

С. А. АБРАМЯН. А. Ш. ГАЛСТЯН

О ПРИМЕНЕНИИ МАСКИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ФЕРМЕНТОВ ПОЧВ

Выявлена возможность изучения ферментов ненасыщенных почв с предварительной маскировкой мешающих элементов. Для определения активности нуклеазы и фосфатазы горно-луговых почв по учету ферментативно отщепленной фосфорной кислоты в качестве маскирователя алюминия рекомендуется использовать этилендиаминтетраацетат (ЭДТА).

Определение активности ферментов почв основано на измерении скорости катализируемых ими реакций путем учета количества продукта ферментативного превращения или непревращенного субстрата [8]. Однако в некоторых случаях в присутствии в почве мешающих элементов невозможно количественно определить продукт ферментативной реакции, в результате чего активность данного фермента в почве учитывается неправильно. Это наблюдалось при определении активности нуклеазы в ненасыщенных почвах по учету фосфорной кислоты, количественному определению которой мешают некоторые элементы, в частности подвижный алюминий.

Исходя из этого, нами впервые ставилась задача устранить мешающие элементы применением маскирующих соединений при определении активности ферментов ненасыщенных почв. Основой такого подхода явилось широкое применение этого способа в аналитической химии [5, 10, 12].

Материал и методика. Исследования проводились на почвах различной степени насыщенности и содержания подвижного алюминия (3,11). Насыщенные почвы: бурая лугово-орошаемая, карбонатная, тяжелосуглинистая, гумус—1,8%, рН водной суспензии—8,2 (Октемберянский район); бурая полупустынная, карбонатная, среднесуглинистая, гумус—2,2, рН 8,1 (Шаумянский район); каштановая, карбонатная, среднесуглинистая, гумус—3,4, рН 8,0 (Абовянский район); чернозем выщелоченный, среднесуглинистый, гумус—7,1, рН 6,5 (Севанский район). Эти почвы не содержат подвижного алюминия. Ненасыщенные почвы: горно-луговые, среднесуглинистые—дерново-торфянистые, степень насыщенности—53%, подвижный алюминий—5,9 мг/кг на 100 г почвы (Арзгач); дерновая, степень насыщенности—64, подвижный алюминий—1,2 (г. Арагач); слабозадерненная (темно-цветная), степень насыщенности—72, подвижный алюминий—0,7 (Карахачский перевал); лугово-степная черноземовидная, среднесуглинистая, степень насыщенности—90, подвижный алюминий—0,2 (Семеновский перевал); краснозем глинистый, степень насыщенности—40, подвижный алюминий—7,3 (Грузинская ССР); дерново-подзолистая, легкосуглинистая, степень насыщенности—67, подвижный алюминий—1,3 (Московская обл.).

Активность нуклеазы почв определялась следующим методом: навески (1 г) воздушно-сухой почвы, просеянной через сито с диаметром отверстий 0,25 мм, помещали в конические колбы на 100 мл и прибавляли 3 мл 0,1 н ЭДТА. Содержимое колбы тща-

тельно перемешивали, добавляли 2 мл 0,2%-ного раствора нуклеата натрия. При определении активности других фосфатаз добавляли соответствующие субстраты. Колбы осторожно взбалтывали и ставили на взаимодействие в термостат при 30°C на 24 часа. Контролем служила почва с водой, с маскирователем и субстрат без почвы. После взаимодействия субстрата с почвой ферментативно отщепленный минеральный фосфор экстрагировали 50 мл буферной смесью Труога ($H_2SO_4 + (NH_4)_2SO_4$). Для этого колбы взбалтывали на ротаторе в течение 30 мин. Содержимое фильтровали, в фильтрате (10 мл) фосфор определяли по Труогу-Мейеру [4, 6]. Активность нуклеазы выражалась количеством отщепленного фосфора в миллиграммах P_2O_5 на 100 г почвы.

Оптimum pH действия нуклеаз в почве устанавливали с помощью этаноламин-уксуснокислого буфера [1]. Сдвиги pH при взаимодействии субстратов с почвой устанавливали pH-метром. Активность фосфатаз определялась по методу Галстяна с учетом неорганического фосфора [8]. В опытах были испытаны следующие маскирователи: этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), щавелевая кислота— $H_2C_2O_4$ и фтористый аммоний— NH_4F .

Результаты и обсуждение. Определение активности нуклеазы почв по учету фосфорной кислоты показало, что в ненасыщенных почвах по сравнению с насыщенными она низка. Это явление обусловлено содержанием в ненасыщенных почвах—горно-луговых, подзолистых и красноземных—подвижного алюминия, связывающего продукт ферментативной реакции—фосфорную кислоту—в малорастворимое соединение. При значительном содержании его в почве активность нуклеазы по фосфорной кислоте вовсе не обнаруживается.

Фосфорная кислота с некоторыми катионами почвы образует малорастворимые соединения— $AlPO_4$ пр. $5,75 \cdot 10^{-19}$, $FePO_4$ —пр. $1,30 \cdot 10^{-22}$, $Ca_3(PO_4)_2$ —пр. $2,0 \cdot 10^{-29}$, исключающие возможность ее количественного определения [7, 9]. Поэтому было предложено определение активности фосфатаз почв производить учетом органической части субстрата, а не фосфорной кислоты [8]. С этой точки зрения метод определения активности нуклеазы почв по пуриновым и пиримидиновым основаниям трудоемкий и требует более сложной аппаратуры, чем при учете фосфорной кислоты. Кроме того, количественное определение фосфорной кислоты как продукта ферментативной реакции способствует познанию особенностей его обмена в почве. В этом аспекте особый интерес представляют реакции окислительного фосфорилирования, требующие дальнейших исследований.

Исходя из изложенного, активность нуклеазы почв определялась в присутствии маскирующих веществ: ЭДТА, $H_2C_2O_4$ и NH_4F , которые в результате комплексообразования предотвращают связывание фосфорной кислоты мешающими элементами. Опыты показали, что без маскирователей в ненасыщенной почве обнаруживается очень низкая активность нуклеазы (рис. 1). Применение маскирователей дает возможность обнаружить высокую активность нуклеазы в горно-луговой почве. Причем она сравнительно выше в присутствии ЭДТА, чем фтористого аммония и щавелевой кислоты. ЭДТА образует более устойчивые комплексы соединения с мешающими катионами [10, 12], в частности с алюминием, и меньше ингибирует действие нуклеазы. Щавелевая кис-

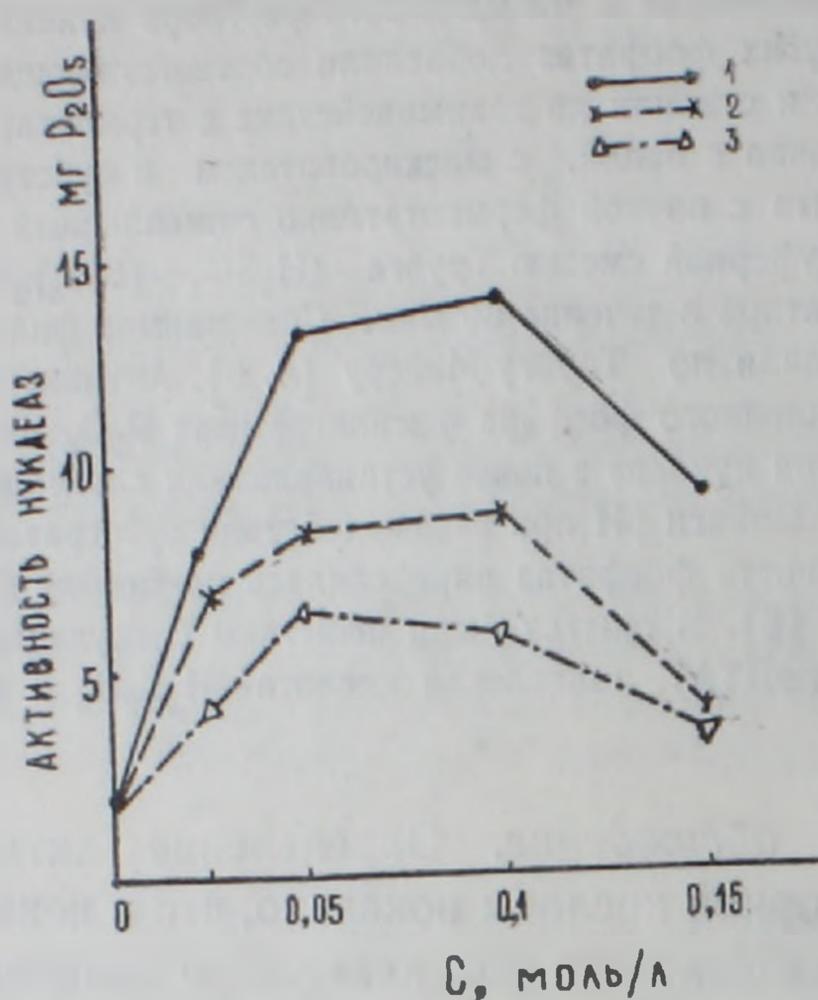


Рис. 1. Влияние концентраций маскирующих соединений на активность нуклеазы горно-луговой дерновой почвы. Маскирователи: 1—ЭДТА, 2— NH_4F , 3— $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$.

лота сравнительно больше подавляет действие нуклеазы почвы, из-за сильного подкисления среды под ее влиянием (рН 2,2).

Исследования показали, что в кислой среде нуклеаза проявляет низкую активность (рис. 2). Оптимум рН действия нуклеаз находится

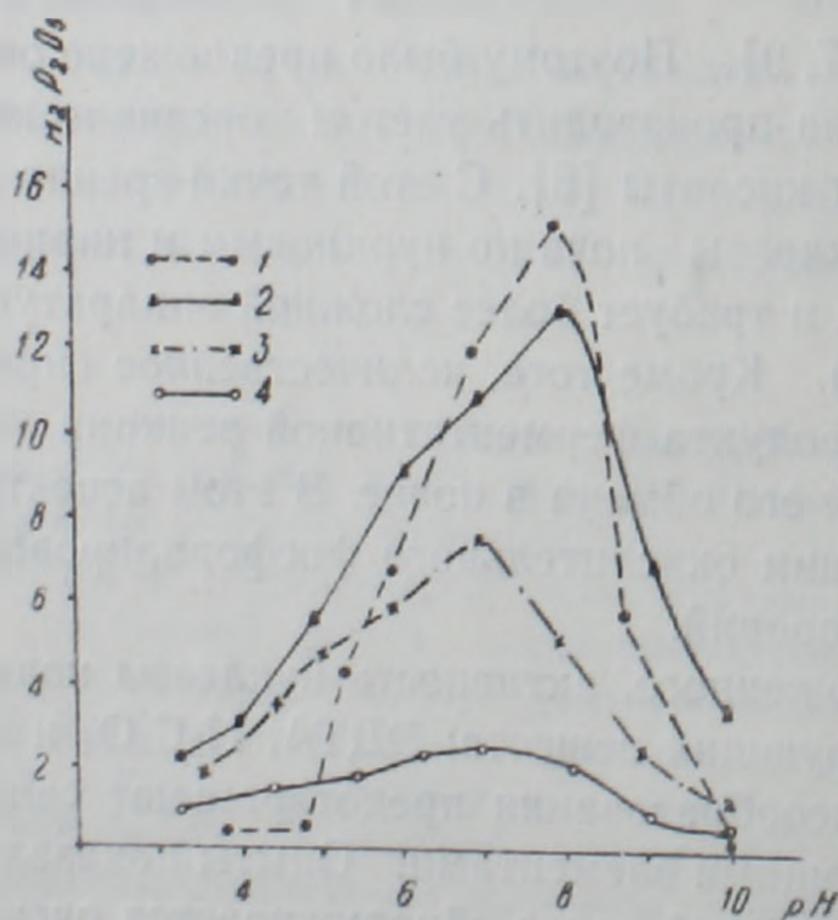


Рис. 2. Зависимость активности нуклеазы почв от рН среды. 1—без добавления буфера; рН буферной суспензии: 2—бурой лугово-орошаемой почвы, 3—горно-луговой почвы с ЭДТА, 4—без него.

в нейтральном и слабощелочном интервале (рН 7,0—8,0). Активность нуклеазы в зависимости от рН среды определялась без добавления буферных растворов—при рН почвы и с помощью этаноламин-уксуснокислого буфера [1, 2]. В горно-луговой почве оптимум рН действия

Таблица

Активность нуклеазы и фосфатазы почв в зависимости от их химического состава и применяемого маскирователя

Почва, пункт взятия образца	Горизонт, глубина, см	Гумус, %	М экв на 100 г почвы				рН. Н ₂ О	Активность, мг Р ₂ О ₅ на 100 г почвы			
			сумма поглощенных оснований	обменная кислотность по Соколову		гидролитическая кислотность		нуклеазы		фосфатазы	
				маскирователь, ЭДТА							
				Н	Al			без	с	без	с
Чернозем выщелоченный, Севанский район	Ап 0—25	7,1	68,1	—	—	—	6,5	8	8	13	8
Лугово-степная черноземовидная, Семеновский перевал	А ₁ 0—12	13,7	46,3	0,1	0,2	5,7	5,8	9	16	16	89
Горно-луговая слаб озадерненная, Карахачский перевал	Ад 0—13	14,4	23,1	0,2	0,7	8,8	5,1	2	20	35	61
Горно-луговая дерновая, г. Арагац	Ад 0—9	15,7	18,9	0,2	1,2	9,5	4,9	2	13	11	73
Горно-луговая, дерново-торфянистая, г. Арагац	Ад 0—7	21,6	15,6	0,6	5,9	14,6	4,6	0	12	9	62

нуклеазы был установлен в присутствии ЭДТА и без него. Применение его дает возможность четко установить оптимальное значение рН действия нуклеазы в ненасыщенной почве.

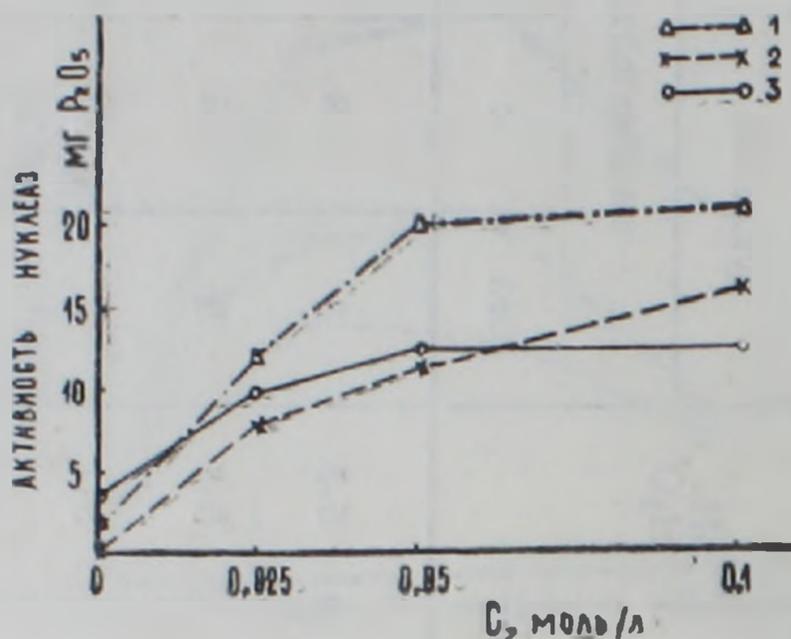


Рис. 3. Влияние ЭДТА на активность нуклеазы горно-луговых почв: 1—слабодерновая, 2—дерново-торфянистая, 3—дерновая.

Испытание различных концентраций маскирователей (0,025, 0,05, 0,1 и 0,15 моль/л) показало, что наиболее эффективной из них является 0,05 и 0,1 моль/л ЭДТА. Это подтвердилось также при определении активности нуклеазы в различных подтипах горно-луговых почв (рис. 3). Высокие концентрации маскирователей (0,15 М) подавляют действие ферментов почвы. При определении активности нуклеазы и фосфатазы ненасыщенных почв рекомендуется использовать 0,1 М раствор ЭДТА, обеспечивающий получение достоверных результатов (табл.). Приведенные данные показывают, что при отсутствии в почве подвижного алюминия применение маскирователей для определения активности фосфогидролаз не эффективно. В некоторых случаях они могут оказать ингибирующее действие на активность фермента.

Итак, установлена возможность определения активности нуклеазы и фосфатазы в ненасыщенных почвах по учету ферментативно отщепленной фосфорной кислоты, с предварительной маскировкой мешающих элементов с помощью ЭДТА. Применение этого способа будет способствовать выявлению особенностей действия ферментов в зависимости от свойств почв.

Институт почвоведения и агрохимии
МСХ АрмССР

Поступило 10.VI 1975 г.

Ս. Ա. ԱՐՐԱՀԱՄՅԱՆ, Ա. Շ. ԳԱԼՏՅԱՆ

ՀՈՂԻ ՖԵՐՄԵՆՏԱՅԻՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐՈՒՄ ՔՈՂԱՐԿՈՂ
ՆՅՈՒԹԵՐԻ ԿԻՐԱՌՄԱՆ ՄԱՍԻՆ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Փորձերից պարզվել է, որ հողի շարժուն ալյումինը խանգարում է ֆոսֆոհիդրոլազների ակտիվության որոշմանը ըստ ֆոսֆորական թթվի: Ալյու-

մինը ֆոսֆորական թթվի հետ առաջացնում է դժվարալուծ միացություն: Նրա խանգարող հատկությունը կարելի է վերացնել քողարկող նյութերի՝ ամոնիումի ֆտորիդի, թրթնջկաթթվի և էթիլենդիամինտետրաացետատի օգնությամբ, որոնք ալյումինի հետ առաջացնում են կայուն կոմպլեքսային միացություններ և հնարավորություն տալիս քանակապես որոշելու ֆոսֆորական թթուն: Վերոհիշյալ քողարկող նյութերից առավել արդյունավետ է էթիլենդիամինտետրաացետատը, որը և առաջարկում ենք հողերի ֆերմենտների ակտիվության որոշման համար:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Абрамян С. А., Галстян А. Ш. ДАН АрмССР, 58, 5, 1974.
2. Абрамян С. А., Галстян А. Ш. Биологический журнал Армении, 28, 2, 1975.
3. Авунджян З. С. Тр. института почвоведения и агрохимии, вып. 4, Ереван, 1968.
4. Агрохимические методы исследования почв. М., 1960.
5. Алексеев В. Н. Количественный анализ. М., 1972.
6. Аринушкина Е. В. Руководство по химическому анализу почв. М., 1961.
7. Возбуцкая А. Е. Химия почвы. М., 1968.
8. Галстян А. Ш. Ферментативная активность почв Армении. Ереван, 1974.
9. Лурье Ю. Ю. Справочник по аналитической химии. М., 1971.
10. Пришибил Р. Комплексоны в химическом анализе. М., 1960.
11. Путеводитель почвенной экскурсии «Закавказье—Армения». М., 1974.
12. Тихонов В. Н. Аналитическая химия алюминия. Серия аналитическая химия элементов. М., 1971.