

УДК 631.461:631.445.25

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ СЕРОЙ ЛЕСНОЙ ПОЧВЫ ПРИ СТЕРИЛИЗАЦИИ И ВНЕСЕНИИ СВОБОДНЫХ ФЕРМЕНТОВ

В. Н. ВОИНОВА, Л. Ф. ТАРАРИНА, В. Т. ЕМЦЕВ

(Кафедра микробиологии)

Почвенные ферменты характеризуются повышенной устойчивостью к различным внешним воздействиям (к температуре, высушиванию, различным ингибиторам и т. д.), причем они более устойчивы к нагреванию, чем ферменты растений, животных, микроорганизмов и чистые препараты ферментов [3, 5, 7, 8, 10].

Оригинальные работы в этом направлении проводятся в лаборатории Д. Г. Звягинцева [6, 7 и др.]. Установлено, что самой высокой термоустойчивостью обладала почвенная каталаза. Ферментативная активность почв, прогретых до 160—180°, полностью определялась почвенным ферментом и не зависела от внесения препарата каталазы и клеток микроорганизмов. После прогревания в течение 3 ч при 100° внутриклеточные ферменты полностью инактивируются и сохраняются только внеклеточные ферменты, прочно адсорбированные почвенными частицами.

Открытым остается вопрос о влиянии стерилизации и внесенных свободных ферментов на активность почвы при различных режимах увлажнения. Этому вопросу и были посвящены наши исследования.

Материал и методика

Данная работа является продолжением предыдущего исследования [9]. Для модельного опыта использовали серую лесную среднеподзоленную почву северных Тульских засек (гор. А₁ и В₂), очищенный кварцевый песок, к которым добавляли чистые препараты ферментов каталазы и пероксидазы. Контролями для этих вариантов служили те же горизонты почв и кварцевый песок.

Чистые препараты ферментов (каталазы и пероксидазы) брали в количестве 2,5 мг на 100 г воздушно-сухого субстрата (почва горизонтов А₁ и В₂, кварцевый песок) и тщательно перемешивали. Приготовленные образцы помещали в химические стаканы и термостатировали в течение 6 ч при температуре 120°. Затем создавали условия стерильного переувлажнения [9] на протяжении 42 суток. По истечении этого времени излишек инкубационной воды сливали и образцы переводили на режим естественного высушивания при температуре 20—23° до воздушно-сухого состояния. Период высушивания продолжался около 3 мес. Изучались также аналогичные нетермостатированные образцы (контроль). Активность каталазы определяли газометрическим методом, активность пероксидазы — по А. Галстяну [4].

Результаты исследований

Как видно из табл. 1, при внесении каталазы ферментативная активность почвенных образцов возрастала примерно в два раза. При внесении такого же количества препарата фермента в кварцевый песок отмечена мгновенная неучтенная вспышка каталазной активности, свидетельствующая об отсутствии адсорбции фермента частичками песка.

Термическая обработка воздушно-сухих образцов привела к значительному снижению активности фермента в образцах с почвой и к полной его инактивации в кварцевом песке. Таким образом, свободный не адсорбированный фермент в песке оказался совершенно неустойчивым к термическому воздействию.

Неустойчивым к нагреванию был свободный фермент и в почвенных субстратах (горизонты А₁ и В₂). И если в образце почвы иллювиального горизонта в результате термообработки уничтожена в основном только внесенная каталаза и незначительно почвенная (5%), то в перегнойно-аккумулятивном горизонте как внесенная, так частично и почвенная (44%).

В литературе отмечается [3], что половина, или даже 2/3 общей каталазной активности почвы, обусловлена термоустойчивой каталазой. Кроме того, известно [2, 7 и др.], что адсорбированные ферменты почв более устойчивы к воздействию высоких температур, чем чистые препараты ферментов.

Видимо, в иллювиальном горизонте почвенная каталаза преимущественно представлена термоустойчивыми формами и лучше адсорбирована глинистыми частицами, которые предохраняют ее от разрушения. Некоторый вклад в сохранение каталазной активности горизонта В₂ внесло и неферментативное разложение Н₂О₂, вызванное окислами железа и марганца (так называемая псевдокаталаза).

Имеются сведения [7] о неодинаковой способности почв различных типов защищать почвенный фермент от разрушения.

Как показали наши исследования (табл. 1), способность почв сохранять (защищать) свой ферментативный каталазный аппарат проявляется не только среди различных генетических типов, но и среди генетических горизонтов одного типа почв (в частности, серой лесной).

В стерильный период в условиях анаэробно-биоза (заливка образцов стерильной водой) активность каталазы изменялась незначительно. Более высокая активность фермента наблюдалась в почве иллювиального го-

Динамика активности каталазы ($\text{см}^3\text{O}_2$ за 2 мин на 1 г субстрата) в компостах

Сроки, дни	Нестерильный опыт					Стерильный опыт				
	гор. А ₁		гор. В ₂		кварцевый песок + фермент	гор. А ₁		гор. В ₂		кварцевый песок + фермент
	почва + фермент	контроль	почва + фермент	контроль		почва + фермент	контроль	почва + фермент	контроль	
О _и	5,0	2,90	5,40	2,45	Вспышка активности	1,66	1,62	2,50	2,35	0
Анаэробноз (переувлажнение)						Стерильный период				
7	2,23	1,87	2,80	1,65	0	2,24	2,45	3,96	4,14	0
28	2,77	2,51	2,70	1,31	0	2,19	2,23	4,07	4,28	0
42	3,25	3,07	2,36	2,62	0	3,12	2,21	2,72	2,14	0
Аэробноз (высушивание)						Период расстерилизации				
56	3,77	3,89	1,93	1,81	0	4,09	1,63	2,86	1,94	0
77	3,48	3,15	1,91	2,06	0	2,03	1,56	0,89	1,04	0
98	3,02	3,10	1,96	2,12	0	1,54	1,45	0,72	0,86	0
126	2,45	1,70	1,35	1,15	0	1,28	1,40	0,53	0,70	0

Примечание. Здесь и в последующих таблицах О_и — исходный воздушно-сухой образец.

ризонта. В песке активность каталазы полностью отсутствовала (табл. 1 и рис. 1).

Анаэробноз в компостах контрольных образцов (нестерильных) повлек за собой резкое (в 2 раза) снижение каталазной активности в почвенных образцах и полную инактивацию фермента в песке. И если на неадсорбированный фермент (в кварцевом песке) анаэробноз действовал инактивирующе (на 100%), то на фермент, находящийся под прикрытием почвенных частиц, его действие было менее жестким. Так, в образцах горизонта А₁ анаэробноз действовал также угнетающе на свободную каталазу, разница в активности по сравнению с контролем составляла в среднем около 10%. В почве иллювиального горизонта вследствие анаэробноза фермент угнетался несколько в меньшей степени, разница с контролем — около 35%.

Расстерилизация и последующее высушивание образцов привели к снижению активности каталазы к концу компостирования и перестановке кривых активностей фермента. Более высокая активность фермента при

аэробнозе стала проявляться в горизонте А₁, а не в горизонте В₂, как при анаэробнозе. Подобное проявление ферментативной активности при аэробнозе отмечено в контроле и [9].

Видимо, при аэробнозе и высоком уровне Eh богатство почвы горизонта А₁ органическим веществом и микрофлорой сыграло решающую роль в развитии каталазной активности ферментов.

Полученные данные позволяют заключить, что почвенная каталаза в серой лесной почве более устойчива к термическому воздействию и полному анаэробнозу, чем внесенная извне.

В результате внесения свободного фермента пероксидазы ферментативная активность в горизонте А₁ увеличилась почти в 3 раза, при этом в почве горизонта В₂ она заметно не изменилась (табл. 2).

В песке адсорбция вообще отсутствовала, что и обусловило кристаллизацию свободного фермента.

Таким образом, если свободный фермент каталаза в воздушно-сухих образцах серой лесной почвы способствовал увеличению ферментативной активности примерно в равной степени как в перегнойно-аккумулятивном, так и в иллювиальном горизонтах, то свободный фермент пероксидазы действовал на активность почвы более дифференцированно. Адсорбция пероксидазы частичками горизонта В₂ осуществлялась более интенсивно и полно, чем в горизонте А₁. Вероятно, этим можно объяснить тот факт, что разница в активности фермента между указанными горизонтами в исходных воздушно-сухих образцах была больше (~в 6 раз), чем после внесения фермента (~в 2 раза).

Термическая обработка привела к повышению пероксидазной активности в почвен-

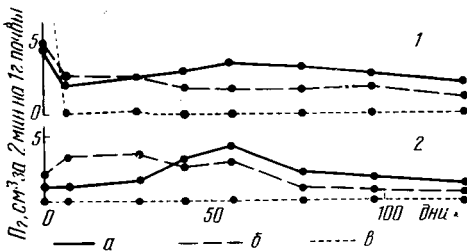


Рис. 1. Активность каталазы в стерильных (2) и нестерильных (1) условиях. а — горизонт А; б — горизонт В₂; в — песок.

Динамика активности пероксидазы (мг пурпургаина на 1 г с. субстрата) в компостах

Сроки, дни	Нестерильный опыт					Стерильный опыт				
	гор. А ₁		гор. В ₂		кварцевый песок + фермент	гор. А ₁		гор. В ₂		кварцевый песок + фермент
	почва + фермент	контроль	почва + фермент	контроль		почва + фермент	контроль	почва + фермент	контроль	
0 _н	1,46	0,41	2,85	2,56	Кристаллизация	2,31	2,35	4,21	4,0	0,76
	Анаэробиз (переувлажнение)					Стерильный период				
7	1,32	1,10	7,99	4,36	0,58	4,09	2,46	6,26	3,87	0,72
28	1,49	1,45	5,01	3,55	0,49	5,54	5,48	5,50	5,94	0,63
42	2,26	1,33	4,38	1,10	0,39	3,35	3,50	4,63	4,72	0,60
	Аэробиз (высушивание)					Период расстерилизации				
56	7,24	3,46	6,63	6,54	0,27	1,98	1,72	2,59	2,30	0,68
77	5,35	5,19	4,50	2,74	0,47	0,41	0,44	4,53	2,20	0,55
98	2,92	1,90	4,67	4,93	0,26	1,10	0,40	4,51	2,14	0,22
126	2,06	1,20	2,84	1,93	0,16	0,81	0,16	4,0	1,26	0,08

ных образцах, которая происходила при одновременной инактивации внесенного фермента. В кварцевом песке также наблюдалась значительная инактивация свободной пероксидазы. Повышение активности фермента в образцах с почвой было, очевидно, вызвано термическим окислением и ускорением химических процессов в компостах.

С переувлажнением стерильных образцов связано некоторое увеличение активности пероксидазы в образцах с почвой. Заметной разницы по этому показателю между образцами с внесенным ферментом и контрольными не установлено. Переувлажнение кварцевого песка с ферментом существенно не

отразилось на активности пероксидазы (рис. 2).

Анаэробиз нестерильных образцов также вызвал повышение пероксидазной активности, причем в образцах горизонта В₂ она увеличилась сильнее, чем в горизонте А₁. В образце иллювиального горизонта с ферментом переувлажнение обусловило активизацию внесенной адсорбированной пероксидазы.

В образце перегнойно-аккумулятивного горизонта, где адсорбция фермента была меньшей, переувлажнение угнетающе действовало на свободный фермент, поэтому ощутимой разницы между активностью в образцах с ферментом и контролем не отмечено. В кварцевом песке анаэробиз фактически действовал как стерилизация.

Определенный интерес представляло изучение действия свободных ферментов на окислительно-восстановительные процессы, кислотность и содержание подвижного железа в изучаемых образцах.

Как показали исследования (табл. 3), при внесении каталазы и пероксидазы реакция почвенной среды практически не изменилась. Это свидетельствует о достаточной буферной способности почвы, обеспечивающей стабильность реакции среды при воздействии чужеродных ферментов.

При внесении этих же препаратов в инертный субстрат (кварцевый песок) заметно возросло (~на 2 ед.) подщелачивание среды.

Стерилизация почвенных образцов с препаратами ферментов фактически не сказалась на значении реакции среды. В то же время стерилизация данных ферментов в кварцевом песке привела к значительному (~на 4 ед.) подщелачиванию исследуемых образцов.

Анаэробиз в стерильном и нестерильном опытах с почвенными образцами вызвал

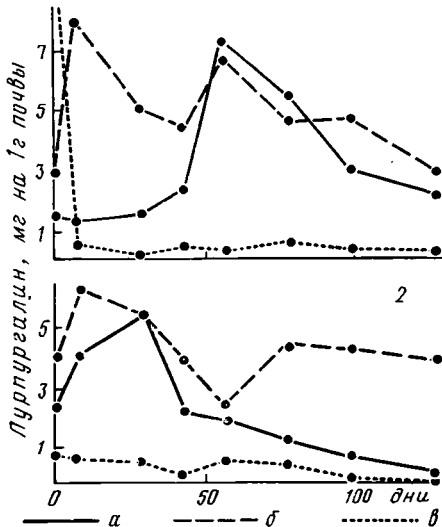


Рис. 2. Активность пероксидазы в стерильных (2) и нестерильных (1) условиях.

Обозначения те же, что на рис. 1.

рН и Eh среды при внесении свободных ферментов
в почвенные образцы и кварцевый песок

Сроки, дни	Гор. А ₁			Гор. В ₂			Кварцевый песок + каталаза	Кварцевый песок + перокси- даза
	контроль	почва + каталаза	почва + перокси- даза	контроль	почва + каталаза	почва + перокси- даза		
Нестерильный опыт								
рН								
O _{II}	5,48	5,56	5,44	5,71	5,84	5,69	7,81	7,84
при анаэробнозе (переувлажнение)								
7	5,96	5,95	5,82	5,89	5,91	5,94	8,24	8,29
28	6,43	6,48	6,34	6,07	6,23	6,12	7,82	7,69
42	6,56	6,64	6,63	5,88	6,0	5,94	7,46	7,50
при аэробнозе (высушивание)								
56	6,35	6,69	6,61	5,94	6,19	6,01	7,77	7,80
77	6,18	6,32	6,54	5,96	6,14	5,98	9,09	9,48
98	5,79	5,76	5,92	5,86	6,09	5,94	9,66	9,39
126	5,81	5,87	5,92	5,97	6,14	5,96	9,14	9,31
Eh, мВ								
при анаэробнозе								
1	+352	+346	+364	+461	+482	+439	+452	+464
7	+144	+98	+75	+352	+302	+350	+328	+302
28	-182	-201	-195	+340	+345	+303	+314	+238
42	-209	-211	-210	+324	+318	+332	+351	+338
при аэробнозе								
56	-82	-102	-98	+318	+321	+345	+345	+314
77	+177	+364	+71	+452	+459	+445	+393	+306
98	+364	+495	+455	+527	+656	+568	Нет эл.	Нет эл.
126	+427	+577	+582	+726	+744	+728	» »	» »
Стерильный опыт								
рН								
O _{II}	5,34	5,28	5,34	5,63	5,61	5,72	9,46	9,38
в стерильный период								
7	5,59	5,63	5,60	6,11	5,98	5,92	9,09	9,67
28	5,72	5,74	5,73	5,91	6,06	5,84	8,66	8,62
42	5,91	5,85	5,86	6,04	6,07	6,02	8,19	8,11
в период расстерилизации								
56	6,05	6,09	5,99	6,07	5,98	6,14	7,89	8,09
77	5,87	5,68	5,85	5,79	5,84	5,73	9,22	9,36
98	5,88	5,87	5,84	6,08	6,03	5,98	8,79	8,81
126	5,91	5,86	5,85	6,02	6,01	6,04	9,01	8,98
Eh, мВ								
в стерильный период								
1	+399	+382	+406	+497	+485	+469	+442	+463
7	+260	+205	+246	+380	+315	+369	+364	+312
28	+224	+221	+234	+373	+335	+370	+372	+329
42	+268	+210	+221	+370	+339	+327	+357	+367
в период расстерилизации								
56	+255	+315	+352	+326	+353	+347	+348	+386
77	+552	+550	+547	+595	+521	+484	Нет эл.	Нет эл.
98	+591	+583	+594	+466	+631	+553	» »	» »
126				Нет эл.	Нет эл.	Нет эл.	» »	» »

**Содержание подвижного железа при внесении свободных ферментов
в почвенные образцы**

Сроки, дни	Гор. А ₁			Гор. В ₂		
	контроль	почва + ката- лаза	почва + пе- роксидаза	контроль	почва + ката- лаза	почва + пе- роксидаза
Нестерильный опыт						
FeO, мг/100 г субстрата						
О _и	4,41	4,52	4,48	4,51	4,59	4,53
при анаэробнозе (переувлажнение)						
7	30,86	29,10	30,85	8,30	6,21	7,82
28	150,5	173,5	163,0	12,61	15,14	13,21
42	233,0	249,0	303,5	21,30	18,42	20,12
при аэробнозе (высушивание)						
56	93,0	89,82	94,35	20,48	19,14	18,91
77	40,21	44,06	39,51	11,98	12,31	11,69
98	24,82	23,14	25,12	13,81	14,15	11,89
126	23,20	21,25	22,31	4,69	3,69	4,52
Fe₂O₃, мг/100 г субстрата						
О _и	13,82	14,02	13,79	24,14	18,12	14,78
при анаэробнозе						
7	4,14	10,77	2,07	0,87	6,22	1,70
28	6,0	11,3	3,3	6,6	7,1	4,9
42	4,4	12,6	34,6	23,6	14,8	38,5
при аэробнозе						
56	19,2	26,40	11,0	19,2	12,6	35,7
77	42,9	44,0	28,0	16,0	7,7	14,19
98	96,07	101,12	99,82	39,14	29,14	31,18
126	121,0	118,91	109,13	42,83	39,92	40,13
Стерильный опыт						
FeO						
О _и	3,5	3,5	3,0	2,0	4,5	3,5
в стерильный период						
7	9,31	9,44	8,99	4,52	4,67	3,98
28	11,62	10,91	11,12	6,18	7,12	5,86
42	6,24	5,64	6,11	Сл.		Сл.
в период расстерилизации						
56	3,82	4,91	Сл.	Сл.	Сл.	Сл.
77	Сл.	Сл.	»	»	»	»
98	»	»	»	»	»	»
126	»	»	»	»	»	»
Fe₂O₃						
О _и	0,55	1,11	0,55	1,66	2,22	1,66
в стерильный период						
7	7,07	1,01	11,65	11,25	4,36	7,23
28	8,25	7,33	7,45	7,63	6,70	5,98
42	6,19	14,68	17,04	5,93	12,56	17,09
в период расстерилизации						
56	6,01	5,67	3,46	5,0	11,89	2,24
77	7,19	6,12	3,57	2,30	2,33	1,16
98	11,22	12,14	10,81	4,82	6,71	3,89
126	9,32	11,12	10,91	5,92	4,98	5,11

Примечание. В вариантах с кварцевым песком как в исходном образце, так и после внесения каталазы и пероксидазы подвижного железа не было обнаружено.

слабое подщелачивание среды, тогда как в варианте с кварцевым песком сдвиг реакции в сторону подщелачивания был большим.

Внесение ферментов не повлияло и на окислительно-восстановительное состояние почвы. Как в стерильном, так и в нестерильном опыте наиболее низкие потенциалы были в перегнойно-аккумулятивном горизонте, более высокие — в иллювиальном горизонте и кварцевом песке.

Изменение увлажнения (анаэробноз) внесло свои коррективы в редокс-состояние почвы. В нестерильном опыте с почвой горизонта A_1 на 30—40-й день инкубации потенциалы снизились до отрицательных значений синхронно во всех вариантах.

В образцах почвы горизонта B_2 и кварцевом песке значение E_h уменьшилось весьма незначительно. В стерильном опыте, как и следовало ожидать, переувлажнение фактически не привело к снижению E_h .

Как видно из табл. 4, внесение ферментов не сказалось на содержании подвижных форм железа во всех вариантах опытов (стерильного и нестерильного).

Таким образом, внесение свободных ферментов не оказало влияния на окислительно-восстановительное состояние почвы, кислотность и содержание подвижных форм железа.

1. При внесении в серую лесную почву свободного фермента каталазы ферментативная активность в горизонте A_1 и горизонте B_2 увеличивалась в одинаковой степени (~в 2 раза), а при внесении пероксидазы в той же концентрации ферментативная активность в горизонте A_1 возрастала ~в 3 раза и почти не изменялась в горизонте B_2 .

2. Стерилизация (термообработка) почвенных образцов и кварцевого песка вызвала полное уничтожение каталазы. В почвенном образце горизонта A_1 при этом частично (на 56 %) снижалась активность почвенной каталазы. В результате термической обработки суммарная пероксидазная активность почвенных образцов повысилась ~в 1,5 раза.

3. В условиях анаэробноза в варианте с кварцевым песком и свободной каталазой не наблюдалось полной инактивации фермента, а в варианте с кварцевым песком и пероксидазой она была отмечена.

4. Внесение в почвенные образцы ферментов не сказывается на окислительно-восстановительном состоянии почвы, кислотности и содержании в ней подвижных форм железа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алиев Р. А. Особенности ферментативной активности почв. — Автореф. канд. дис. М., 1975. — 2. Великанов Л. Л., Великанов Н. Л., Звягинцев Д. Г. Влияние температуры на активность свободных и адсорбированных ферментов. — Почвоведение, 1971, № 3, с. 61—68. — 3. Вигоров А. И. Особенности каталазы подзолистой почвы. — Докл. АН СССР, 1958, т. 122, № 6, с. 1107—1110. — 4. Галстян А. Ш. Определение сравнительной активности пероксидазы и полифенолоксидазы в почве. — Докл. АН Арм. ССР, 1958, т. 26, № 5, с. 285—288. — 5. Галстян А. Ш. Ферментативная активность почв Армении. Ереван: Айдастан, вып. VIII, 1974. — 6. Звягинцев Д. Г., Великанов Л. Л. Влияние адсорбции ферментов на почвенных частицах и минералах на их

активность. — Сб. докл. симп. по ферментам почвы. Минск, 1968, с. 108—119. — 7. Звягинцев Д. Г., Алиев Р. А. Сравнительное изучение температурной устойчивости каталазы различного происхождения. — Почвоведение, 1975, № 3, с. 73—80. — 8. Купревич В. Ф., Щербакова Т. А. Почвенная энзимология. Минск: Наука и техника, 1966. — 9. Тарарина Л. Ф., Воинова В. Н., Емцев В. Т. Действие гамма-излучения и высоких температур на ферментативную активность серой лесной почвы. — Изв. ТСХА, 1981, вып. 1, с. 93—101. — 10. Хазиев Ф. Х. Некоторые термодинамические характеристики ферментативных реакций в почве. — Науч. докл. высш. шк. Биол. науки, 1975, № 10, с. 212—127.

Статья поступила 7 января 1982 г.

SUMMARY

Effect of applied catalase and peroxidase enzymes (2.5 mg/100 gr substratum) and sterilization on enzyme activity of gray forest soil was studied.

Free catalase enzyme caused 2 times increase of enzyme activity in soil samples, peroxidase caused 3 times increase in activity in soil sample A_1 , the activity in soil sample B_2 did not change.

Sterilization of samples resulted in entire annihilation of applied free catalase. The activity of soil catalase decreased (for 56 %) in soil sample A_1 . Total peroxidase activity of soil samples increased in 1.5 times in the result of heat treatment. Enzymes did not effect on redox soil condition, acidity and ferritization.