

С. А. АБРАМЯН, А. Ш. ГАЛСТЯН

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДЫ БУФЕРНЫХ РАСТВОРОВ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ПОЧВ

Активность ферментов почв в значительной степени зависит от природы буферных растворов, используемых для установления оптимумов рН их действия. Торможение действия ферментов под влиянием буферных растворов обусловлено ингибированием или смещением рН среды в результате обменных реакций между компонентами буферных систем и катионами почвы. При исследовании ферментов почв необходимо применение буферных растворов, не обладающих ингибирующими свойствами.

Активная реакция почвы (рН) является чрезвычайно важным фактором, определяющим интенсивность и направленность ферментативных процессов. Отдельные ферменты требуют определенных условия реакции среды. Одни из них, например, гидролазы глюкозидов активны при слабнокислой реакции, амидазы—нейтральной, оксидоредуктазы—слабощелочной [4—8, 11—16]. Обычно зависимость скорости ферментативной реакции от рН среды устанавливается с помощью буферных растворов. С этой целью в практике исследования применяются буферные растворы различной природы с кислыми и щелочными компонентами неорганических и органических соединений.

До настоящего времени влияние природы буферных растворов на активность ферментов почв не изучено. Цель данного исследования заключалась в выявлении некоторых вопросов этой сложной проблемы. Углубленные и систематические исследования в этом направлении, несомненно, приведут к познанию каталитических свойств почвы и механизма действия ферментов в зависимости от реакции среды.

Материал и методика. Исследования проводились на различных типах почв: горнолуговая дерновая, среднесуглинистая (гумус—14,3%, рН 4,5, степень насыщенности—68%); чернозем выщелоченный, среднесуглинистый (гумус—5,6, рН 6,4, степень насыщенности—99); каштановая карбонатная, среднесуглинистая (гумус—3,4, рН 8,0, степень насыщенности—100); бурая полупустынная (гумус—2,2, рН 8,2, степень насыщенности—100); бурая орошаемая луговая (гумус—1,8, рН 8,2, степень насыщенности—100); содовый солончак (гумус—0,6, рН 10,0); мелниорированный солончак АрмССР (гумус—1,1, рН 7,5, степень насыщенности—100); краснозем, глинистый ГрузССР (гумус—4,0, рН 3,9, степень насыщенности—40); дерново-подзолистая легкосуглинистая Московская область (гумус—1,7, рН 4,5, степень насыщенности—67).

В опытах были использованы буферные растворы с неорганическими и органическими компонентами [1, 2, 9] с различными диапазонами рН: уксусно-ацетатный—рН 3,2—6,2, цитратно-фосфатный—2,2—8,0, фосфатный—4,94—9,18, боратный—7,71—9,31, аммонийно-уксуснокислый—3,3—11,0, этаноламин-уксуснокислый—3,27—10,20, трис (гидроксиметил) аминометан-солянокислый—7,2—9,2.

Опыты проводились в двух сериях: в первой—в 50 мл стаканах к 5 г почвы прибавлялось по 10 мл буферного раствора с определенным значением pH, с помощью pH-метра устанавливались их сдвиги; во второй—при тех же значениях pH определялась активность ферментов почв [5].

Каталитические свойства почв изучались с помощью расщепления перекиси водорода с учетом каталазы (КФ 1.11.1.6) и гидролиза сахарозы по активности β -фруктофуранозидазы (КФ 3.2.1.26) при pH почвы—без добавления буферных растворов.

Результаты и обсуждение. Каталитическое свойство почвы зависит от ее pH. Установлено, что в почвах со слабнокислой реакцией гидролитические процессы протекают интенсивнее, чем окислительно-восстановительные, в слабощелочной—наоборот (рис. 1). Интенсивный гидролиз

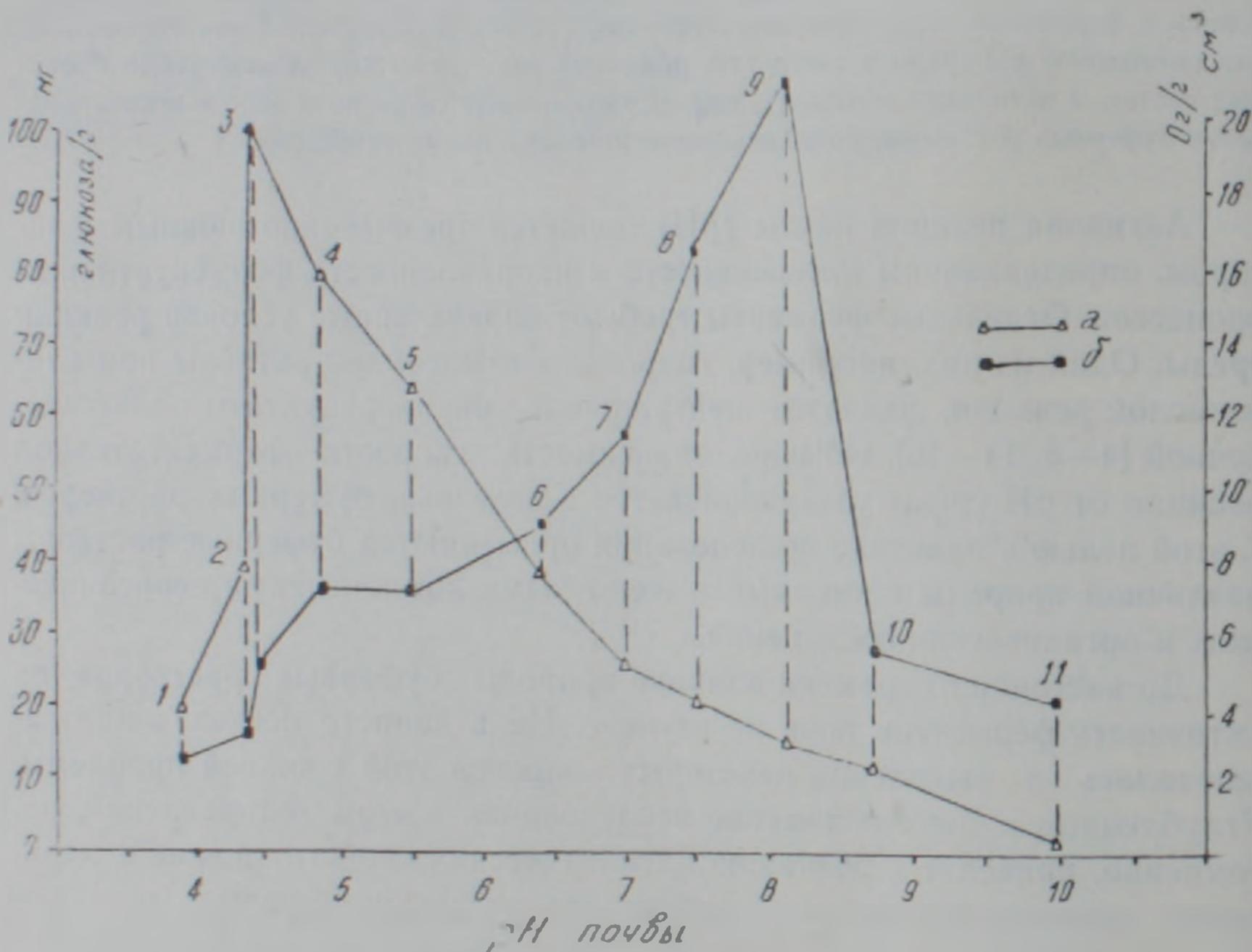


Рис. 1. Зависимость между каталитическим свойством почвы и ее pH. а) гидролиз сахарозы, б) расщепление перекиси водорода. Почвы: 1—краснозем, 2—дерново-подзолистая, 3—горно-луговая дерново-торфянистая, 4—горно-луговая дернозая, 5—лугово-черноземная, 6—чернозем выщелоченный, 7—лесная коричневая, 8—чернозем карбонатный, 9—каштановая карбонатная, 10—бурая полупустынная осолонцованная, 11—солонец-солончак хлоридно-сульфатно-содовый.

сахарозы происходит в горно-луговых почвах, имеющих слабнокислую реакцию среды (pH 4,0—5,5), соответствующую оптимуму pH β -фруктофуранозидазы. Разложение перекиси водорода интенсивно протекает в почвах со слабощелочной реакцией среды (pH 7,3—8,2). Этот интервал pH соответствует оптимуму действия каталазы почв. В красноземе и дерново-подзолистой почвах биокаталитическая активность подавлена.

В этих почвах в результате подзолистого процесса накапливается значительное количество соединений железа и алюминия, которые ингибируют действие ферментов. Активность биокатализаторов сильно подавлена в щелочных почвах (рН 9,5—10,5), здесь действие некоторых ферментов не обнаруживается.

Закономерное изменение гидролитических и окислительно-восстановительных свойств почвы в зависимости от рН обусловлено тем, что она является хорошо забуференной средой главным образом за счет неорганических и органических соединений с кислотными и щелочными свойствами. Установлено, что в зависимости от реакции почвы ферменты активны в том случае, когда оптимум рН их действия по своему значению близок к рН почвы. Каталитический эффект фермента зависит от степени ионизации функциональных групп, входящих в его белковую молекулу, определяющих реакционность активного центра. Он достигает максимума при оптимуме рН данного фермента [5—8]. Поэтому выяснение зависимости каталитических свойств от рН среды с помощью буферных растворов приобретает важное значение.

Опыты показали, что природа буферных растворов, т. е. их кислотные и щелочные компоненты имеют определенное значение при определении активности ферментов почв. Различные буферные растворы с одинаковым значением рН действуют на активность ферментов почв различно. Одни буферные растворы в отношении отдельных ферментов проявляют сильное ингибирующее действие, другие—слабое или вовсе не влияют на них. Например, уксусно-ацетатный буферный раствор рН 5,0 ингибирует фосфатазы почв (рис. 2) и почти не действует на активность β -фруктофуранозидазы. Цитратно-фосфатный и этаноламин-уксуснокислый буферные растворы также не ингибируют действие β -фруктофуранозидазы, но аллостерически влияют на активность фосфатазы.

Активность нуклеазы почв также зависит от природы буферных растворов, используемых для установления оптимума рН их действия (таблица). Приведенные данные показывают, что боратный буфер сильнее ингибирует действие нуклеазы почв, чем этаноламин-уксуснокислый. При определении активности нуклеазы с учетом отщепленной фосфорной кислоты исключается возможность применения фосфатного и цитратно-фосфатного буферных растворов. Нуклеазы, осуществляющие гидролитическое расщепление нуклеиновых кислот с освобождением фосфорной кислоты, имеют большой сдвиг оптимума рН 6,5—8,2. Поскольку буферные растворы ингибируют действие нуклеазы, то целесообразно определять их активность при рН почвы—без добавления буферных растворов.

Буферные растворы различно действуют также на активность каталазы (таблица). Они ингибируют или активируют каталазу в зависимости от химического состава почв, а также в связи со структурой молекулы фермента и механизмом его действия. Каталаза—двухкомпонентный фермент, простетической группой которого является феррипротопорфирин (протогемин). Железо в гематине, составляющее активный центр ко-

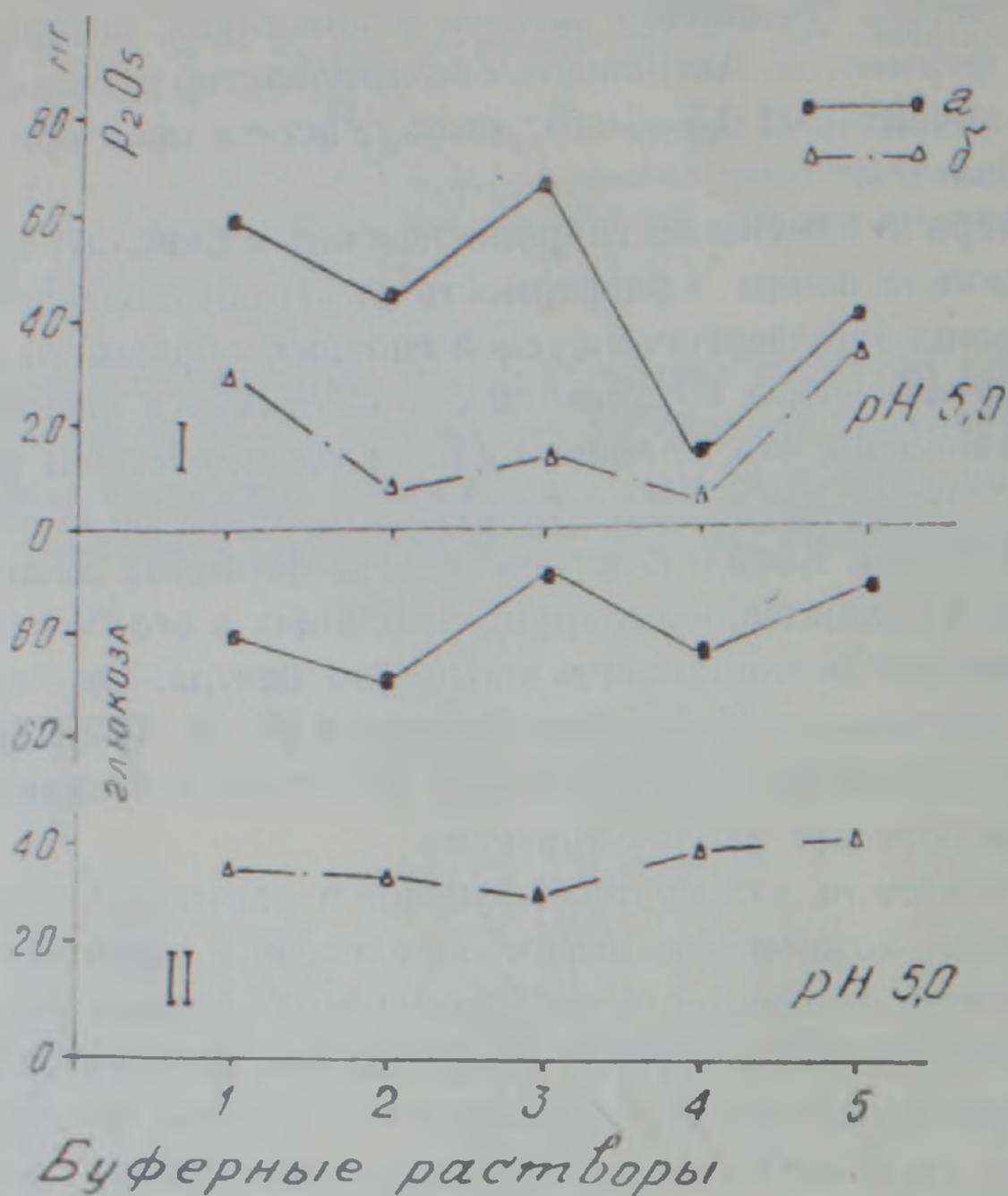


Рис. 2. Влияние природы буферных растворов на активность фосфатазы (I) и β-фруктофуранозидазы (II) горно-луговой дерновой почвы (а) выщелоченного чернозема (б). Буферные растворы: 1—без буфера, 2—фосфатный, 3—цитратно-фосфатный, 4—уксусно-ацетатный, 5—этанолламин-уксусноокислый.

Таблица
Влияние природы буферных растворов на активность ферментов почв

Буферные растворы	pH буфера	Чернозем выщелоченный, pH 6,4	Каштановая карбонатная, pH 8,0	Бурая культурно-поливная, pH 8,2
каталаза, см ³ O ₂				
Без буфера	—	8,7	11,4	11,8
Фосфатный	8,1	4,2	3,5	3,2
Цитратно-фосфатный	8,0	4,0	3,5	2,8
Боратный	8,0	4,1	3,1	3,5
Этанолламин-уксусноокислый	8,2	7,8	12,0	9,6
Трис	8,1	7,8	10,7	8,8
нуклеазы, мг P ₂ O ₅				
Без буфера	—	8,3	10,8	14,8
Боратный	8,0	2,0	5,3	9,0
Этанолламин-уксусноокислый	8,2	7,5	10,0	10,8
Трис	8,1	5,3	8,0	13,0

фермента, связано с гидроксильной группой и непосредственно участвует в активации субстрата [6, 8, 10]. При разложении перекиси водорода образуются промежуточные комплексы с атомом железа, которые восстанавливаются другой молекулой перекиси водорода. Отдельные компоненты буферных растворов, в частности кислотные остатки, имеют большое химическое сродство с атомом железа, конкурентно блокируют активный центр фермента и исключают возможность образования промежуточных перекисных соединений. В результате происходит торможение активности фермента. Причем буферные растворы с неорганическими компонентами сравнительно больше ингибируют действие каталазы почвы, чем с органическими.

Оптimum pH действия каталазы почвы установлен с помощью этаноламин-уксуснокислого буферного раствора (рис. 3). При применении

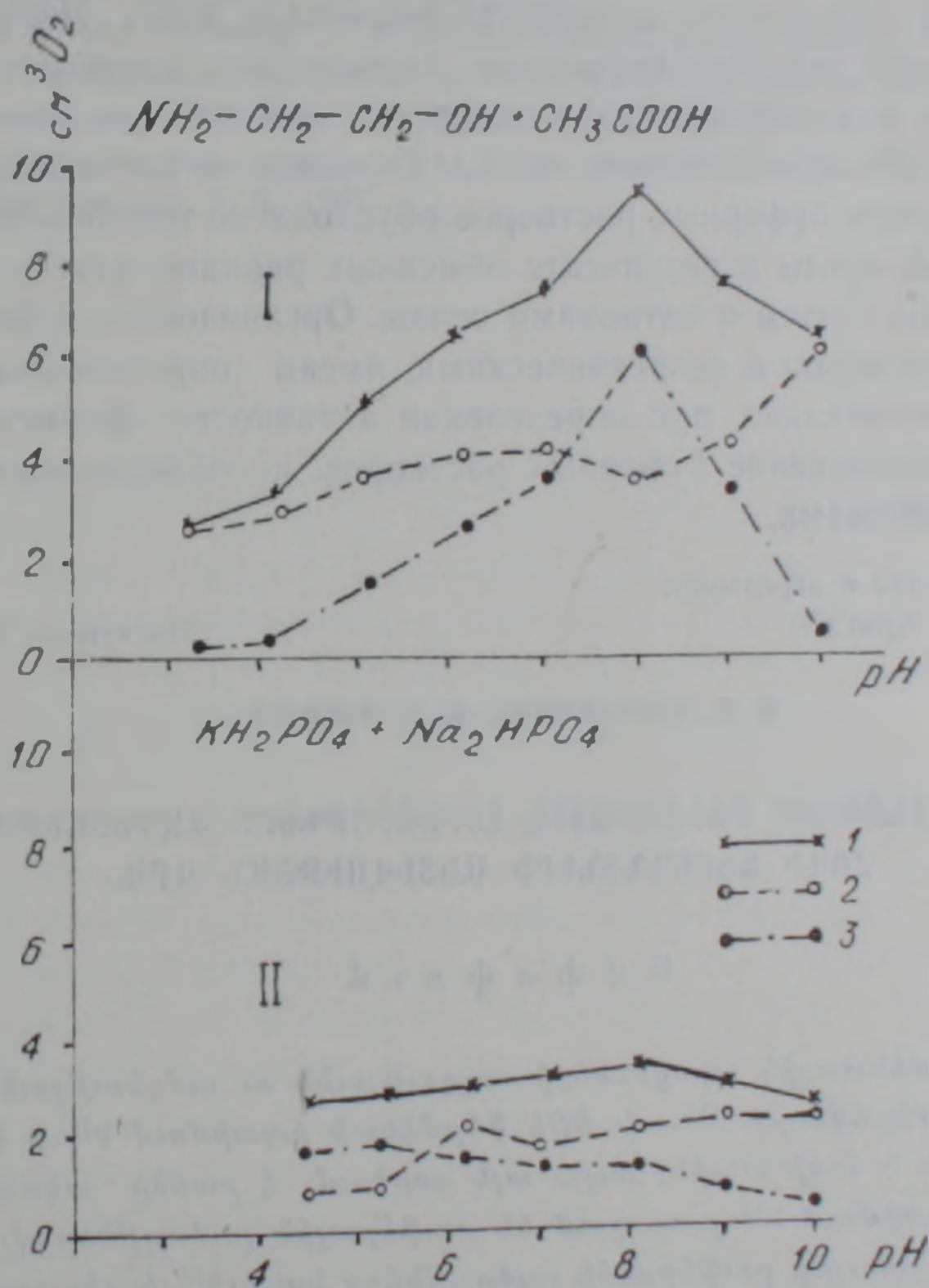


Рис. 3. Установление оптимума pH каталазы в бурой культурно-поливной почве. Буферные растворы: I—этанолламин-уксуснокислый, II—фосфатный. Разложение перекиси водорода: 1—воздушно-сухой почвой, 2—стерилизованной, 3—активность каталазы.

фосфатного буфера в результате сильного торможения активности каталазы и значительного смещения pH среды не получается четкого пика оптимума pH [1, 5]. Эти явления сравнительно меньше наблюдаются при

применении органических буферных растворов. Исследования показали, что фосфатный буферный раствор активирует каталазу в горно-луговых почвах. Очевидно, образующиеся труднорастворимые фосфаты алюминия и железа в почве предотвращают их ингибирующее действие или происходит аллостерический эффект, что требует дальнейших пояснений.

Таким образом, для установления соотношений между величиной рН почвы и естественным ходом ферментативных реакций необходимо определение активности ферментов производить при рН почвы — без добавления буферных растворов. В случае выявления потенциальной каталитической активности почв результаты исследования должны иметь общую основу, и стандартный раствор своим значением рН должен соответствовать оптимуму данного фермента. В результате проведенных исследований установлено, что природа буферных растворов имеет важное значение при определении активности ферментов почв. Ингибирование и активирование действия ферментов зависит от природы буферных растворов, их аллостерического воздействия на белковую молекулу фермента и от химического состава почвы. Торможение активности ферментов под влиянием буферных растворов обусловлено ингибированием или смещением рН среды в результате обменных реакций между компонентами буферных систем и катионами почвы. Органические буферные растворы, по сравнению с неорганическими, имеют определенные преимущества. Следовательно, при определении активности ферментов почв необходимо применение буферных растворов, не обладающих ингибирующими свойствами.

НИИ почвоведения и агрохимии
МСХ АрмССР

Поступило 6.XI 1974 г.

Ս. Ա. ԱՔՐԱՀԱՄՅԱՆ, Ա. Շ. ԳԱԼՏՅԱՆ

ՏԱՐՔԵՐ ԲՆՈՒՅԹԻ ԲՈՒՖԵՐԱՅԻՆ ԼՈՒԾՈՒՅԹՆԵՐԻ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ
ՀՈՂԻ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ա մ փ ա փ ու մ

Հողի ֆերմենտային պրոցեսների ուղղությունն ու ուժգնությունը պայմանավորված է միջավայրի pH-ով: Եթե ֆերմենտի օպտիմում pH-ը իր նշանակությամբ մոտ է հողի pH-ին, ապա այն գործում է բարձր ակտիվությամբ: Ֆերմենտի օպտիմում pH-ը որոշում են բուֆերային լուծույթներով: Պարզված է, որ տարբեր բնույթի բուֆերային լուծույթները նույն pH-ի դեպքում որոշակի ազդեցություն են թողնում ֆերմենտների ակտիվության վրա: Նրանք հաճախ ճնշում են ֆերմենտների գործունեությունը: Ուստի, հողի ֆերմենտների ակտիվությունը որոշելիս անհրաժեշտ է կիրառել այնպիսի բուֆերային լուծույթներ, որոնք զերծ են նման հատկություններից: Այս տեսակետից օրգանական բուֆերային լուծույթները անօրգանականի համեմատությամբ ունեն որոշակի առավելություն և կարելի է լայնորեն կիրառել հողային հետազոտություններում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Абрамян С. А., Галстян А. Ш. ДАН АрмССР, 58, 5, 1974.
2. Аринушкина Е. В. Руководство по химическому анализу почв. МГУ, 1961.
3. Браунштейн А. Е. Журн. Всесоюзн. хим. об-ва им. Менделеева, 13, 1, 1963.
4. Васильенко Е. С. Почвоведение, 11, 1962.
5. Галстян А. Ш. Ферментативная активность почв Армении. Ереван, 1974.
6. Диксон М. и Узбб Э. Ферменты. М., 1966.
7. Кретович В. Л. Введение в энзимологию. М., 1967.
8. Купревич В. Ф. и Щербакова Т. А. Почвенная энзимология. Минск, 1966.
9. Лурье Ю. Ю. Справочник по аналитической химии. М., 1971.
10. Самнер Дж. Б. и Сомерс Г. Ф. Химия ферментов и методы их исследования. М., 1948.
11. Хазиев Ф. Х. Почвенные ферменты. М., 1972.
12. Чундерова А. И. Агрохимия, 5, 1970.
13. Durand G. Rev. Ecol. Biol. Sol. 2 (2), 1965.
14. Hofmann E. and Hofmann G. Z. Pflanzenernähr., Düng. Bodenn., 70 (1), 1955.
15. Kiss S. Talanjenzimen. Addendum (Harmadik resz) in Talajtan (M. I. Scapo, Editor), Bucharest, 1958.
16. Skujins J. J. Enzymes in soil. In: A. D. McLaren and L. H. Peterson (Editors) Soil Biochemistry, 1, 5., 1967.