

УДК 541.127:631.465

КИНЕТИКА ВЫДЕЛЕНИЯ КИСЛОРОДА ПРИ КАТАЛАЗНОЙ РЕАКЦИИ В ГОРНО-ЛУГОВОЙ ПОЧВЕ

М. Г. ГЕВОРКЯН, С. И. ЯВРЯН, А. Ш. ГАЛСТЯН, Н. М. БЕНДЕРЯН

Изучалась кинетика каталазной реакции в горно-луговой почве по образованию продукта реакции. Показано, что в почве помимо каталитического имеет место некаталитический расход H_2O_2 .

Ключевые слова: почва горно-луговая, каталаза.

Ранее нами была изучена кинетика ферментативного разложения H_2O_2 горно-луговой почвой определением разности скоростей расхода непрореагировавшего пероксида с воздушно-сухой и стерилизованной почвами (при отношении жидкой фазы к почве 80 мл на 1 г) [4]. Показано, что скорость ферментативного распада H_2O_2 при $[S] \leq 0,12$ М в интервале температур 20–35° удовлетворяет уравнению Михаэлиса-Ментен. С увеличением температуры растут значения V_{max} , а K_m — уменьшаются. Определены эффективные значения энергии активации процессов образования фермент-субстратного комплекса и продуктов реакции. Установлено, что процесс взаимодействия H_2O_2 с почвой лимитируется стадией образования комплекса Михаэлиса. При повышении температуры и концентрации субстрата помимо принятого в литературе каталитического (ферментативного и ионами перемениной валентности) [2, 7] имеется также некаталитический путь расхода H_2O_2 на окисление органического вещества почвы, сопровождающееся образованием и разрушением гидропероксидов [5]. Поскольку образование пероксидов возможно при поглощении системой O_2 , было интересно изучить кинетику взаимодействия H_2O_2 с почвой также газометрически.

Материал и методика. Исследования велись на подготовленной обычными способами воздушно-сухой почве [2]. Чтобы исключить влияние степени дисперсности почвы, ее фракционировали с помощью избори сит и работали с фракцией с диаметром частиц 0,25 мм. Стерилизацию почвы проводили принятыми в почвенной энзимологии способами [2, 3, 6] — нагреванием ее в течение трех часов при 180°.

Для измерения скорости выделения O_2 в изучаемом процессе был использован аппарат Варбурга, обеспечивающий постоянство температуры и равномерность перемешивания реагирующей гетерогенной системы. Так как аппарат позволяет измерять небольшие объемы газа, количества почвы и пероксида водорода были уменьшены в 10 раз по сравнению с их количеством в предыдущих опытах, приведенных в литературе [2, 3] и выполненных с помощью прибора Галстяна. В коническую часть реактора Варбурга помещали навеску почвы (0,1 г), а в отстойник — 0,5 мл H_2O_2 различной концентрации. Объем жидкой фазы сохраняли постоянным, равным 0,5 мл. Реактор с реагентами помещали в термостат, температура которого поддерживалась с точностью $\pm 0,05^\circ$. Через определенные промежутки времени после перемешивания реагентов в закрытой системе с помощью манометра фиксировался объем выделявшегося кислорода. Каталазная активность почвы определялась в различные моменты времени разностью объемов выделившегося кислорода в присутствии нестерильной и стерильной почв.

По полученным данным рассчитывали количество выделившегося кислорода (н М) в зависимости от различных факторов.

Результаты и обсуждение. Экспериментально установлено, что перемешивание реакционной смеси увеличивает скорость выделения O_2 в присутствии нестерильной почвы. Это свидетельствует о том, что ферменты в исследуемой суспензии находятся не в водной фазе, а, по-видимому, иммобилизованы частицами почвы. В дальнейшем опыты проводились при перемешивании.

На рис. 1 представлены кинетические кривые образования O_2 в изучаемом процессе при различных концентрациях субстрата и температуре $14,7^\circ$. Аналогичные зависимости получены при 20° , $25,1^\circ$ и 30° .

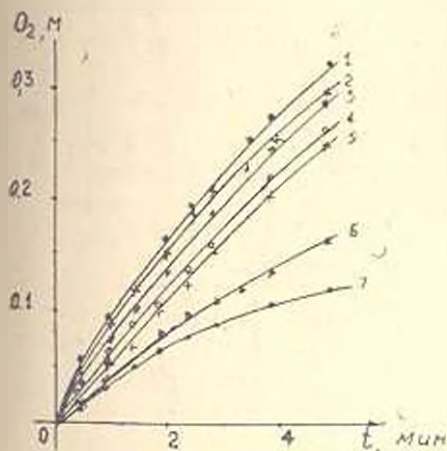


Рис. 1. Кинетические кривые выделения O_2 при ферментативном разложении H_2O_2 почвой, при различных концентрациях $[\text{H}_2\text{O}_2]$ М:

1) 2,82	2) 2,12
3) 1,41	4) 0,71
5) 0,53	6) 0,53
7) 0,176	($t = 14,7^\circ$)

К начальным участкам кинетических кривых проводили касательные и по тангенсу угла их наклона определяли начальные скорости ферментативной реакции при различных концентрациях субстрата.

Зависимость начальной скорости процесса от концентрации H_2O_2 при различных температурах удовлетворяет уравнению Михаэлиса-Ментен, т. е. в области малых концентраций субстрата наблюдается линейный рост скорости реакции от $[\text{H}_2\text{O}_2]$, а в области больших концентраций его скорость реакции не зависима от нее.

Преобразованием этой зависимости в двойных обратных координатах графически определены истинные уравнения Михаэлиса-Ментен (табл. 1).

Оказалось, что значения V_{max} в условиях эксперимента не зависят от температуры и равно $0,17$ моль/л. мин. Значения K_m (табл. 2) с повышением температуры уменьшаются.

Полученные при различных температурах значения K_m удовлетворяют уравнению Аррениуса (рис. 2, кр. 1), что позволило рассчитать эффективное значение энергии активации процесса распада фермент-субстратного комплекса, равное $13,9$ кДж/моль.

Методом трансформации кинетических кривых, полученных при различных температурах ($[\text{H}_2\text{O}_2] = 0,71$ М), оценено эффективное значение энергии активации процесса выделения O_2 при ферментативном распаде H_2O_2 (рис. 2, кр. 2 и табл. 3), равное 20 кДж/моль.

Таблица 1

Кинетические данные ферментативного распада H_2O_2
при различных температурах и концентрациях H_2O

$1/S, \text{M}^{-1}$	14.7		20		25.1		30	
	моль $V_0 \cdot 10^2$ Δ мин	$1/V_0 \cdot 10^{-2}$	моль $V_0 \cdot 10^2$ Δ мин	$1/V_0 \cdot 10^{-2}$	моль $V_0 \cdot 10^2$ Δ мин	$1/V_0 \cdot 10^{-2}$	моль $V_0 \cdot 10^2$ Δ мин	$1/V_0 \cdot 10^{-2}$
5.68	3.5	0.28	4	0.25	5	0.2	5.5	0.18
2.86	5	0.20	6	0.17	6.5	0.15	7.5	0.13
1.89	7.5	0.13	8	0.12	8.5	0.12	9.5	0.10
1.41	8.5	0.12	9.5	0.105	9.5	0.11	11	0.09
0.95	—	—	12	0.08	—	—	12	0.08
0.71	9.5	0.11	—	—	11	0.09	—	—
0.64	—	—	12.5	0.08	—	—	13	0.08
0.48	—	—	12.5	0.08	—	—	—	—
0.47	10.3	0.10	—	—	12.5	0.08	—	—
0.35	10.6	0.09	—	—	13	0.07	—	—

Таблица 2

Значения K_m при различных температурах

t°	14.7	20	25.1	30
K_m, M	0.72	0.56	0.40	0.32

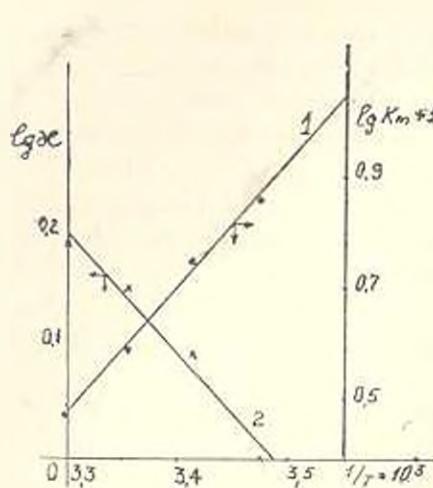


Рис. 2.

Рис. 2 Зависимость константы Михаэлиса (кр. 1) и трансформационного коэффициента кинетических кривых ферментативной реакции (кр. 2) от температуры в арениусовых координатах.

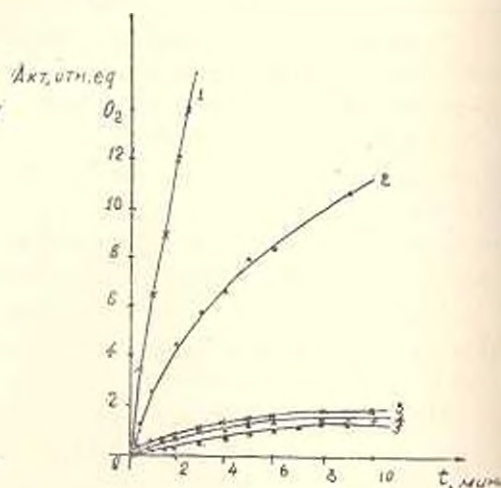


Рис. 3.

Рис. 3. Кинетические кривые выделения O_2 при $t = 20^\circ$, каталазной реакции $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.6824 \text{ M}$ в горно-луговой почве: 2) 10—28 см, 3) 28—50 см, 4) 50—76 см, 5) 76—98 см, 1) 0—10 см $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.531 \text{ M}$.

Изучались также кинетика каталазной реакции горно-луговой дерновой почвы в зависимости от глубины разреза. Как видно из рис. 3, каталазная активность почвы (в относительных единицах) при постоян-

Определение энергии активации выделения O_2 при ферментативном разложении H_2O_2 почвой ($[H_2O_2] = 0.71 \text{ М}$)

$1/T \cdot 10^3$	t, мин	$x = \frac{1 \text{ см}}{l}$	$1/T \cdot 10^3$	t, мин	$x = \frac{1 \text{ см}}{l}$
3,476	1 см 3,1	1	3,354	2,2	1,41
3,413	2,5	1,24	3,300	2,0	1,55

ной концентрации субстрата с увеличением глубины разреза резко уменьшается, причем в слоях 28—50; 50—76 и 76—98 см она ничтожна. Для сравнения на рис. 3 приведена также кинетическая кривая для верхнего слоя при $[H_2O_2] = 0.53 \text{ М}$.

Из сопоставления данных о кинетике каталазной реакции верхнего слоя почвы, определенной по скорости выделения продукта реакции и скорости расхода субстрата [5], видно, что максимальная скорость процесса примерно в 300 раз превосходит аналогичную величину второго. Следует отметить, что область применения уравнения Михаэлиса-Ментен при газометрическом методе определения скорости значительно шире (вплоть до $[H_2O_2] = 2.86 \text{ М}$), чем при ее определении по расходу H_2O_2 (до $[H_2O_2] \leq 0.12 \text{ М}$). Эффективные значения энергии активации процессов образования фермент-субстратного комплекса, а также распада его на продукты реакции при перманганатометрическом определении скорости оказываются выше, чем при газометрическом. Данные подтверждают сделанное ранее предположение о том, что при взаимодействии с почвой H_2O_2 разлагается не только каталитически, но и некаталитически, что сопровождается образованием титруемых гидропероксидов, т. е. в изучаемом процессе, помимо выделения O_2 , должно происходить также его поглощение. Полученные в данной работе кинетические кривые выделения O_2 плавные, что свидетельствует о том, что скорость выделения газа превышает скорость его поглощения.

Ереванский государственный университет,
кафедра физической и коллоидной химии

Поступило 21.XII 1983 г.

ԹԹՎԱՐՆԻ ԱՆՋԱՏՈՒՄԱՆ ԿԻՆԵՏԻԿԱՆ ԼԵՌՆԱ-ՄԱՐԳԱԳԵՏՆԱՅԻՆ ՀՈՂԻ ԿԱՏԱԼԱԶԱՅԻՆ ՌԵԱԿՏԻԱՅԻՆՈՒՄ

Մ. Գ. ԿԵԼՈՐՅԱՆ, Ս. Շ. ՅԱՎԻՅԱՆ, Ա. Շ. ԴԱԼՍՅԱՆ, Ն. Մ. ՔԵՅԼԵՅԱՆ

Ուսումնասիրված է լեռնա-մարգագետնային հողի կատալազային ռեակցիայի արգասիքի առաջացման կինետիկան և ստացված տվյալները համեմատված են այդ նույն ռեակցիայի սուբստրատի ծախսով որոշված արագության տվյալների հետ:

Ստացված արդյունքները հաստատում են նախկինում արված ենթադրություններն այն մասին, որ H_2O_2 -ը ծախսվում է նաև ոչ կատալիտիկ մեխանիզմով:

KINETICS OF OXYGEN SEPARATION DURING CATALASE REACTION OF MOUNTAIN-MEADOW SOIL

M. G. GEVORKIAN, S. SH. YAVRIAN, A. SH. GALSTIAN, N. M. BEJLERIAN

Kinetics of oxygen formation — one of the products of the catalase reactions occurring in soils, has been studied. The results have been compared with the kinetics data received for the same reaction, using substratums' expenditure. The data confirm the earlier expressed hypothesis on the presence of both catalytic and non-catalytic ways of the oxygen peroxide decomposition.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Алиев С. А., Гаджисов Д. А., Микайлов Ф. Д. Почвоведение 9, 107, 1981.
2. Галстян А. Ш. Ферментативная активность почв Армении. Ереван, 1974.
3. Галстян А. Ш. Определение активности ферментов почв. Ереван, 1978.
4. Геворкян М. Г., Галстян А. Ш., Петросян А. А., Бейлерян Н. М. Биолог. ж. Армении, 36, 4, 291, 1983.
5. Геворкян М. Г., Галстян А. Ш., Бейлерян Н. М. Уч. зап. ЕГУ, естеств. науки, 3, 80, 1983.
6. Хазисов Ф. Х. Ферментативная активность почв. М., 1976.
7. Эмануэль Н. М., Кнорре Д. Г. Курс химической кинетики. М., 1974.

«Биолог. ж. Армения», т. XXXVII, А. 5, 1984

УДК 579.253.4:579.842.11

ДЕЙСТВИЕ РИФАМПИЦИНУСТОЙЧИВЫХ МУТАЦИЙ НА ЭКСПРЕССИЮ *lon*-МУТАЦИЙ *ESCHERICHIA COLI* K-12

Г. Г. ОГАНЕСЯН, А. А. БАРСЕГЯН, М. Г. ОГАНЕСЯН

У изогенных, устойчивых к рифампицину *lon*⁺-штаммов, отличающихся аллельным состоянием генов *tenA*, контролирующего биосинтез β -субъединицы РНК-полимеразы, обнаружены различия в чувствительности к УФ-лучам, скорости роста и процессе клеточного деления. Установлена четкая корреляция между скоростью роста и чувствительностью культур к УФ-облучению. Существующая корреляция, связанная с изменением одного и того же компонента клетки, в данном случае РНК-полимеразы, указывает на прямую зависимость УФ-чувствительности *lon*⁺ культур от скорости роста. Добавление рифампицина в пострепликативную среду роста вводило коррективы в УФ-чувствительность *lon*⁺-генов культур с обязательным соблюдением зависимости от скорости их роста.

Ключевые слова: деление клетки, мутации, РНК-полимеразы, рифампицин

Возникновение *lon*⁺ мутаций у *E. coli* K-12 сопровождается повышением чувствительности культуры к ультрафиолетовым лучам (УФ-лучам) и ингибиторам синтеза ДНК, сверхсинтезом экзополисахаридов и другими изменениями [5, 8, 10]. После временной остановки репликации ДНК УФ-облучением или воздействием ингибиторов ее синтеза