

6. Гамбарян Л. С., Саркисян Ж. С., Гарибян А. А. Коваль И. Н., Мадатова И. Р., Геворкян К. Н., Ходжаянц Н. Ю. Журн. высш. нервн. деят., 33, 2, 1247—1254, 1982.
7. Гарибян А. А., Гамбарян Л. С. Поведение и базальные ганглии. Ереван, 1982.
8. Карамян А. И. Эволюция конечного мозга позвоночных. Л., 1976.
9. Орбели Л. А. Избр. тр. I. Вопросы эволюционной физиологии. М.—Л., 1961.
10. Суворов Н. Ф. Стриопаллидарная система. 3—13, Л., 1973.
11. Черкес В. А. Передний мозг и элементы поведения. Киев, 1978.
12. Ten Cate J., Van Gerk A. Arch. neerl. Physiol., 18, 337, 1933.
13. Rosvold H. E. Acta neurobiol. exp. (Warszawa), 32, 2, 439—450, 1972.

«Биолог. жс. Армении», т. XXXVI, № 8, 1983

УДК 631.465

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ГУМУСОВЫХ ПРЕПАРАТОВ

С. А. АБРАМЯН, А. Ш. ГАЛСТЯН

Предложены методы определения активности некоторых ферментов—гидролаз и оксидоредуктаз гумусовых препаратов, выделенных из различных типов почв. Рекомендованы подходы при изучении биокаталитических свойств гумусовых препаратов почв.

Ключевые слова: гумусовые препараты, ферментативная активность.

В почве как биологическом объекте содержатся различные экзо- и эндоферменты, источником которых являются растения, микроорганизмы и почвенная фауна. Ферменты, выделяемые в почву, в результате иммобилизации почвенными частицами, в основном неорганическими, органическими и органо-минеральными коллоидами, долгое время сохраняют свою активность [1, 2, 5, 10, 11, 14]. Они осуществляют каталитические реакции — разложение и синтез органических веществ, миграцию химических соединений, мобилизацию питательных элементов и микробиологические процессы. Активность ферментов почв зависит от их биогенности, содержания органического вещества, механического состава, физико-химических свойств, а также от природных и антропогенных факторов [3, 8, 9, 12, 13].

Изучение ферментативной активности гуминовых и фульвокислот (ГК, ФК) имеет важное значение для познания сущности иммобилизации ферментов в почве. Как известно, присутствие свободных и иммобилизованных ферментов обнаруживается по течению катализируемых ими реакций. Относительное количество фермента пропорционально скорости реакции, поэтому в основе методики определения активности ферментов гумусовых препаратов лежит измерение ее скорости, по которой судят об изменении концентрации субстрата во времени. В основу определения активности ферментов гумусовых препаратов были поло-

жены разработанные нами для почв методы. Поскольку до настоящего времени ферментативная активность гумусовых препаратов не изучена, нами проведены некоторые методические работы по их подготовке к анализу. Выявлены соотношения навески препаратов и концентрации субстратов, а также оптимальные температура, рН и время выдерживания субстрата с гумусовыми препаратами.

Материал и методика. Исследования проводили на препаратах гуминовых кислот и фульвокислот, выделенных из разных типов почв: чернозем выщелоченный ($A_D 0-14$ см), тяжелосуглинистый, содержание гумуса 11,6%, рН водной суспензии 6,6, сумма обменных катионов 63,9 мэкв на 100 г почвы; горно-луговая дерновая ($A_D 0-11$ см), среднесуглинистая, содержание гумуса 15,7%, рН 5,0, сумма обменных катионов 23,0 мэкв, степень насыщенности основаниями 61,7%; каштановая карбонатная (A_0-16 см), среднесуглинистая, содержание гумуса 3,0%, рН 8,0, сумма обменных катионов 32,8 мэкв; оршаемая лугово-бурая ($A_{n0}-28$ см), тяжелосуглинистая, содержание гумуса 2,5%, рН 8,1, сумма обменных катионов 29,5 мэкв (Армянская ССР); дерново-подзолистая ($A_1 0-10$ см), суглинистая, содержание гумуса 3,8%, рН 5,2, сумма обменных катионов 11,2 мэкв на 100 г почвы, степень насыщенности 51,8% (Московская обл.); краснозем ($A_1 0-16$ см), глинистый, содержание гумуса 5,1%, рН 4,5, сумма обменных катионов 9,4 мэкв, степень насыщенности 27,7% (Груз.ССР, Чаква).

Гумусовые препараты из почв выделяли общепринятыми методами [4, 6]. После диализа и высушивания при 40—45° препараты гумусовых веществ, пропущенные через сито с диаметром отверстий 0,01 мм, сразу поступали на анализ.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных разработок предлагаются следующие методы определения активности ферментов гумусовых препаратов.

Каталаза ($H_2O_2: H_2O_2$ — оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.6) разлагает перекись водорода с образованием воды и молекулярного кислорода. Каталазная активность гумусовых препаратов определялась газометрическим методом, основанным на измерении скорости разложения перекиси водорода при ее взаимодействии с препаратами гуминовых кислот и фульвокислот, по объему выделившегося кислорода.

Ход анализа. Навески (50 мг) тонкоизмельченных гумусовых препаратов помещали в толстостенные колбы емкостью 50 мл, добавляли 5 мл оптимального для действия каталазы фосфатного буфера с рН 8,0 и тщательно перемешивали до пептизации гумусовых препаратов. Поскольку гумусовые кислоты трудно пептизируются при таком значении рН, препараты с буфером оставляли на сутки. Затем осторожно на дно колбы с помощью пинцета ставили маленький стаканчик или фарфоровый тигель с 0,5 мл 30%-ного раствора пергидроля. Раствор перекиси водорода в колбе должен быть 3%-ным, для этого концентрацию пергидроля периодически проверяли, исходя из этого в тигле брали столько пергидроля, чтобы с 5 мл буферного раствора получилась его 3%-ная концентрация. Начало опыта фиксировали по секундомеру в тот момент, когда сосудик с перекисью водорода опрокидывали и содержимое колбы встряхивали. Смесь взбалтывали в течение всего опыта, придерживая колбу за горлышко. Выделившийся кислород вытесняет из бюретки воду, уровень которой отмечали через 1 мин. Контролем служили стерилизованные (в автоклаве при 1 атм. в течение 1 ч или сухим жаром при 180° в течение 3 ч) препараты ГК и ФК. При стерилизации сухим

жаром препараты предварительно смачивали фосфатным буфером. Активность каталазы выражали в кубических сантиметрах O_2 за минуту на 1 г препарата (ГК и ФК). Ошибка определения до 5%.

Реактивы: 1) пергидроль; 2) фосфатный буфер рН 8,0. Установление концентрации пергидроля: на аналитических весах в мерной колбе емкостью 100 мл взвешивают 1,0 г H_2O_2 , объем доводят до метки и взбалтывают. К 20 мл полученного раствора, перелитого в 250 мл коническую колбу (3 повторности), добавляют 50 мл дистиллированной воды и 2 мл 20%-ной H_2SO_4 , затем титруют 0,1 н $KMnO_4$, 1 мл 0,1 н раствора $KMnO_4$ соответствует 0,0017008 г перекиси водорода.

Инвертаза (β — фруктофуранозидаза, сахараза, КФ 3.2.1.26) гидролитически расщепляет β —фруктофуранозидазную связь сахарозы с образованием редуцирующих сахаров—глюкозы и фруктозы. Опыты показали, что приемлемым методом определения активности инвертазы гумусовых препаратов является количественный учет восстанавливающих сахаров по Бертрону. Полярметрические и фотоколориметрические методы в этом случае почти не пригодны.

Ход анализа. Навески (50 мг) свежевыделенного тонкорастертого гумусового препарата помещали в колбы емкостью 50 мл, прибавляли 5 мл фосфатного буфера рН 8,0 и 0,2 мл толуола в качестве антисептика. Колбы с содержимым оставляли на сутки для пептизации препаратов, затем прибавляли 5 мл 6%-ного раствора сахарозы, приготовленного на фосфатном буфере рН 5,0 в случае с гумусовыми препаратами ненасыщенных оснований почв и рН 7,0 — насыщенных. Контролем служили препараты без субстрата, для учета их редуцирующих свойств, стерилизованные препараты (в автоклаве при 1 атм. 1 ч или сухим жаром при 180° в течение 3 ч после предварительного увлажнения) и субстраты без препаратов. Колбы закрывали корковыми пробками, осторожно встряхивали и помещали в термостат при 30° на 24 часа. В течение взаимодействия субстрата с гумусовыми препаратами колбы периодически встряхивали. По истечении соответствующего времени прибавляли 20 мл дистиллированной воды и фильтровали. В фильтрате редуцирующие сахара определяли по Бертрону. Для этого 10 мл фильтрата переносили в колбу емкостью 100 мл и приливали 20 мл раствора Фелинга. Содержимое колбы кипятили 3 мин. Затем раствор фильтровали в колбу Бунзена через стеклянный фильтр № 2 с асбестом, используя водоструйный насос или насос Камовского. Осадок закиси меди в колбе и на фильтре промывали горячей водой несколько раз.

Затем его в колбе и на фильтре растворяли серноокислым железом, подкисленным серной кислотой, и пропускали через фильтр в чистую колбу Бунзена. Стакан и фильтр промывали дистиллированной водой несколько раз. Фильтрат непосредственно в колбе Бунзена титровали 0,1 н перманганатом калия до слабо-розовой окраски. Для расчета глюкозы количество израсходованного перманганата умножали на 6,36 (1 мл 0,1 н $KMnO_4$ эквивалентен 6,36 мг меди) и находили соответствующее количество глюкозы по таблице [7]. После внесения поправки на контроль рассчитывали активность инвертазы в мг глюкозы на 1 г гумусового препарата за 24 часа. Ошибка определения до 9%.

Реактивы: 1) 6%-ный раствор сахарозы; 2) фосфатный буфер (рН 5,0; 7,0; 8,0); 3) толуол; 4) раствор Фелинга: 40 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ растворяют в дистиллированной воде и доводят до 1 л, 200 г сегнетовой соли ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) растворяют в дистиллированной воде, прибавляют 150 г КОН или NaOH и доводят до 1 л. Оба раствора фильтруют. Перед употреблением указанные растворы смешивают в соотношении 1:1; 5) раствор сернокислого железа: 50 г соли растворяют в дистиллированной воде, приливают 108,7 мл концентрированной H_2SO_4 и доводят объем до 1 л; 6) 0,1 н титрованный раствор KMnO_4 (фиксанал).

Уреаза (карбамид-амидогидролаза, КФ 3.5.1.5) гидролизует карбамид (мочевину) до аммиака и углекислого газа. В почве карбамид образуется в процессе превращения азотистых органических соединений — белков и нуклеиновых кислот. В значительном количестве он вносится с навозом и в форме концентрированного азотного удобрения. Опыты показали, что наиболее подходящим и объективным методом количественного определения аммиака как продукта уреазной реакции является его отгонка микрометодом Кьельдаля.

Ход анализа. Навески (50 мг) свежевыделенного тонкорастертого гумусового препарата помещали в колбы емкостью 50 мл, прибавляли 5 мл фосфатного буфера рН 8,0 и 0,2 мл толуола в качестве антисептика. Колбы с содержимым оставляли на сутки для пептизации препаратов, затем прибавляли 5 мл 6%-ного раствора мочевины, приготовленного на фосфатном буфере рН 6,7. Контролем служили гумусовый препарат без субстрата, стерилизованный (в автоклаве при 1 атм. в течение 1 ч или сухим жаром при 180° в течение 3 ч) препарат и субстрат без препарата. Колбы закрывали корковыми пробками, осторожно встряхивали и помещали в термостат при 30° на 24 часа. В течение взаимодействия субстрата с гумусовыми препаратами колбы периодически встряхивали. По истечении времени взаимодействия субстрата с препаратами в колбы добавляли 20 мл 1,0 н раствора хлористого калия, 5 мин встряхивали для вытеснения поглощенного аммиака и фильтровали. Из фильтрата 10 мл переносили в прибор Кьельдаля для полумикроотгонки аммиака, прибавляли 5 мл 2%-ного раствора щелочи и в течение 15 мин с момента кипения производили перегонку. В приемные колбы заранее брали 15 мл 0,1 н раствора H_2SO_4 . Количество аммиака учитывали обратным титрованием 0,1 н раствором КОН. Расчет аммиака производили по следующей формуле:

$$X = \frac{(AT_1 - BT_2) \cdot 1,7 \cdot V}{H \cdot V_1},$$

где А — количество 0,1 н раствора H_2SO_4 в приемнике, мл; В — количество 0,1 н раствора КОН, израсходованного на титрование остатка кислоты в приемнике, мл; T_1 — поправка к титру 0,1 н H_2SO_4 ; T_2 — поправка к титру 0,1 н КОН; 1,70 — количество аммиака, эквивалентное 1 мл 0,1 н H_2SO_4 , мл; V — общий объем фильтрата, мл; V_1 — объем фильтрата, взятого на анализ, мл; H — навеска почвы, г. Активность уреазы выражали в миллиграммах NH_3 на 1 г препарата за 24 часа. Ошибка определения до 8%.

Реактивы: 1) 6%-ный раствор мочевины, 2) фосфатный буфер (рН

6.7. 8,0), 3) 1,0 н раствор КСl, 4) 0,1 н раствор КОН, 5) 0,1 н раствор H_2SO_4 6) 2%-ный раствор КОН.

Фосфатазы (фосфогидролазы моноэфиров ортофосфорной кислоты. Щелочная фосфатаза КФ 3.1.3.1., кислая фосфатаза 3.1.3.2.). Фосфатаза гидролизует моноэфир ортофосфорной кислоты с образованием спирта и ортофосфата. Метод определения ее активности в гумусовых препаратах основан на количественном учете отщепленного при ферментативной реакции неорганического фосфора.

Ход анализа. Навески (50 мг) свежвыделенного тонкорастертого гумусового препарата помещали в колбы емкостью 50 мл, прибавляли 2 мл этаноламин-ацетатного буфера рН 8,0; 0,2 мл толуола в качестве антисептика и оставляли на сутки для пептизации. Затем прибавляли 1 мл 0,1 М раствора глицерофосфата натрия, приготовленного на этаноламин-ацетатном буфере рН 5,4 при определении кислой фосфатазы и рН 8,0 — щелочной. рН среды проверяли индикаторной бумагой и при сдвигах доводили до требуемого значения. Контролями служили препараты с буфером и субстрат без препарата. Стерилизованные препараты не используются в качестве контроля, так как в процессе стерилизации происходит расщепление фосфорорганических соединений и получаются завышенные данные. Колбы закрывали корковыми пробками, осторожно встряхивали и ставили в термостат при 30° на 1 час. В течение времени взаимодействия субстрата с препаратами колбы периодически встряхивали. После инкубации в колбы добавляли 50 мл буферной смеси Труога, встряхивали на ротаторе 30 мин для экстрагирования фосфорной кислоты и содержимое фильтровали. В фильтрате фосфор определяли по Труогу-Мейеру. Для этого 10 мл фильтрата переносили в 50 мл колбы, прибавляли 2 мл комплексообразователя — серникомого молибдата аммония. Следует отметить, что растворы гумусовых кислот бывают окрашенными, что мешает колориметрическому определению фосфора. Однако после прибавления серникомого молибдата аммония гуминовые кислоты выпадают в осадок. Полученный раствор с осадком ГК фильтровали в 50-миллилитровые мерные колбы, доводили до метки дистиллированной водой, перемешивали, затем приливали 3 капли восстановителя — 2,5%-ного раствора $SnCl_2$, немедленно перемешивали и в течение 15—20 мин фотоколориметрировали, используя 5 мм кюветы и светофильтр с пропусканием лучей длиной волны 650 нм. Количественный учет фосфорной кислоты, отщепленной от глицерофосфата под действием фосфатазы, производили с помощью калибровочного графика KH_2PO_4 . Активность фосфатазы выражали в мг Р на 10 г препарата за 1 час. Ошибка определения до 8%.

Реактивы: 1) 0,1 М раствор глицерофосфата Na, 2) этаноламин-ацетатный буфер—рН 5, 4, 8,0; 3) буферная смесь Труога—3 г $(NH_4)_2SO_4$ + 20 мл 0,1 н H_2SO_4 — растворяют в 1 л дистиллированной воды; 4) комплексообразователь — 25 мг молибденовокислого аммония растворяют в 200 мл дистиллированной воды при нагревании. Одновременно в мерную колбу емкостью 1 л приливают 500 мл воды и осторожно по стенкам колбы вливают небольшими порциями 280 мл H_2SO_4 (уд. в. 1,84). После остывания обоих растворов в серную кислоту небольшими порциями

при постоянном помешивании приливают раствор молибденовокислого аммония, после вторичного остывания общий объем доводят до 1 л, перемешивают и переливают в склянку из темного стекла; 5) восстановитель — 0,25 г $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ всыпают в стеклянную пробирку емкостью 10—15 мл, приливают 10 мл 10%-ной HCl , погружают пробирку в химический стакан емкостью 100—200 мл, наполненный водой, и кипятят на электроплитке до полного растворения восстановителя; 6) стандартный раствор для кривой — 0,4392 г KH_2PO_4 в 1 л воды. Рабочий раствор — 5 мл стандартного раствора в 500 мл H_2O , 1 мл рабочего раствора содержит 0,001 мг Р.

Дегидрогеназы (субстрат: НАД(Ф)-оксидоредуктазы, КФ 1.1.1). Дегидрогеназы катализируют окислительно-восстановительные реакции путем дегидрирования органических веществ. В почве субстратами дегидрирования могут быть неспецифические органические соединения (углеводы, органические кислоты, аминокислоты, спирты, жиры, фенолы и т. д.) и специфические (гумусовые вещества). Дегидрогеназы в окислительно-восстановительных реакциях функционируют как переносчики водорода и разделяются на две группы: аэробные, которые мобилизованный водород передают кислороду воздуха; анаэробные, которые передают водород другим акцепторам, ферментам.

Ход анализа. Навески (50 мг) свежевыделенного тонкорастертого гумусового препарата помещали в 50 миллилитровые стаканы, прибавляли сначала 3 мл фосфатного буфера рН 7,0, затем прибавляли 1 мл 0,1 М раствора субстрата дегидрирования (глюкоза) и 1 мл 1%-ного раствора 2, 3, 5 — трифенилтетразолия хлористого (ТТХ). Определение проводили в анаэробных условиях, для чего стаканы после осторожного встряхивания помещали в вакуумный эксикатор, воздух эвакуировали при разряжении 10—12 мм рт. ст. в течение 10 мин. Эксикатор ставили в термостат при 30° на 24 часа. При выдерживании гумусовых препаратов с субстратами толуол в качестве антисептика не прибавляли, так как он сильно ингибирует действие дегидрогеназ. Контролем служили гумусовый препарат без ТТХ, стерилизованный препарат (в автоклаве при 1 атм. в течение 1 ч или сухим жаром при 180° в течение 3 ч после предварительного увлажнения), а также субстрат без препарата. В течение инкубации эксикатор периодически встряхивали. После выдерживания гумусовых препаратов с субстратом в стаканы приливали 20 мл этилового спирта и с помощью стеклянной палочки содержимое перемешивали 5 мин. Полученный окрашенный раствор ТФФ фильтровали и колориметрировали, используя 5-миллиметровые кюветы и светофильтр с пропусканием лучей длиной волны 500—600 нм. Количество формазана в миллиграммах рассчитывали по стандартной кривой (0,1 мг в 1 мл). Активность дегидрогеназ выражали в миллиграммах ТФФ на 10 г гумусового препарата за 24 ч. Ошибка определения до 8%. Реактивы: 1) 1%-ный раствор ТТХ, 2) 0,1 М раствор глюкозы, 3) фосфатный буфер, рН 7,0, 4) 96%-ный этиловый спирт.

Таким образом выявлено, что гумусовые препараты — гуминовые кислоты и фульвокислоты обладают ферментативной активностью. Они являются основными носителями внеклеточных ферментов в почве. Раз-

работаны методы определения активности некоторых ферментов гумусовых препаратов почв.

Институт почвоведения и агрохимии МСХ Армянской ССР Поступило 2.II 1983 г.

ՀՈՒՄՈՒՍԱՅԻՆ ՊԱՏՐԱՍՏՈՒԿՆԵՐԻ ՖԵՐՄԵՆՏԱՅԻՆ
ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ

Ս. Ա. ԱԲՐԱՀՍՄՅԱՆ, Ա. Շ. ԳԱԼՏՅԱՆ

Մշակվել են հումինաթթուների և ֆուլվոթթուների պատրաստուկների ֆերմենտային ակտիվության որոշման մեթոդներ: Աշխատանքները տարվել են տարբեր տիպի հողերից անջատված հումուսային պատրաստուկների վրա: Պարզվել է, որ հումինաթթուների և ֆուլվոթթուների պատրաստուկները օժտված են հիդրոլազների ու օքսիդառեդուկտազների ակտիվությամբ: Առաջարկված է հումուսային պատրաստուկների մեջ ինվերտազայի, կատալազայի, ֆոսֆատազայի, ուրեազայի և դեհիդրոգենազների ակտիվության որոշման ընթացք:

DETERMINATION OF ENZYMATIC ACTIVITY OF HUMIC
PREPARATIONS

S. A. ABRAHAMIAN, A. Sh. GALSTIAN

Methods of determination of the activity of hydrolases and oxidoreductases of humic preparations have been worked out. Different approaches to the study of the properties of humic preparations have been suggested.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Абрамян С. А., Галстян А. Ш. Докл. АН АрмССР, 73, 5, 1981.
2. Абрамян С. А., Галстян А. Ш. Докл. ВАСХНИЛ, 5, 1982.
3. Галстян А. Ш. Ферментативная активность почв Армении. Ереван, 1974.
4. Кононова М. М. Органическое вещество почвы. М., 1963.
5. Купревич В. Ф., Щербакова Т. А. Почвенная энзимология, Минск, 1966.
6. Орлов Д. С., Гришина Л. А. Практикум по химии гумуса. М., 1981.
7. Петербургский А. В. Практикум по агрохимии М., 1954.
8. Хазиев Ф. Х. Ферментативная активность почв. М., 1976.
9. Хазиев Ф. Х. Системно-экологический анализ ферментативной активности почв. М., 1982.
10. Щербакова Т. А., Максимова В. Б., Галушко М. А. Докл. АН БССР, 14, 7, 1970.
11. Щербакова Т. А. Почвоведение, 5, 1980.
12. Burns R. G., El-sayed M. H., McLaren A. D. Soil. Biol. Biochem., 4, 1972.
13. Kiss I. Talajenzimek. Addendum in Dr. Csapo M. Jozsef: Talajtan. Bukarest, 1956.
14. Skujins I. I. Enzymes in soil. Soil Biochemistry, N. Y., 1967.