

Л. В. МАРКОСЯН, А. Ш. ГАЛСТЯН

ОПТИМУМ рН НЕКОТОРЫХ ГИДРОЛАЗ ПОЧВЫ

Изучение активности ферментов почвы позволяет оценить ее биологическую активность. Первые работы в этом направлении были опубликованы Гофманом [6] и В. Ф. Купревичем [1]. Ими было показано, что активность некоторых ферментов является показателем биологической активности и плодородия почвы. Следовательно, определение активности ферментов может служить средством для оценки важных свойств почвы и перспективности тех или иных агроприемов.

Для широкого использования определения активности ферментов в почвенно-агрохимических исследованиях необходимо разносторонне изучить их свойства. Как известно, одним из факторов, существенно влияющих на действие ферментов, является активная кислотность среды, ее рН. Каждый фермент имеет определенный оптимум рН, при котором он проявляет наибольшую активность [2, 3]. Поэтому для определения активности ферментов в почве надо установить зависимость их действия от значений рН. Этому вопросу посвящено мало исследований [6, 7] и его выяснение, особенно, интересно в наших условиях, где встречаются различные типы и подтипы карбонатных и бескарбонатных почв.

Изученные нами ферменты: инвертаза, амилаза, β -глюкозидаза и уреаза относятся к группе гидролаз, катализирующих расщепление различных сложных органических соединений при участии воды [4]. Эти ферменты играют существенную роль в биохимических процессах почвы. Они осуществляют синтез и разложение углеводов и органических азотистых соединений почвы.

Исследования проводились на выщелоченном горном черноземе — рН 5,2, каштановой карбонатной почве — рН 8,1 и на содовом солончаке — рН 10,1. Образцы почвы высушивались до воздушносухого состояния, очищались от остатков корней, просеивались через сито диаметром отверстий в 1 мм и поступали в анализ.

Для выяснения зависимости действия инвертазы от рН, навески (5 г) почвы помещались в колбы емкостью в 50 мл, добавлялись 10 мл 5% раствора сахарозы, 0,5 мл толуола и ацетатный буфер с рН: 3,2; 3,8; 4,1; 4,4; 4,7; 5,0; 5,3; 5,6; 5,9 6,2. Колбы закрывались пробками, встряхивались и ставились в термостат при температуре 30° на 24 ч., в течение которого содержимое колб периодически встряхивалось. После инкубации редуцирующие сахара определялись по Бертрану. Активность инвертазы выражалась в мг глюкозы на 1 г почвы за сутки.

Исследования показали, что оптимум действия инвертазы в почвах находится в интервале рН 4,5—5,0. Активность инвертазы в различных

почвах различна, но ее оптимум рН почти одинаковый. Сдвиг оптимального рН в зависимости от содержания карбонатов в почве составляет всего 0,5 единиц (рис. 1).

Незначительный сдвиг оптимума рН действия инвертазы в различных почвах, очевидно, обусловлен двумя факторами: продуктами ферментативной реакции, не оказывающих существенного влияния на рН среды и буферностью почвы.

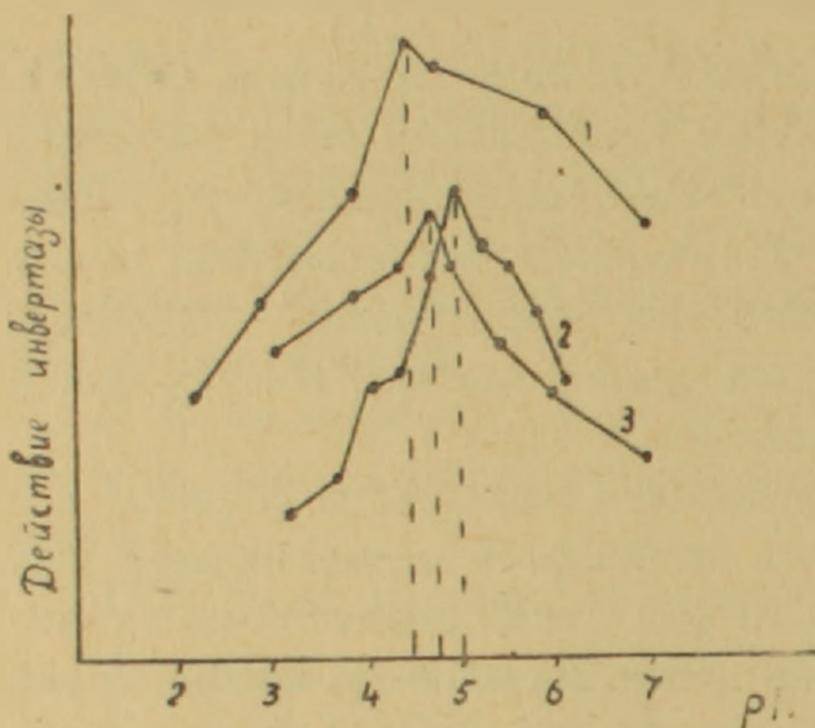


Рис. 1. Зависимость действия инвертазы в почве от рН. 1) выщелоченный чернозем, 2) каштановая карбонатная, 3) каштановая бескарбонатная.

Для выяснения изменения рН среды при действии инвертазы, к навеске почвы прибавлялись буфера с определенными значениями рН, субстрат и толуол. Затем до и после инкубации рН суспензии определялась потенциометрическим методом [5]. Приведенные данные (табл. 1) показывают, что образовавшиеся при ферментативной реакции редуцирующие сахара почти не меняют первоначальное значение рН суспензии. В каштановой почве отмечается некоторое изменение рН, которое связано с ее карбонатностью и активной щелочностью самой почвы—рН 8,1.

Незначительный сдвиг оптимума действия инвертазы, с другой сто-

Таблица 1

Изменение рН суспензии при инкубации сахарозы с почвой

| рН прибавленного буфера | Чернозем | | Каштановая | |
|-------------------------|----------|-------|------------|-------|
| | 30 мин. | 24 ч. | 30 мин. | 24 ч. |
| 3,2 | 3,48 | 3,58 | 4,49 | 4,65 |
| 3,8 | 3,80 | 3,82 | 4,50 | 4,74 |
| 4,1 | 4,15 | 3,99 | 4,64 | 4,86 |
| 4,4 | 4,23 | 4,25 | 4,76 | 5,13 |
| 4,7 | 4,50 | 4,49 | 4,97 | 5,44 |
| 5,0 | 4,81 | 4,80 | 5,16 | 5,73 |
| 5,3 | 5,13 | 5,11 | 5,52 | 6,05 |
| 5,6 | 5,42 | 5,09 | 5,86 | 6,41 |
| 5,9 | 5,66 | 5,72 | 6,25 | 6,76 |
| 6,2 | 5,91 | 5,88 | 6,60 | 7,17 |

роны, как было сказано выше, связан с буферностью почвы. Буферная способность почв определялась методом Иенсена [5], сущность которого заключается в получении двух кривых: почвы и безбуферного кварцевого песка. Опыт проводился в следующем порядке. В ряд колб отвешивались одинаковые навески (10 г) почвы, в одну серию колб прибавлялись возрастающие количества 0,03 н раствора $\text{Ca}(\text{OH})_2$ в мл: 3,5; 7,0; 10,5; 14,0;

17,5; 21,0; 24,5; 28,0; 31,5; 35,0; а в другую — 0,1 п раствора HCl: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0. Колбы закрывались пробками, встряхивались и для установления равновесия системы оставлялись на две недели, в течение которого содержимое колб время от времени встряхивалось. Затем в почвенной суспензии определялась pH. Полученные данные изображались графически (рис. 2). Площадь (в квадратных санти-

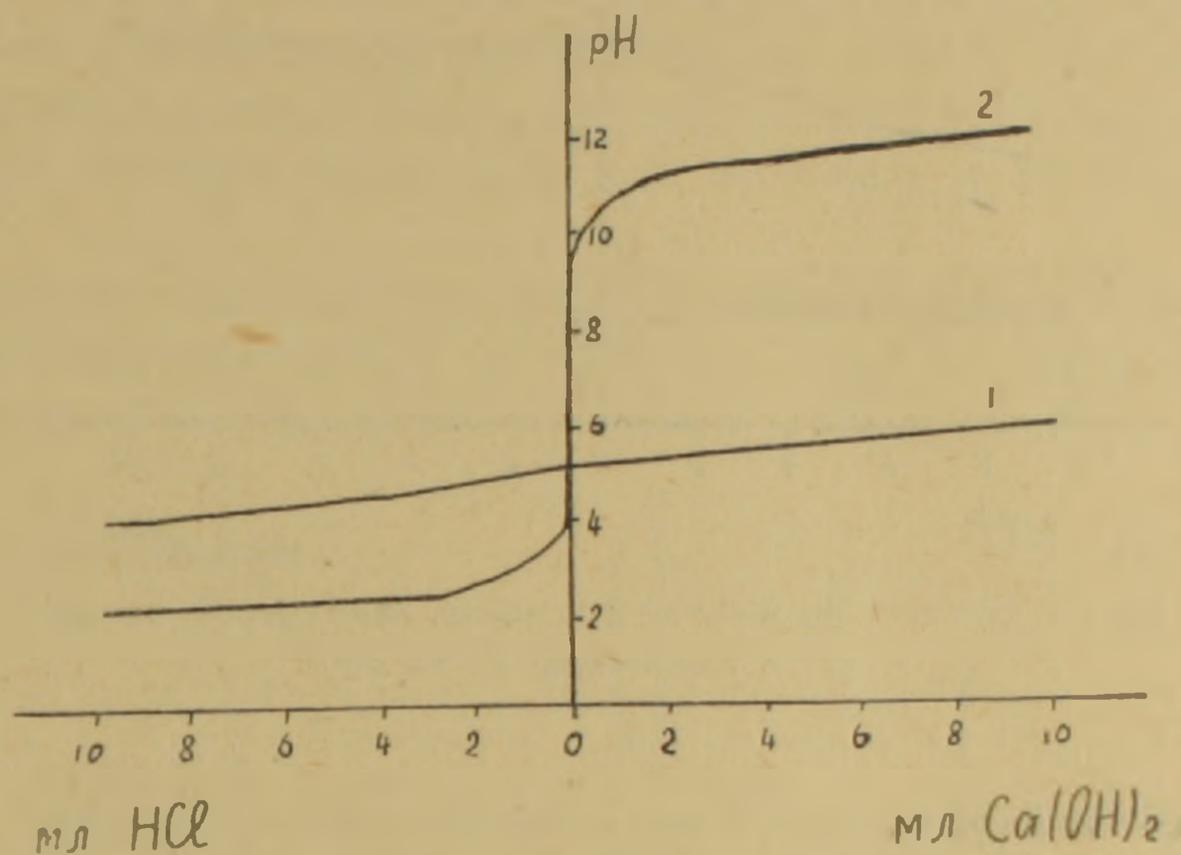


Рис. 2. Кривые титрования суспензии чернозема (1) и кварцевого песка (2).

метрах) заключенная между кривыми почвы и безбуферного песка, является мерой буферности и чем она больше, тем выше ее буферность.

Таким образом, высокая буферность исследуемых почв также способствует сохранению значения величины pH при определении активности инвертазы.

Приведенные кривые показывают, что чернозем имеет большую буферность. Площадь между кривой почвы (1) и безбуферного кварцевого песка (2) составляет $S=18,88 \text{ см}^2$. Кривая значений pH почвы (1) как в кислом, так и в щелочном интервале претерпевает одинаковое изменение. Сдвиг значения pH в обоих интервалах составляет 2 единицы, причем равным образом от исходной величины pH 5 в кислой области снижается до pH 4, а в сторону щелочной становится pH 6.

и Каштановая карбонатная почва также имеет высокую буферность $S=18,29 \text{ см}^2$ (рис. 3). Изменение pH каштановой почвы от исходной величины в кислом интервале больше, чем в щелочном. В обоих интервалах ее изменение больше двух единиц, поэтому площадь между кривой почвы (1) и кварцевого песка (2) несколько меньше.

Такая же картина установлена при определении активности амилазы (табл. 2) и β -глюкозидазы (табл. 3).

При определении активности амилазы и β -глюкозидазы использовался фосфатный буфер, что несколько своеобразно отразилось на значении pH суспензии. Фосфатный буфер при его высоких значениях pH, вза-

имодействуя с почвой, значительно снижает рН среды, которая затем не претерпевает существенного изменения.

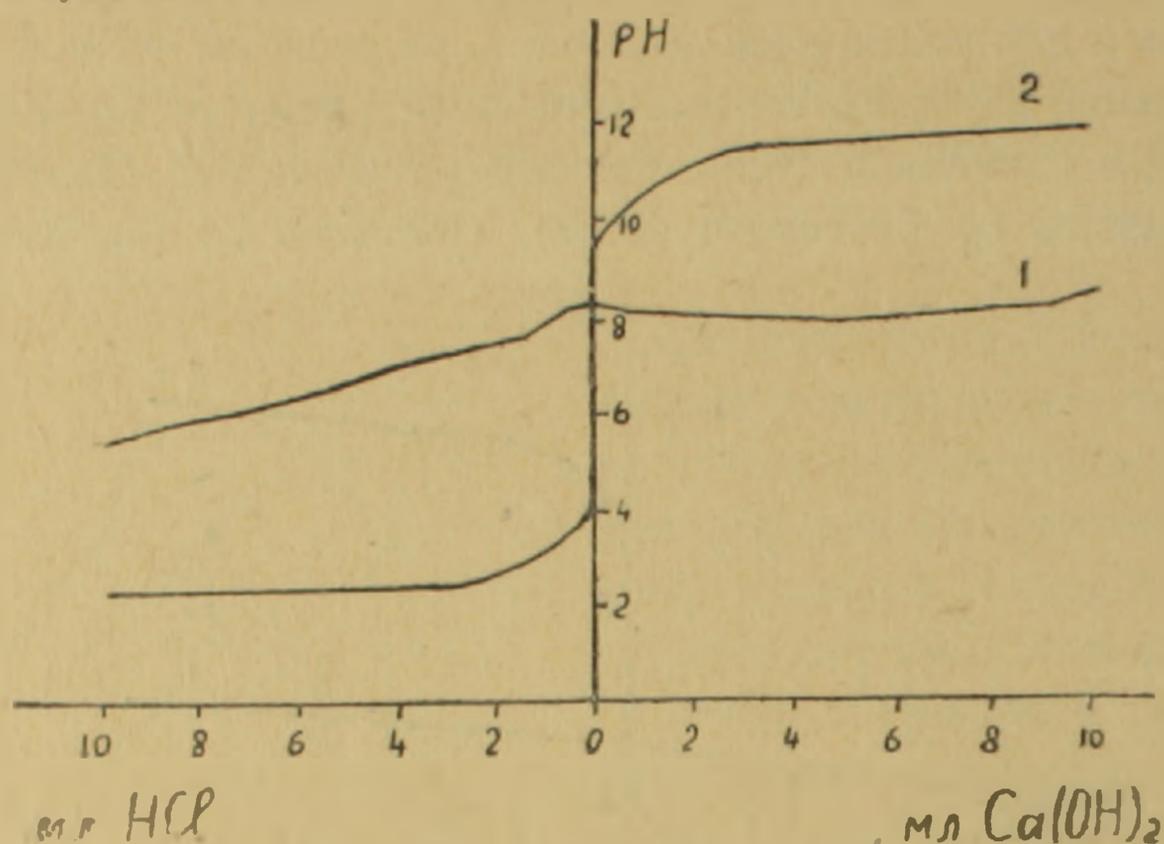


Рис. 3. Кривые титрования суспензии каштановой почвы (1) и кварцевого песка (2)

Таблица 2
Изменение рН суспензии при инкубации крахмала с почвой

| рН прибавленного буфера | Чернозем | | Каштановая | |
|-------------------------|----------|-------|------------|-------|
| | 30 мин. | 24 ч. | 30 мин. | 24 ч. |
| 4,9 | 5,23 | 5,13 | 5,80 | 5,96 |
| 5,3 | 5,16 | 5,16 | 5,74 | 5,86 |
| 5,6 | 5,50 | 5,18 | 5,74 | 5,86 |
| 5,9 | 5,30 | 5,09 | 5,74 | 6,04 |
| 6,2 | 5,74 | 5,35 | 6,03 | 6,29 |
| 6,5 | 5,68 | 5,61 | 6,15 | 6,39 |
| 6,8 | 6,14 | 5,89 | 6,53 | 6,66 |
| 7,2 | 6,29 | 6,13 | 6,77 | 7,09 |
| 8,1 | 6,86 | 6,49 | 7,14 | 7,16 |

Таблица 3
Изменение рН суспензии при инкубации арбутина с почвой

| рН прибавленного буфера | Чернозем | | Каштановая | |
|-------------------------|----------|-------|------------|-------|
| | 30 мин. | 24 ч. | 30 мин. | 24 ч. |
| 4,9 | 5,10 | 5,39 | 5,98 | 6,15 |
| 5,3 | 5,16 | 5,21 | 5,84 | 6,12 |
| 5,6 | 5,23 | 5,29 | 6,10 | 6,30 |
| 5,9 | 5,47 | 5,40 | 6,10 | 6,49 |
| 6,2 | 5,76 | 5,74 | 6,24 | 6,71 |
| 6,5 | 5,92 | 5,88 | 6,54 | 7,00 |
| 7,2 | 6,50 | 5,98 | 6,99 | 7,21 |
| 8,1 | 6,80 | 6,60 | 7,26 | 7,52 |

Для установления зависимости активности амилазы от pH, навески (5 г) почвы помещались в колбы емкостью 50 мл, добавлялись 10 мл 2% раствора крахмального клейстера, 0,5 мл толуола и ацетатный буфер со значениями pH: 3,2; 3,8; 4,1; 4,4; 4,7; 5,0; 5,3; 5,6; 5,9; 6,2; 6,8; 7,2. Колбы закрывались пробками, встряхивались и ставились в термостат при температуре 37—38° на 24 ч., в течение которого содержимое колб периодически взбалтывалось. После фильтрования в 100 мл мерных колбах, бралось 20 мл фильтрата и в нем определялись редуцирующие сахара по Бертранию. Активность амилазы выражалась в мг мальтозы на 1 г почвы за сутки.

Исследования показали, что optimum действия амилазы находится в слабокислом интервале при pH 5,6—5,9. Как видно из приведенных кривых, сдвиг optimuma pH сравнительно маленький (рис. 4).

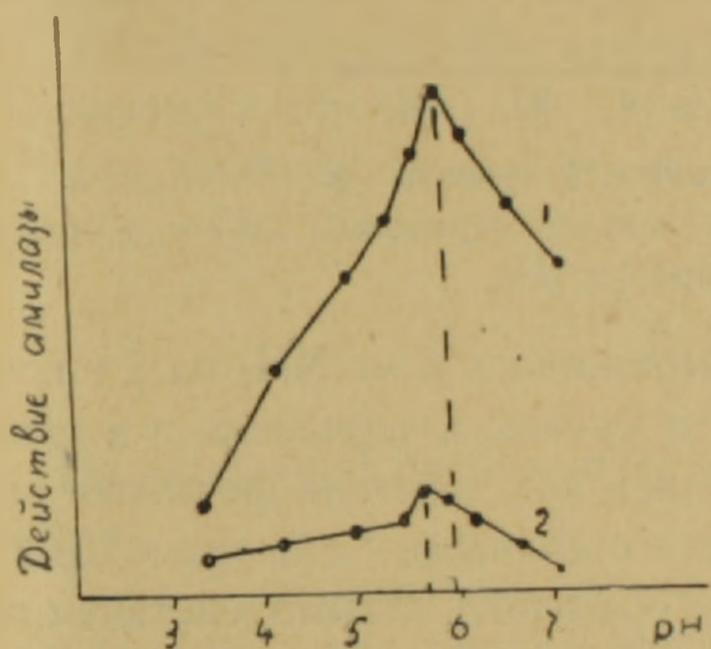


Рис. 4. Зависимость активности амилазы в почве от pH. 1) выщелоченный чернозем, 2) каштановая карбонатная.

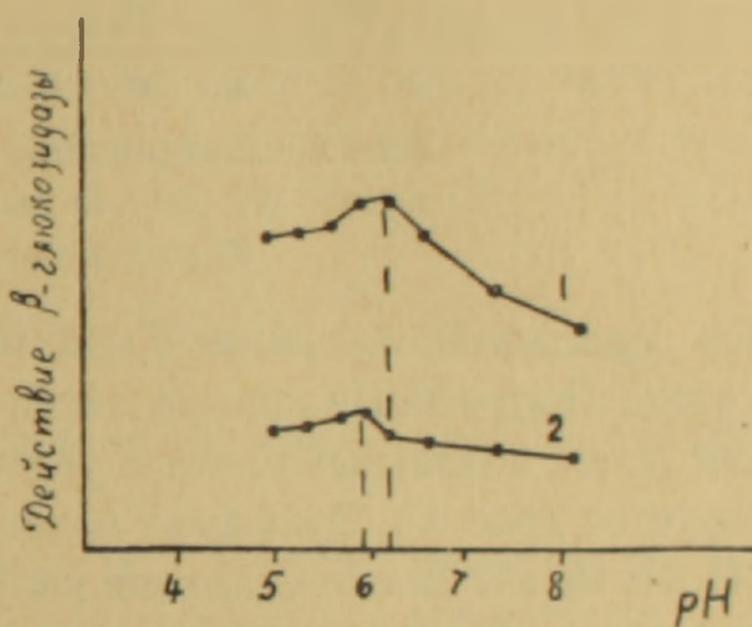


Рис. 5. Зависимость активности β-глюкозидазы в почве от pH. 1) выщелоченный чернозем, 2) каштановая карбонатная.

Установление зависимости активности β-глюкозидазы в почве от pH проводилось следующим образом. Навески (5 г) почвы помещались в колбы, емкостью 50 мл, добавлялось 5 мл 10% раствора арбутина и фосфатный буфер со значениями pH: 4,9; 5,3; 5,6; 5,9; 6,2; 6,5; 7,2; 8,1. Добавлялось 0,5 мл толуола, колбы закрывались пробками, встряхивались и ставились в термостат при температуре 37—38° на 24 ч., в течение которого содержимое колб периодически встряхивалось. После фильтрования в 100 мл мерных колбах бралось 20 мл фильтрата и в нем определялись редуцирующие сахара по Бертранию. Активность β-глюкозидазы выражалась в мг глюкозы на 1 г почвы за сутки.

Полученные данные по активности β-глюкозидазы в различных почвах показали, что optimum действия фермента лежит при pH 5,9—6,2 (рис. 5).

Таким образом, проведенные исследования показали, что инвертаза, амилаза и β-глюкозидаза в почвах имеют свои соответствующие optimumы действия, сдвиг которых в связи с содержанием карбонатов незначителен.

Совершенно иная картина наблюдается у уреазы почвы. Ее актив-

ность с увеличением рН возрастает по прямой. Зависимость активности уреазы от рН определялась следующим образом. Навески (5 г) почвы помещались в 50 мл колбы, прибавлялось 10 мл 10% раствора мочевины и фосфатный буфер со значениями рН: 4,9; 5,6; 6,2; 6,6; 6,8; 7,2; 8,1; 9,2. Прибавлялось 0,5 мл толуола, колбы закрывались пробками и ставились в термостат при температуре 37—38° на 24 ч., в течение которого содержимое колб периодически встряхивалось. После инкубации аммиак опреде-

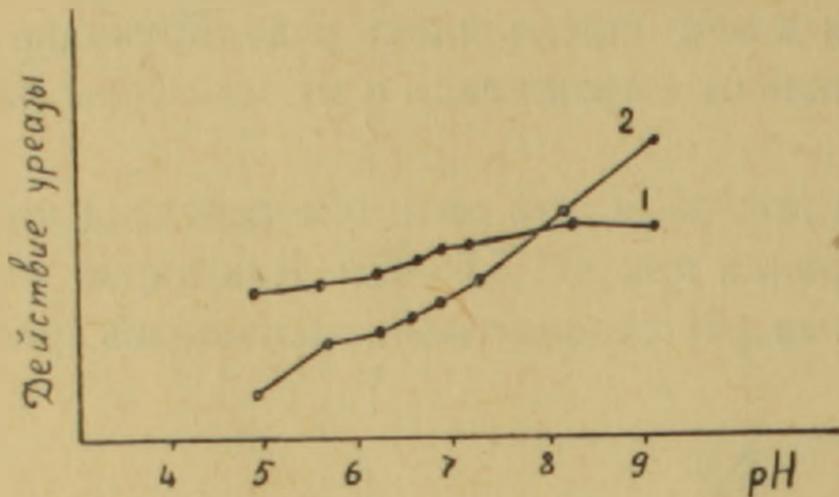


Рис. 6. Зависимость активности уреазы в почве от рН 1) выщелоченный чернозем, 2) каштановая карбонатная.

лялся перегонкой. Активность уреазы выражалась в мг NH_3 на 1 г почвы за сутки. Полученные кривые активности уреазы в черноземе и в каштановой почве показывают, что с увеличением рН действие фермента активизируется (рис. 6). Этот факт расходится с данными Гофмана и Шмидта [7]. Поэтому мы склонны данное явление объяснить взаимодействием продуктов ферментной реакции с почвой. При ферментативном гидролизе мочевины образуется аммиак и углекислота. Оба соединения в отличие от сахаров могут значительно изменить рН среды. В начале инкубации рН суспензии бывает низкой, а к концу повышается (табл. 4).

Таблица 4
Изменение рН среды при инкубации мочевины с почвой

| рН прибавленного буфера | Чернозем | | Каштановая | |
|-------------------------|----------|-------|------------|-------|
| | 30 мин. | 24 ч. | 30 мин. | 24 ч. |
| 4,94 | 5,65 | 8,37 | 6,24 | 8,44 |
| 5,59 | 5,72 | 8,22 | 6,32 | 8,50 |
| 5,91 | 5,85 | 8,30 | 6,30 | 8,50 |
| 6,24 | 6,00 | 8,48 | 6,45 | 8,80 |
| 6,47 | 6,20 | 8,50 | 6,55 | 9,00 |
| 6,64 | 6,32 | 8,80 | 6,72 | 8,94 |
| 6,81 | 6,50 | 8,68 | 6,85 | 9,10 |
| 6,98 | 6,70 | 8,71 | 7,02 | 9,10 |
| 7,17 | 6,70 | 8,80 | 7,15 | 9,02 |
| 7,38 | 6,85 | 8,80 | 7,38 | 9,00 |
| 7,73 | 7,05 | 8,90 | 7,52 | 9,10 |
| 8,04 | 7,00 | 8,92 | 7,62 | 9,08 |
| 9,18 | 7,11 | 8,92 | 7,72 | 9,20 |

Здесь образовавшийся при ферментативной реакции аммиак в начале инкубации поглощается почвой, и в суспензии доминируют ионы HCO_3^- и

CO_3^{2-} поэтому рН бывает низкой. В течение инкубации почва насыщается аммиаком и его избыток накапливается в растворе, что и приводит к дальнейшему повышению рН среды. Поглощенный почвой аммиак вытесняется взбалтыванием почвы с 1 н раствором КСl.

При инкубации мочевины с почвой определялась также общая щелочность раствора. Выяснилось, что в первые часы инкубации щелочность равна нулю, а со временем она возрастает и в течение суток доходит до 458,7 мг экв. HCO_3^- на 100 г почвы.

Таким образом, уреазы в почве могут действовать при сравнительно широком значении рН. Фосфатный буфер с высокими значениями рН с начала инкубации снижает рН среды и создает в суспензии оптимальные условия для действия уреазы, а затем повышение щелочности среды не подавляет действие уреазы, а наоборот.

Следует отметить, что в солончаках активность гидролаз нами не обнаруживалась. Отсутствие действия гидролаз в солончаках при различных рН связано с тем, что продуцированные ферменты здесь инактивировались под влиянием высокого засоления и сильно выраженной щелочной реакции среды рН 9—11.

В ы в о д ы

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Карбогидразы: инвертаза, амилаза и β -глюкозидаза почвы имеют оптимальные рН, при котором они проявляют высокую активность.

2. Оптимальное действие инвертазы почвы находится в интервале рН 4,5—5,0. При определении активности инвертазы в почве можно использовать ацетатный буфер с рН 4,7.

3. Оптимальный рН действия амилазы почвы лежит при рН 5,6—5,9.

4. Оптимальное действие β -глюкозидазы почвы находится в интервале рН 5,9—6,2.

5. Активность уреазы в почве повышается с увеличением значения рН. Для получения сравнительных данных при определении активности уреазы в почве можно использовать фосфатный буфер с рН 6,7—7,0, который близок оптимальному чистого фермента.

Институт почвоведения и агрохимии
МП и ЗСХП АрмССР

Поступило 10.IV 1962 г.

Լ. Վ. ԽԱՐԿՈՍՅԱՆ, Ա. Շ. ԳԱԼՍՏՅԱՆ

ՀՈՂԻ ՄԻ ՔԱՆԻ ՀԻԳՐՈԼԱԶՆԵՐԻ ՕՊՏԻՄՈՒՄ ՔՈՒՐ

Ա մ փ ո փ ո ւ մ

Հողերի ֆերմենտային ակտիվությունն ուսումնասիրելիս անհրաժեշտ է իմանալ նրանց գործունեության օպտիմումը рН-ը: Տվյալ հարցի կարևորու-

թյունը բխում է նրանից, որ բնության մեջ հանդիպում են տարբեր рН ունեցող հողեր: Այս աշխատության մեջ պարզաբանվել է ինվերտազայի, ամիլազայի, -գլուկոզիդազայի և ուրեազայի օպտիմում рН-ը և նրա տեղաշարժը՝ կախված հողի իսկ рН-ից:

Պարզվել է, որ հողի կարբոհիդրազներն ունեն օպտիմում рН, որում նրանք գործում են բարձր ակտիվությամբ:

1. Հողի ինվերտազայի գործունեության օպտիմումը գտնվում է рН 4,5—5,0 սահմաններում, նրա ակտիվությունը որոշելիս կարելի է օգտագործել ացետատային բուֆեր рН 4,7.

2. Հողի ամիլազայի գործունեության օպտիմումն ընկած է рН 5,6—5,9 սահմաններում:

3. Հողի β գլուկոզիդազայի գործունեության օպտիմումը գտնվում է рН 5,9—6,2 սահմաններում:

Այսպիսով, հողի կարբոհիդրազների օպտիմում рН տեղաշարժը, նրա կարբոնատությունից կախված, աննշան է:

Ինչ վերաբերում է հողի ուրեազային, ապա рН-ի նշանակության մեծացման հետ նրա ակտիվությունը բարձրանում է, նշանակում է ուրեազան հողում գործում է рН-ի լայն սահմաններում: Վերջինս հատուկ ուսումնասիրության հարց է, որի պարզաբանումը ներկայացնում է որոշակի հետաքրքրություն: Հողում ուրեազայի ակտիվության համեմատական տվյալներ ստանալու համար կարելի է օգտագործել ֆոսֆատային բուֆեր рН 6,7—7,0, որը մոտ է մարուր ֆերմենտի օպտիմումին:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Купревич В. Ф. Биологическая активность почвы и методы ее определения. ДАН СССР, т. 79, 5, 1951.
2. Самнер Дж. Б и Сомерс Г. Ф. Химия ферментов и методы их исследования. М., И—Л. 1948.
3. Нейландс Дж., Штумпер П. Очерки по химии ферментов. И—Л. 1958.
4. Кретович В. Л. Основы биохимии растений. М., 1961.
5. Чернов В. А. Современные методы исследования физико-химических свойств почв. т. IV, вып. 3, 1948.
6. Hofmann E. und Seegerer A. Biochemische Zeitschrift, Bd 322, 1951.
7. Hofmann E. und Schmidt W. Biochemische Zeitschrift, Bd 324, H. 2, 1953.