдалю. Почвоведение, 1, 1958.