ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՌ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱՅԻ ՏԵՂԵԿԱԳԻՐ
ИЗВЕСТИЯ АКАДЕМИИ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР
Բիոլոգիական գիտ. XVIII, № 7, 1965 Биологические науки

А. Ш. ГАЛСТЯН, Л. В. МАРКОСЯН

К ИЗУЧЕНИЮ ОПТИМУМОВ pH ФЕРМЕНТОВ ПОЧВЫ

Как известно, действие ферментов зависит от активной кислотности среды, ее pH. При определенном интервале pH ферментативные реакции идут с наибольшей скоростью. Эти значения pH являются оптимальными для данных ферментов [1]. В случае изменения pH среды в кислую или щелочную сторону от оптимальной, активность ферментов снижается и может полностью исчезнуть. Поэтому установление оптимумов pH ферментов является необходимостью в энзимологических исследованиях почвы [4—9].

В настоящее время сравнительно хорошо изучены оптимумы pH гидролитических ферментов почвы, которые в основном находятся в кислом интервале. Однако до сих пор некоторые вопросы взаимодействия буферных растворов с почвой остались неосвещенными. Выяснение этих вопросов поможет установлению оптимумов pH ферментов, находящихся в щелочном интервале. В этом отношении данное исследование является продолжением и дополнением ранее проведенных [4].

Исследования проводились на различных типах почв. Образцы почвы высушивались до воздушно-сухого состояния, очищались от остатков корней, просеивались через сито диаметром отверстий в 1 мм и поступили в анализ. Для анализов были использованы общепринятые методы [2, 3].

Изучения оптимумов pH гидролитических ферментов почвы показали, что карбогидразы высокой активностью действуют в кислом интервале pH, сдвиг которых в зависимости от типа почв незначительный. Устойчивость значений pH прибавленного ацетатного буфера сравнительно хорошо сохраняется при взаимодействии субстратов с почвой (рис. 1). Это обусловлено высокой буферной способностью почвы и продуктами ферментативной реакции, не оказывающих существенного влияния на pH среды [4]. Несколько иначе обстоит дело с амидазами, активность которых возрастает с повышением значения pH прибавленного фосфатного буфера. Здесь прибавленный фосфатный буфер не сохраняет свои значения. При взаимодействии с почвой происходит снижение его высоких значений, которые стремятся к нейтральной реакции, где амидазы действуют высокой активностью [1]. Следовательно, с начала реакции амидазы почвы находятся под влиянием благоприятного значения pH среды, т. е. в изоэлектрическом состоянии и их активность возрастает по прямой (рис. 2). В дальнейшем аналогичная картина была получена для фосфатазы и дегидрогеназ, оптимумы pH которых находятся в щелочном интервале.

Эти факты явились причиной выяснения некоторых сторон взаимодействия почвы с наиболее используемыми буферными растворами в почвенно-энзимологических исследованиях. Для этого одинаковые навески почвы обрабатывали тремя различными буферными растворами с определенными значениями pH. К навеске почвы (5 г) прибавляли

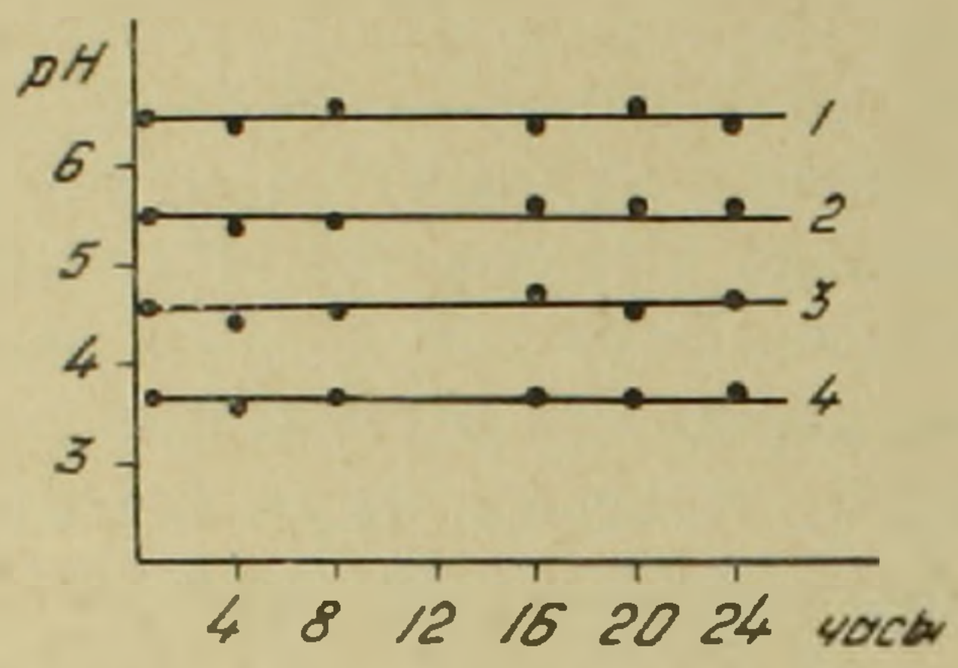

Рис. 1. Изменение pH водной (1) и ацетатно-буферной (2, 3, 4) суспензий выщелоченного чернозема при инвертазной реакции.

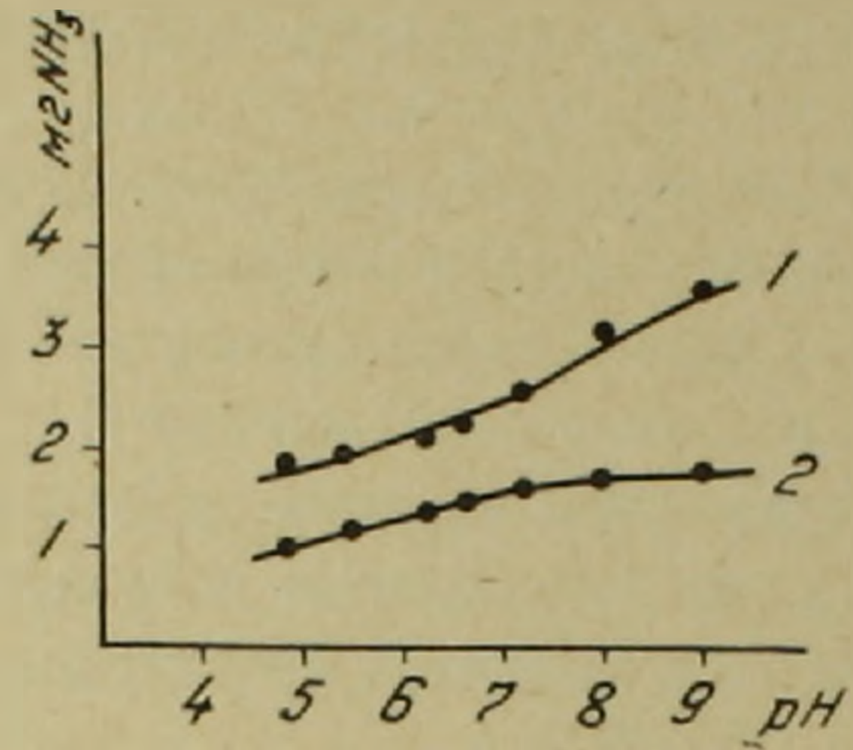

Рис. 2. Зависимость активности уреазы (1) и аспарагиназы (2) почвы от pH прибавленного фосфатного буфера.

10 мл ацетатного, фосфатно-цитратного и фосфатного буферов с различными значениями pH. После тщательного взбалтывания определяли pH суспензии. Полученные данные (табл. 1) показывают определенную закономерность: чем выше pH буфера, прибавленного к почве, тем больше

Таблица 1

Изменение pH буферных растворов при взаимодействии с выщелоченным черноземом (pH 6,3)

Ацетатный		Фосфатно-цитратный		Фосфатный	
pH					
прибавленного буфера	суспензии	прибавленного буфера	суспензии	прибавленного буфера	суспензии
3,2	3,6	3,0	4,0	4,9	5,6
3,8	3,9	4,0	4,2	5,6	5,7
4,1	4,1	4,4	4,5	6,2	6,0
4,4	4,3	4,8	4,8	6,5	6,1
4,7	4,6	5,0	5,0	6,6	6,5
5,0	4,9	5,4	5,3	6,8	6,5
5,3	5,2	5,6	5,5	7,2	6,8
5,6	5,5	6,0	5,8	7,7	7,1
5,9	5,8	7,0	6,6	8,3	7,2
6,2	6,0	8,0	7,3	9,2	7,3

снижается ее значение. Прибавленный ацетатный буфер почти не меняет значения своих pH. Это обусловлено составом ацетатного буфера, значение pH которого находится в кислом интервале и значительным буферным свойством чернозема [4]. В случае фосфатно-цитратного и фос-

фатного буферов наблюдается следующая картина: значения pH буферов в кислом интервале также почти не меняются, а в щелочном они ощутимые. Причем значение фосфатного буфера с pH 9,2 снижается почти на две единицы. Этот буфер является раствором соли двузамещенного фосфорнокислого натрия, который в почве имеет малую буферную способность (10 мл 0,1 м раствор этой соли содержит 30,7 мг натрия). Значительная часть натрия вступает в обменную реакцию с почвенными коллоидами и вытесняет поглощенные водород и алюминий, которые резко снижают pH суспензии. Здесь не исключается также возможность вытеснения обменного железа и марганца, ведущих себя аналогично, но в значительно слабой форме.

После взаимодействия фосфатного буфера с почвой анализ водной вытяжки показал, что при щелочной реакции среды в результате поглощения натрия, из почвенных коллоидов кальций и магний почти не переходят в вытяжку, что имеет место в кислой среде (табл. 2). Переход

Таблица 2

Изменение содержания катионов в водной вытяжке при взаимодействии фосфатного буфера с выщелоченным черноземом

Вытяжки	В мг—экв на 100 г почвы					
	прибавлено		обнаружено			
	Na	K	Na	K	Ca	Mg
Без буфера	—	—	0,2	0,1	0,2	0,1
pH 4,9	0,2	9,9	0,3	4,9	1,6	1,0
pH 6,9	12,0	4,0	10,5	0,8	0,5	0,1
pH 9,2	20,0	—	13,5	0,2	0,3	0,1

кальция и магния в кислой среде не оказывает существенного влияния на изменение pH суспензии. Эта закономерность наблюдалась также и с другими типами почв. Значительное изменение pH среды имеет место в результате обменной реакции между катионами прибавленных буферов и поглощенным водородом (водород способен к обмену при нейтральной и щелочной реакции среды). Следовательно, изменение pH буферной суспензии зависит от потенциальной кислотности почвы, т. е. от способности почвы выделять ионы водорода. Отсюда вывод, чем сильнее выражена гидролитическая и обменная кислотность почвы, тем значительнее будет снижение высоких значений pH фосфатного буфера. Поэтому для исследования были взяты почвы с различной кислотностью (табл. 3).

Горно-луговые почвы обладают высокой потенциальной кислотностью, обусловленной водородными и алюминиевыми ионами в компенсирующем слое коллоидов. Почвенный раствор имеет повышенные количества водородного иона, следовательно и низкие величины pH. В результате взаимодействия фосфатного буфера с этими почвами pH сус-

Таблица 3

Данные кислотности почв

Почва	pH		В мг—экв на 100 г почвы			
	водной суспензии	солевой суспензии	гидролитическая кислотность	обменная кислотность		
				Al	H	сумма
Дерново-торфянистая	4,4	3,6	17,4	1,6	1,2	2,8
Горно-луговая темноцветная	4,5	3,8	12,6	1,9	0,6	2,5
Горно-луговая коричневая	5,2	4,6	10,9	1,1	0,8	1,9
Выщелоченный чернозем	6,3	5,4	3,1	0,5	0,2	0,7
Каштановая карбонатная	8,1	7,4	0,3	—	—	—
Содовый солончак	9,9	9,7	—	—	—	—

пензии меняется в сторону снижения, в соответствии с величиной их гидролитической и обменной кислотности (табл. 4).

Таблица 4

Изменение pH фосфатного буфера при взаимодействии с различными типами почв

pH прибавленного буфера	Дерново-торфянистая	Горно-луговая темноцветная	Горно-луговая коричневая	Каштановая	Солончак содовый
4,9	4,0	4,2	4,6	5,7	7,3
5,5	4,2	4,3	4,7	5,9	7,5
6,0	4,5	4,6	5,0	6,1	7,7
6,2	4,6	4,8	5,2	6,4	7,6
6,5	4,8	5,0	5,4	6,5	7,8
6,9	5,1	5,4	5,7	6,7	8,0
7,4	5,2	5,6	6,0	7,0	8,4
8,1	5,4	5,8	6,3	7,4	8,8
8,5	5,5	5,8	6,3	7,5	9,4
9,2	5,9	6,3	7,0	7,7	9,8

В случае черноземов и каштановых почв меняются лишь высокие значения pH прибавленного буфера, а в содовом солончаке и этого не отмечается, так как последний не обладает потенциальной кислотностью.

Таким образом, изменение pH буферного раствора при взаимодействии с различными типами почв, особенно снижение их высоких значений в щелочном интервале, говорит о том, что для изучения оптимумов pH ферментов почвы после прибавления буфера необходимо значение pH суспензии довести до соответствующей величины. Зависимость активности ферментов почвы от pH определяли следующим образом.

Навески (5 г) почвы помещали в 50 мл стаканы, прибавляли субстраты и с помощью pH-метра в суспензии, прибавлением отдельных компонентов создавали соответствующие значения pH фосфатного буфера.

Для определения активности уреазы после взаимодействия мочевины с почвой при различных значениях pH, аммиак определяется не-

регонкой [4]. Анализами установлено, что оптимум действия уреазы находится в нейтральном интервале pH (рис. 3), сдвиг которого в различных типах почв незначительный [5, 8].

Изучение кинетики уреазной реакции почвы показало, что в результате накопления аммиака pH среды со временем повышается (рис. 4) и происходит некоторое подавление активности фермента.

При pH 9,0, где уреаза почвы почти не действует, pH среды не изменяется. Значительное повышение имеет место при pH 4,9. Изменение pH среды при уреазной реакции зависит от типа почвы и ее буферности. Если почва обладает большой буферной способностью pH среды сравнительно мало меняется.

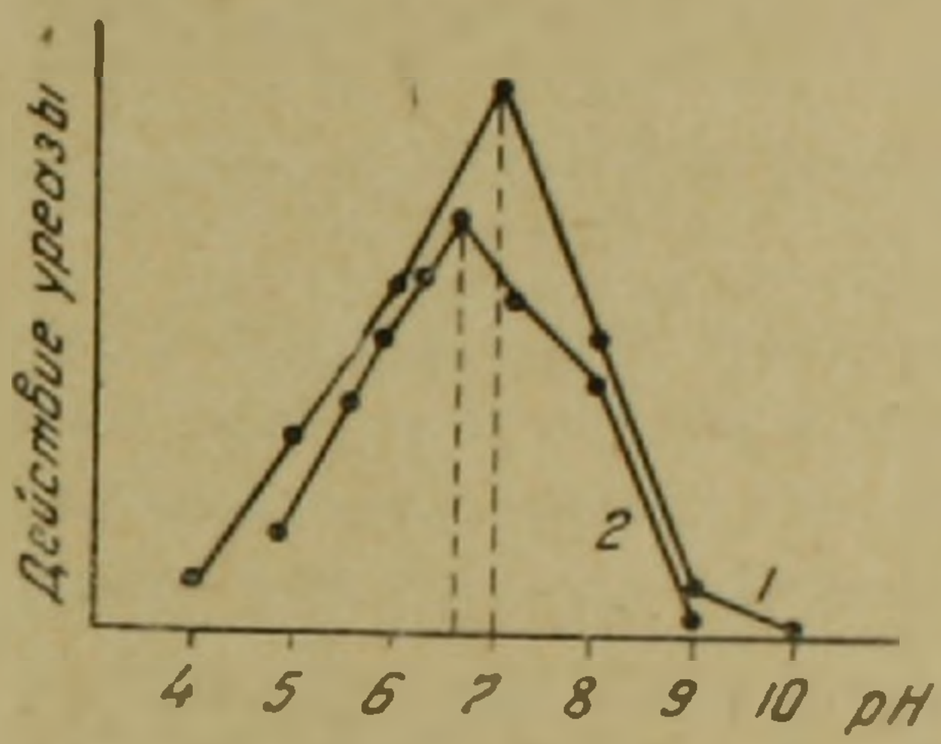

Рис. 3. Зависимость активности уреазы почвы от pH: 1) чернозем выщелоченный, 2) каштановая карбонатная.

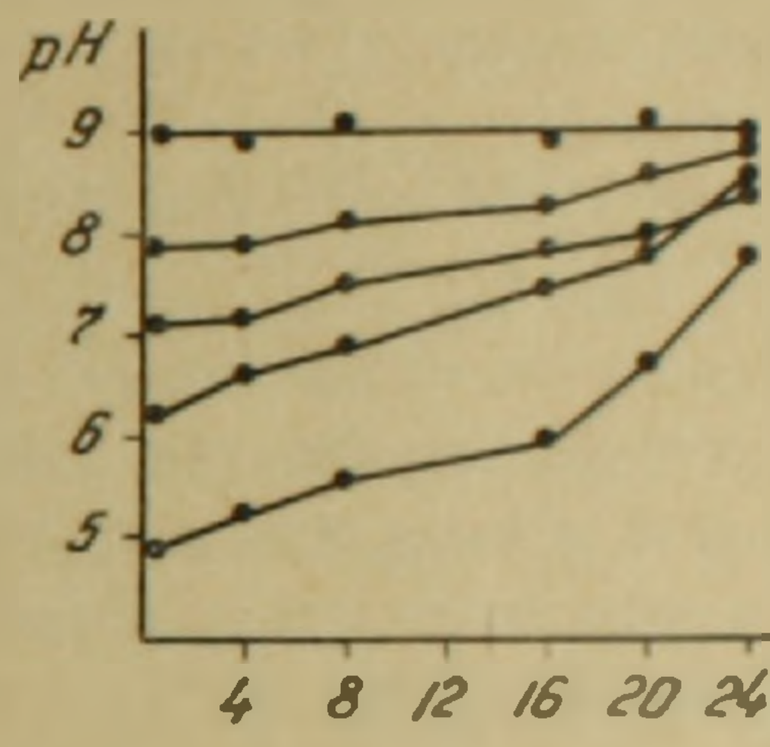

Рис. 4. Изменение pH фосфатно-буферной суспензии выщелоченного чернозема при уреазной реакции.

Изучение оптимума pH фосфатазы почвы показало, что его сдвиг очень большой—от pH 6,0 до 8,0 (рис. 5). Это обусловлено действием кислой и щелочной фосфатаз почвы. В выщелоченных черноземах и в

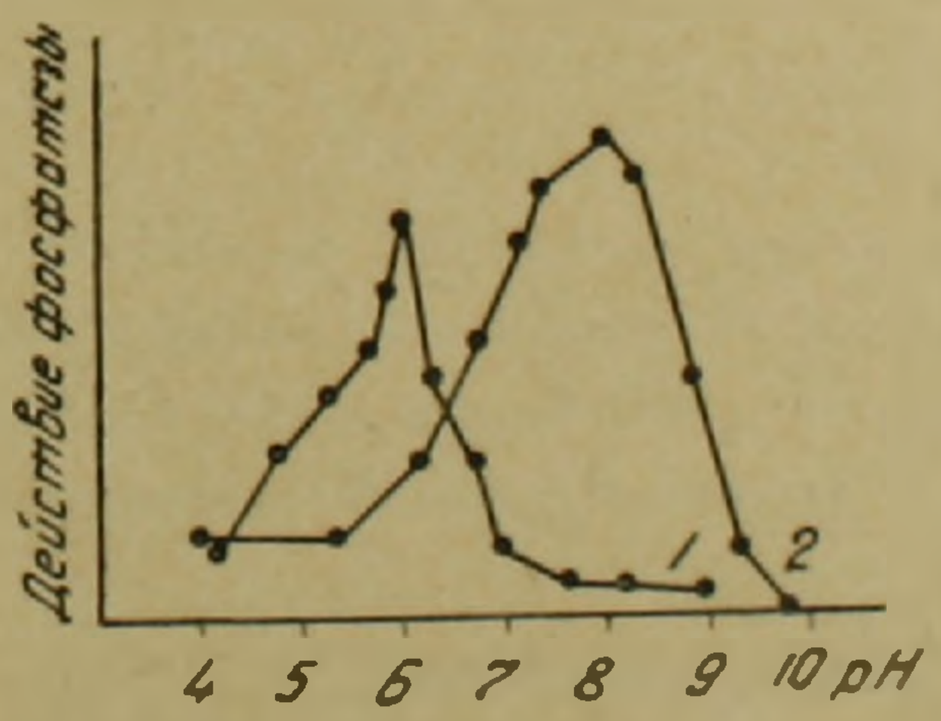

Рис. 5. Зависимость активности фосфатазы почвы от pH: 1) чернозем выщелоченный, 2) каштановая карбонатная.

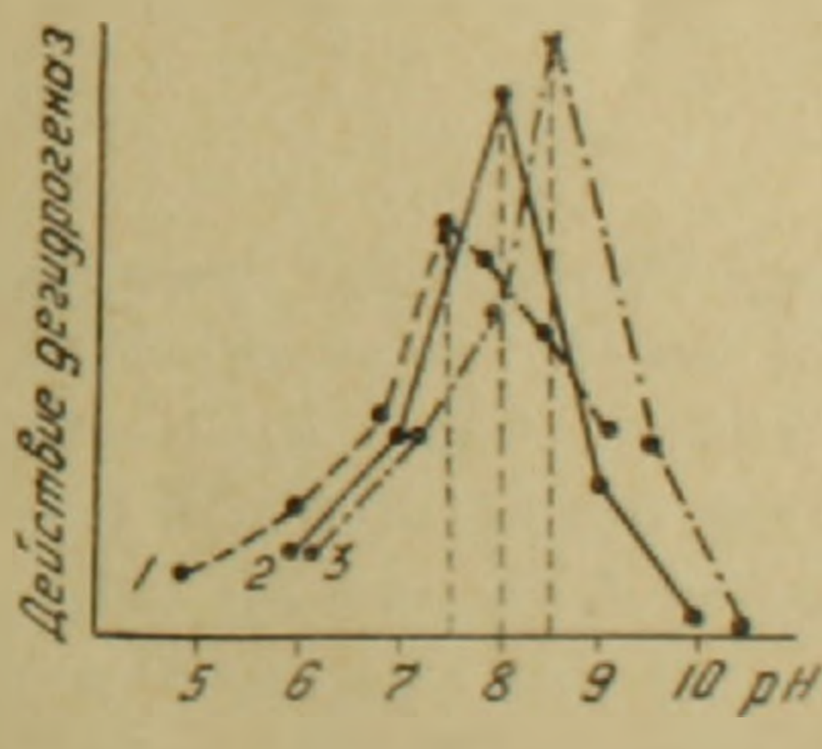

Рис. 6. Зависимость активности дегидрогеназ почвы от pH: 1) каштановая карбонатная, 2) чернозем выщелоченный, 3) чернозем солонцеватый.

горно-луговых почвах в основном действует кислая фосфатаза, а в бурых и каштановых—щелочная.

Был установлен также оптимум pH действия дегидрогеназ почвы (рис. 6). Выяснилось, что дегидрогеназы высокой активностью действу-

ют в щелочном интервале и в зависимости от типа почвы и ее физико-химических свойств его сдвиг достигает единицы. Это в основном объясняется тем, что в системе почвенных дегидрогеназ действует много ферментов.

Таким образом, в результате изучения оптимумов pH ферментов почвы можно сделать следующие выводы:

1) учитывая особенности взаимодействия буферных растворов с почвами, при установлении оптимумов pH ферментов необходимо предварительно с помощью pH-метра в среде буферными растворами создавать соответствующие значения pH;

2) оптимумы pH действия уреазы и аспарагиназы почвы находятся в нейтральном интервале для уреазы pH 6,6—7,0, а аспарагиназы pH 6,9;

3) в почвах действуют кислая (pH 5,4—6,0) и щелочная (pH 8,0—8,5) фосфатазы;

4) оптимум pH действия дегидрогеназ находится в щелочном интервале pH 7,4—8,5;

5) определение оптимума pH ферментов почвы показало, что карбогидразы высокой активностью действуют в кислом интервале, амидазы в нейтральном, а оксидазы в щелочном. Эти данные дают возможность выяснить особенности разложения и синтеза органических веществ в процессе почвообразования.

Институт почвоведения
и агрохимии МСХ АрмССР

Поступило 19.II 1965 г.

Ա. Շ. ԳԱԼՍՏՅԱՆ, Լ. Վ. ՄԱՐԿՈՍՅԱՆ

ՀՈՂԻ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ՕՊՏԻՄՈՒՄ pH-Ի ՀԵՏԱԶՈՏՄԱՆ ՄԱՍԻՆ

Ա մ փ ո փ ո ւ մ

Հողի ֆերմենտների օպտիմում pH-ի ուսումնասիրման կարևորությունը բխում է նրանից, որ բնության մեջ հանդիպում են տարբեր աստիճանի թթվություն ունեցող հողեր։ Այդ հողերի թթվության աստիճանից կախված է ֆերմենտների ակտիվությունը և նրա որոշման հաջողությունը։ Այս ուղղությամբ կատարված հետազոտություններից պարզվել է հետևյալը՝

1. Հողի վրա ավելացրած բուֆերները միշտ չէ, որ պահպանում են իրենց նշանակությունը։ Հաշվի առնելով այս հանգամանքը, հողի ֆերմենտների օպտիմում pH-ը որոշելիս անհրաժեշտ է նախօրոք pH-ի դործիքի օգնությամբ միջավայրում ստեղծել նրա համապատասխան արժեքները։

2. Հողի ամիդազների օպտիմում pH-ը գտնվում է չեզոք միջավայրում՝ ուրեազա pH 6,6—7,0, ասպարագինազա pH 6,9։

3. Հողում գործում են երկու տեսակ ֆոսֆատազներ՝ թթվային pH 6,0 և հիմնային pH 8,0։

4. Հողի դեհիդրազների օպտիմում pH-ը գտնվում է հիմնային միջավայրում pH 7,4—8,5։

5. Հողի ֆերմենտների օպտիմում pH-ի որոշումներից պարզվել է, որ կարբոհիդրազները ավելի ակտիվ գործում են թթվային միջավայրում, ամիդազանները՝ չեզոք, իսկ օքսիդազները՝ հիմնային։ Այս տվյալները հնարավորություն են տալիս պարզելու օրգանական նյութերի քայքայման և սինթեզի առանձնահատկությունները հողագոյացման պրոցեսում։

ЛИТЕРАТУРА

1. Нейландс Дж., Штумпер П. Очерки по химии ферментов. И.—Л., 1958.
2. Галстян А. Ш., Татевосян Г. С. Физика, химия, биология и минералогия почв СССР (доклад к VIII Международному конгр. почвоведов), Москва, 1964.
3. Агрохимические методы исследования почв, Москва, 1960.
4. Маркосян Л. В., Галстян А. Ш. Изв. АН Арм. ССР (биолог. наук), т. 16, 2, 1963.
5. Василенко Е. С. Почвоведение, II, 1962.
6. Kiss I. Talajenzimek, Addendum in Dr. Csapo, Mozsef: Talajtan. Bukarest, 1958.
7. Hofmann E., Seegerer A. Biochemische Zeitschrift, Bd 322, 1951.
8. Hofmann E., Schmidt W. Biochemische Zeitschrift, Bd 324, H. 2, 1953.
9. Drobnik J. Folia Biol. Praha, 1, 1955.