

БИОХИМИЯ ПОЧВ

УДК 631.46

Т. К. ИЛЬИНА, В. В. НЕГРУ-ВОДЭ, Е. С. ВАСИЛЕНКО

АКТИВНОСТЬ ДИССИМИЛЯЦИОННЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ
НИТРАТ- И НИТРИТРЕДУКТАЗ В ПОЧВЕ

Разработаны методы определения диссимиляционных нитрат- и нитритредуктаз в почве, проявляющих характерную для них активность вне зависимости от жизнедеятельности соответствующих восстанавливающих нитраты и нитриты микроорганизмов. В качестве объекта исследований была использована дерново-подзолистая суглинистая почва.

Ферменты нитратредуктазы, восстанавливающие нитраты до нитритов, и нитритредуктазы, осуществляющие дальнейшее восстановление нитритов, могут быть ассимиляционными и диссимиляционными [7]. Последние активно функционируют в анаэробных условиях, принимая участие в энергетических процессах денитрификации и нитратного дыхания микроорганизмов. Физиологическое значение данных энергетических процессов сходно и состоит в получении энергии АТФ, необходимой для жизнедеятельности микроорганизма, а различия заключаются в природе образуемых продуктов восстановления. Это зависит от особенностей диссимиляционных нитрат- и нитритредуктаз и условий их функционирования. В ходе денитрификации нитрат превращается в молекулярный азот и газообразные окислы азота. В процессе нитратного дыхания нитрат с высокой интенсивностью восстанавливается до нитрита или до аммиака. Активность этих процессов в почве является предпосылкой косвенной денитрификации (хемоденитрификации) благодаря химическим превращениям нитритов в газообразные азотные продукты. Кроме того, нитриты сами по себе могут использоваться многими почвенными денитрификаторами в энергетических процессах нитритредукции, заканчивающейся образованием газообразных форм азота. [18].

Развитие диссимиляционных процессов нитрат- и нитритредукции в почве отрицательно сказывается на ее азотном режиме вследствие улетучивания газообразных форм азота в атмосферу. Размеры газообразных потерь азота минеральных удобрений при внесении их в почву в среднем достигают 20—40% [2, 9, 19].

Почвенные спороносные денитрификаторы в энергетическом процессе нитратредукции восстанавливают нитраты до газообразных форм азота и до аммиака с образованием нитрита в качестве промежуточного продукта [8, 19]. Соотношение образуемых продуктов восстановления находится в тесной связи с окружающими факторами внешней среды. Химизм этих процессов создает возможности регулирования восстановления нитратов в почве в сторону образования легкодоступного для растений источника азота — аммиака и уменьшения газообразных потерь азота на основе создания соответствующих почвенных условий.

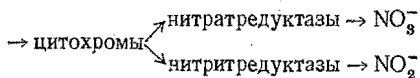
В связи с дальнейшим ростом производства и применения минеральных азотных удобрений возрастает значение исследований рационального регулирования азотного баланса почв. Почвенно-микробиологические исследования в этом направлении ограничивались изучением осо-

бенностей денитрифицирующих микроорганизмов и условий, влияющих на интенсивность процессов денитрификации. Изучение внеклеточных ферментативных механизмов энергетической нитрат- и нитритредукции в почве оставалось без внимания, вопрос об активности этих механизмов подвергался сомнению, так как не было методов их обнаружения в почве.

Для измерения нитрат- и нитритредуктазной активности в почве, обусловленной жизнедеятельностью почвенных микроорганизмов, применяются методы Галстяна [4, 5]. Они имеют большое значение в исследованиях при оценке роли микрофлоры в азотном балансе почв и при изучении ряда процессов почвообразования [3, 17, 22]. Однако с помощью этих методов нельзя измерить активность внеклеточных диссимиляционных нитрат- и нитритредуктаз в почве, которые самостоятельно в ней функционируют, независимо от жизнедеятельности почвенных микроорганизмов. Это утверждение вытекает из анализа публикаций, посвященных изучению биохимических особенностей нитрат- и нитритредуктазных систем, и в дальнейшем подтверждено нами экспериментально.

Нитрат- и нитритредуктазы относятся к классу оксидоредуктаз. В живых организованных системах они функционируют в сложной цепи окислительно-восстановительных ферментативных реакций, катализирующих процессы восстановления нитратов и нитритов. Они являются эндоэнзимами, проявляют активность внутри клеток жизнеспособных организмов и не выделяются ими в окружающую среду. Диссимиляционные нитрат- и нитритредуктазные ферментные системы, участвующие в энергетических процессах нитрат- и нитритредукции, подобны системам кислородного дыхания, но в отличие от последних используют в анаэробных условиях в качестве конечных акцепторов электронов кислород нитратов или нитритов вместо молекулярного кислорода. Собственно нитрат- и нитритредуктазы являются конечными звеньями этих систем, непосредственно реагирующими с нитратом или нитритом, вызывая их восстановление. Их функция подобна цитохромоксидазам — конечным ферментам в цепи переноса электронов кислородного дыхания. На основании имеющихся литературных данных о механизме действия диссимиляционных нитрат- и нитритредуктаз [7, 12, 13, 16] можно схематически представить последовательность переноса электронов в окислительно-восстановительных системах энергетических процессов нитрат- и нитритредукции у различных микроорганизмов следующим образом:

Исходные физиологические донаторы электронов (органические вещества у гетеротрофных микроорганизмов; S ; соли $H_2S_2O_3$; H_2S ; H_2 у автотрофных и факультативно-автотрофных денитрификаторов) → в качестве простетических групп НАД или НАДФ → в качестве простетических групп ФАД или ФМН



Нитратредуктазы представляют собой металлоэнзимы, содержащие молибден в качестве активатора; активность нитритредуктаз стимулируется ионами Fe^{++} и Cu^{++} . Рядом исследователей отмечалась геминовая природа конечных диссимиляционных нитритредуктаз. Простетическая группа этих ферментов представлена гемом «а₂». В аэробных условиях они функционируют как цитохромоксидазы, в анаэробных — как нитритредуктазы [14, 20]. Нитрат- и нитритредуктазные диссимиляционные системы в клетках микроорганизмов локализованы на мембранных структурах. Благодаря этому осуществляется согласованность их дей-

ствия, выражающаяся в последовательном переносе электронов от исходных донаторов к конечным акцепторам — нитрату или нитриту. В результате происходит восстановление последних. Конечные нитрат- и нитритредуктазы этих систем, попадающие в почву после отмирания соответствующих микроорганизмов и разрушения их клеточных структур, не могут непосредственно взаимодействовать с исходными физиологическими донаторами электронов, например с глюкозой. Иными словами, активирование (восстановление) данных внеклеточных ферментов с помощью глюкозы термодинамически невозможно вследствие значительного расхождения их окислительно-восстановительного потенциала. Оно осуществляется только благодаря промежуточным переносчикам электронов, постепенно изменяющим значение окислительно-восстановительного потенциала от исходного донатора к конечному акцептору, которые согласованно и последовательно функционируют внутри клетки жизнеспособного микроорганизма. Отсюда можно предположить, что обычно применяемая в качестве исходного донатора электронов глюкоза не может быть их непосредственным источником для конечных внеклеточных нитрат- или нитритредуктаз, а следовательно, нитраты и нитриты не восстанавливаются глюкозой вне клетки микроорганизма.

Мы предлагаем использовать в качестве активатора конечных внеклеточных нитрат- и нитритредуктаз в почве гидросульфит ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). Он применяется в качестве восстановителя в биохимии при изучении активности различных окислительно-восстановительных очищенных ферментов, в частности нитратредуктаз [11, 15], и для восстановления компонентов, с помощью которых происходит активирование нитритредуктаз [21]. Поскольку гидросульфит является неспецифическим восстановителем, то при его использовании можно суммарно определить каталитические функции нитрат- и нитритредуктаз в почве независимо от источника их происхождения и таким образом полностью выявить всю активность данных ферментов в почве или по крайней мере большинства из них.

Для доказательства возможности измерения активности внеклеточных диссимиляционных почвенных нитрат- и нитритредуктаз с помощью гидросульфита были поставлены опыты со стерильными образцами дерново-подзолистой почвы и чернозема, обработанными γ -лучами в дозе 2 млн. рентген. Исследования показали, что в облученных образцах почвы активность внутриклеточных ферментов, измеренная с помощью глюкозы, не проявлялась, так как развитие микроорганизмов в стерильной почве было исключено. В противоположность этому внеклеточные ферменты, активированные гидросульфитом, нормально функционировали в стерильной почве. На основе проведенных опытов можно прийти к заключению, что с помощью глюкозы нельзя измерить активность внеклеточных почвенных диссимиляционных нитрат- и нитритредуктаз, тогда как активность этих ферментов нормально выявляется при использовании неорганического донатора электронов — гидросульфита.

При разработке метода определения внеклеточных нитрат- и нитритредуктаз в почве необходимо было найти оптимальные условия для проявления активности данных ферментов в почве. Различие физических, химических и биологических свойств почв не может не сказаться на количестве содержащихся в них ферментов и их активности. В качестве объекта для разработки такого метода была использована целинная дерново-неглубоко подзолистая суглинистая почва Зеленоградского стационара Почвенного института им. В. В. Докучаева [10]. Для исследований использовали смешанный образец почвы, составленный из проб, взятых в различные сроки вегетационного периода. Образцы отбирали из слоя 0—20 см в пяти точках одного участка. Участок вы-

бирали на основании результатов ряда других наших исследований на этом стационаре. Для методических опытов брали растертые в фарфоровой ступке воздушно-сухие образцы почвы, пропущенные через сито с отверстиями 0,25 мм. В специальной серии опытов изучали влияние на активность внеклеточных почвенных нитрат- и нитритредуктаз реакции среды (рН), концентрации донатора электронов (гидросульфита) и акцепторов электронов (нитрата и нитрита), температуры и времени экспозиции. Эти опыты проводили, как правило, трижды в 3—4-кратной повторности. Полученные данные обрабатывали методом дисперсионного анализа однофакторного по Доспехову [6] при уровне значимости $\alpha = 0,05$. В каждой серии этих опытов проверяли возможность активности внеклеточных ферментов за счет донаторов самой почвы, т. е. без добавления экзогенного донатора — гидросульфита. Восстановление нитрата и нитрита за счет эндогенных донаторов почвы не обнаружено, что обусловлено либо отсутствием таких донаторов в исследуемых образцах, либо отсутствием условий для проявления их активности.

Различия в активности исследованных ферментов в зависимости от внешних условий и оптимальные значения их активности в дерново-подзолистой почве были достоверно установлены на основе значений точности опытов (P , %), коэффициентов вариации (v , %), степеней свободы (f_1 и f_2), критерия Фишера (F) и наименьшей существенной разницы (НСР).

Одним из главных факторов, влияющих на активность ферментов, является концентрация ионов водорода в среде их функционирования. Из литературных источников известно, что оптимум действия нитрат- и нитритредуктаз приходится на интервал рН 7,5—8,5. При добавлении (по Галстяну) 20 мг CaCO_3 на 1 г кислых почв оптимум рН не достигается. В исследованном нами образце дерново-подзолистой почвы с исходным значением рН водной вытяжки 4,2 при добавлении этого количества CaCO_3 даже к навеске почвы без гидросульфита, который подкисляет среду, значение рН не превышает 5,5. Вместе с тем вследствие слабой диффузии CaCO_3 в почве из-за его малой растворимости распределяется он в образце неравномерно, что создает значительные колебания значений рН. Увеличение дозы CaCO_3 в 2—3 раза не вызывает дальнейшего изменения рН. Поэтому необходимые стабильные значения рН мы создавали добавлением 1 мл 1/6-молярного раствора фосфатного буфера. Значения рН в щелочной области создавали добавлением к данному раствору фосфатного буфера нескольких капель насыщенного раствора бикарбоната натрия.

Из табл. 1 видно, что максимальная активность диссимиляционных внеклеточных нитрат- и нитритредуктаз в дерново-подзолистой почве наблюдается соответственно при рН 7,8 и 7,75—8,35.

Из данных табл. 2—5 видно, что для обнаружения максимальной активности исследованных ферментов в 1 г дерново-подзолистой почвы нужно проводить экспозицию проб в анаэробных условиях при температуре 37° и соблюдении следующих условий: 50—60 мг гидросульфита, 10 мг KNO_3 , время опыта 1 час для выявления активности нитратредуктаз и соответственно 40 мг гидросульфита, 5 мг NaNO_2 , время опыта 15 мин. для выявления активности нитритредуктаз.

Не исключена возможность, что в почве стимулируется химическая активность гидросульфита по сравнению с контролем реактивов и ввиду этого при определении активности ферментов в образцах почвы получается завышенный результат. Чтобы измерить энзиматическую активность нитрат- и нитритредукции в почве, выявляемую с помощью гидросульфита, нужно было найти способ ее обособления от химического восстановления нитратов и нитритов в почве гидросульфитом. Этого можно достичь при подборе ингибитора данных ферментов. Исследуемые ингибиторы вносили в контрольные образцы почвы до добав-

Таблица 1

Влияние реакции среды (рН) на активность внеклеточных диссимиляционных нитрат- и нитритредуктаз в дерново-подзолистой почве

рН	n	\bar{X}	S^2	m	P, %	v, %
Нитратредуктаза						
6,3	9	3,4	0,3	0,1	3,0	9,1
7,2	9	4,4	0,8	0,2	6,3	18,9
7,8	9	11,1	0,2	0,08	0,7	2,2
$Sd=0,2$, $HCP=0,5$, $F=539,9$, $f_1=2$, $f_2=24$						
Нитритредуктаза						
6,25	12	9,9	2,3	0,69	6,9	24,1
7,00	12	23,9	3,0	0,88	3,6	12,7
7,75	12	29,7	1,6	0,48	1,6	5,6
8,35	12	30,4	2,1	0,06	0,2	0,69
8,60	12	25,9	5,9	0,17	0,66	2,29
9,00	12	19,6	6,2	0,18	0,9	3,15
$Sd=0,72$, $HCP=1,4$, $F=93,7$, $f_1=5$, $f_2=66$						

Примечание. При рН 5 и 8,5 активность нитратредуктазы не наблюдалась. Здесь и в табл. 2—5: n — число наблюдений, \bar{X} — средняя арифметическая величина из всех вариантов, S^2 — среднее квадратическое отклонение, m — ошибка среднего, P, % — точность опыта, v, % — коэффициент вариации.

Таблица 2

Влияние количества гидросульфита на активность внеклеточных диссимиляционных нитрат- и нитритредуктаз в дерново-подзолистой почве

Гидро- сульфит, мг	n	\bar{X}	S^2	m	P, %	v, %
Нитратредуктаза						
40	9	19,5	12,7	4,2	21,7	65,4
50	9	56,3	7,6	2,5	4,5	13,5
60	9	52,6	5,5	1,8	3,5	10,6
70	9	14,0	0,8	0,3	1,8	5,4
$Sd=3,7$, $HCP=7,5$, $F=68,4$, $f_1=3$, $f_2=32$						
Нитритредуктаза						
10	12	4,4	0,41	0,12	2,7	9,4
20	12	21,9	0,095	0,027	0,12	0,43
30	12	34,6	4,2	1,2	3,5	12,2
40	12	39,2	2,2	0,64	1,6	5,7
50	12	34,2	3,0	0,89	2,6	9,0
$Sd=1,0$, $HCP=2,0$, $F=121,2$, $f_1=4$, $f_2=55$						

Примечание. При использовании гидросульфита в количествах 10, 20, 30, 80 и 90 мг активность нитратредуктазы не обнаружена.

ления остальных реактивов и оставляли в состоянии взаимодействия с почвой в течение времени экспозиции на ферментативную активность опытных образцов. Для создания одинаковых условий в контрольных и опытных образцах почвы к последним также добавляли ингибитор по окончании времени экспозиции на ферментативную активность. К контролю реактивов и к контролю почвы с реактивами ингибитор добавляли в той же концентрации, что и в опытные колбы с почвой.

Были испытаны следующие инактиваторы нитрат- и нитритредуктаз: сулема ($HgCl_2$), цианистый калий (KCN), роданистый калий (KCNS), азид натрия (NaN_3), насыщенные растворы борной кислоты

Таблица 3

Влияние концентрации субстрата (нитрата и нитрита) на активность внеклеточных диссимиляционных нитрат- и нитритредуктаз в дерново-подзолистой почве

Концентрация субстрата, мг	n	\bar{X}	S^2	m	P, %	v, %
Нитратредуктаза						
2,5	6	3,1	3,5	1,4	45,7	111,9
5,0	6	9,1	0,9	0,4	4,3	10,7
10,0	6	53,6	2,5	1,0	1,9	4,7
$Sd=1,4$, $HCP=2,9$, $F=691,1$, $f_1=2$, $f_2=15$						
Нитритредуктаза						
1,0	9	9,0	1,7	0,6	6,4	19,1
2,0	9	16,0	1,1	0,4	2,2	6,7
3,0	9	24,2	5,9	2,0	8,2	24,7
4,0	9	35,8	8,0	2,7	7,4	22,3
5,0	8	55,8	3,5	1,2	2,2	6,3
6,0	9	50,4	6,0	2,0	4,0	11,9
7,0	6	33,3	3,3	1,4	4,1	9,9
8,0	9	16,7	3,3	1,1	6,6	19,7
$Sd=0,24$, $HCP=4,7$, $F=108,1$, $f_1=7$, $f_2=60$						

Примечание. При концентрации нитрата 1,5 и 20 мг активность не обнаружена.

Таблица 4

Влияние времени экспозиции на активность внеклеточных диссимиляционных нитрат- и нитритредуктаз в дерново-подзолистой почве

Время, час	n	\bar{X}	S^2	m	P, %	v, %
Нитратредуктаза						
0,5	12	13,5	0,9	0,3	2,0	7,0
1,0	12	18,6	1,7	0,5	2,6	9,1
24,0	12	12,4	1,1	0,3	2,6	9,0
$Sd=0,5$, $HCP=1,0$, $F=77,9$, $f_1=2$, $f_2=33$						
Нитритредуктаза						
0,25	12	42,7	1,3	0,39	0,92	3,2
0,5	12	40,3	1,1	0,31	0,79	2,7
1,0	12	40,3	1,1	0,31	0,79	2,7
$Sd=5,07$, $HCP=1,0$, $F=25$, $f_1=1,0$, $f_2=22$						

(H_2BO_3) и фтористого натрия (NaF). Из всех испытанных ингибиторов только фторид в количестве 1 мл насыщенного раствора на 1 г почвы оказался пригодным в качестве инактиватора внеклеточных почвенных нитратредуктаз, а сулема в концентрации $5,5 \cdot 10^{-2}$ мМ на 1 г почвы подавляла активность внеклеточных почвенных нитритредуктаз. Как видно из табл. 6, испытанные ингибиторы не стимулируют химическое взаимодействие нитрата или нитрита с гидросульфитом в присутствии почвы.

Следовательно, обнаруженная убыль содержания азота нитрата или нитрита в опытных образцах почвы произошла в результате их восстановления почвенными энзимами. Таким образом, наблюдения с ингибиторами доказывают, что в опытных образцах почвы мы действительно измеряем активность внеклеточных диссимиляционных нитрат- или нитритредуктаз. Поскольку использованная дерново-подзолистая поч-

Таблица 5

Влияние температуры на активность внеклеточных диссимиляционных нитрат- и нитритредуктаз в дерново-подзолистой почве

Температура, °С	n	\bar{X}	S^2	m	P. %	v. %
Нитратредуктаза						
0	9	48,0	0	0	0	0
20	9	71,1	15,5	5,2	7,3	21,8
30	9	72,0	0	0	0	0
37	9	91,0	0	0	0	0
50	8	78,0	11,1	3,9	5,0	14,2
60	8	66,0	11,1	3,9	5,9	16,8
$Sd=0,44$, $HCP=8,9$, $F=22,5$, $f_1=5$, $f_2=46$						
Нитритредуктаза						
0	9	21,9	2,6	0,9	3,9	11,9
20	8	40,8	5,8	2,1	5,1	14,3
30	9	45,1	2,6	0,9	1,9	5,8
37	9	53,2	1,0	0,3	0,6	1,9
50	7	18,9	2,2	0,8	4,4	11,5
$Sd=0,16$, $HCP=3,23$, $F=176,4$, $f_1=4$, $f_2=37$						

Примечание. При $t=80^\circ$ активность ферментов не обнаружена.

Таблица 6

Влияние ингибиторов на активность внеклеточных диссимиляционных нитрат- и нитритредуктаз в дерново-подзолистой почве

Содержание азота (мг) после экспозиции проб				Убыль азота (мг) в результате активности ферментов в 1 г почвы	Активность ферментов (мг восстановленного азота на 100 г почвы)
реактивы с ингибитором (контроль реактивов)	исходная почва (без ингибитора)	исходная почва с ингибитором и реактивами (контрольные образцы почвы)	опытные образцы почвы (ингибитор добавлялся после экспозиции на ферментативную активность)		
Нитратредуктаза (ингибитор NaF)					
1,23	0,22	1,45	1,11	0,34	34
1,23	0,22	1,45	1,10	0,35	35
1,02	0,18	1,20	0,97	0,23	23
Нитритредуктаза (ингибитор HgCl ₂)					
0,39	0	0,39	0,08	0,31	31
0,34	0	0,34	0,15	0,19	19
0,30	0	0,30	0,13	0,17	17

Примечание. Приведены данные по азоту нитрата при испытании влияния ингибитора на активность нитратредуктаз и по азоту нитрита при испытании влияния ингибитора на активность нитритредуктаз.

ва не стимулирует химическую активность гидросульфита, измерение активности этих ферментов можно проводить в отсутствие ингибитора. При определении активности данных ферментов в других почвах необходимо проверить действие ингибитора и возможность его исключения. В случае необходимости ингибитор должен быть добавлен к контрольным образцам почвы с реактивами для разграничения активированной гидросульфитом энзиматической активности восстановления нитрата или нитрита от химического взаимодействия последних с гидросульфитом в присутствии почвы.

Внеклеточные ферментативные процессы нитрат- и нитритредукции могут играть важную роль в азотном режиме почвы в тех условиях, когда жизнедеятельность микроорганизмов по тем или иным причинам

Таблица 7

Активность диссимиляционных нитрат- и нитритредуктаз в различных образцах почвы в зависимости от донатора электронов

Почва	Состояние почвы	Номер опыта	Донаторы электронов		Почва	Состояние почвы	Номер опыта	Донаторы электронов	
			гидросульфит	глюкоза				гидросульфит	глюкоза
Нитратредуктаза					Нитритредуктаза				
Дерново-подзолистая	Исходная	1	11,4	106	Дерново-подзолистая	Исходная	1	30,5	22,8
		2	12,8	90			2	18,0	23,5
		3	11,2	90			3	19,4	23,5
	Облученная	1	11,6	0		Облученная	1	27,3	0
		2	13,1	0			2	28,1	0
		3	11,2	0			3	30,2	0
Чернозем	Исходная	1	20,3	100	Чернозем	Исходная	1	32,6	10,5
		2	22,9	102			2	30,0	10,5
		3	20,3	98			3	30,5	11,4
	Облученная	1	14,2	0		Облученная	1	24,8	0
		2	21,0	0			2	26,0	0
		3	16,4	0			3	25,8	0

Примечание. Время экспозиции на активность с глюкозой составляло 24 час.

подавлена. Этот факт нами показан в опытах, в которых обнаружено активное функционирование внеклеточных нитрат- и нитритредуктаз в дерново-подзолистой почве при низких температурах (табл. 5). В этих неблагоприятных условиях происходит торможение развития почвенной микрофлоры.

В опытах со стерильными образцами почвы, обработанными γ -лучами в дозе 2 млн. рентген, также обнаружена значительная активность внеклеточных нитрат- и нитритредуктаз. В данном случае активность внеклеточных ферментов измеряли в оптимальных условиях ее проявления, а активность внутриклеточных ферментов определяли по Галстяну в оптимальной зоне рН. Как видно из табл. 7, активность почвенных нитрат- и нитритредуктаз при использовании гидросульфита в качестве донатора электронов находится примерно на одном уровне в естественной и облученной дерново-подзолистой почве. Активность же этих ферментов в облученной почве в присутствии глюкозы совсем не проявляется. Таким образом, в облученной почве, где жизнедеятельность микроорганизмов была полностью подавлена (доказано проверкой почвы на стерильность), восстановление нитрата и нитрита не происходит. Наблюдения над мощным черноземом показали аналогичные результаты; за исключением того, что облучение несколько снижало активность внеклеточных нитрат- и нитритредуктаз в этой почве.

Как следует из полученных результатов, активность внутриклеточных нитратредуктаз почвенных микроорганизмов в 5—10 раз превышает активность внеклеточной диссимиляционной нитратредукции в почве. Однако внеклеточные ферментативные процессы достаточно эффективны; время проявления их активности короче, чем у микроорганизмов, и, кроме того, они могут функционировать в почвах в условиях, когда развитие соответствующих микроорганизмов отсутствует. Принимая во внимание эти соображения, можно считать, что внеклеточные ферментативные процессы нитратредукции играют значительную роль в азотном режиме почв.

В отличие от диссимиляционных внеклеточных почвенных нитратредуктаз активность диссимиляционных внеклеточных нитритредуктаз либо была на одном уровне с активностью диссимиляционных нитрит-

редуктаз почвенных микроорганизмов, либо превышала таковую. Отсюда можно прийти к заключению о существенной роли внеклеточных ферментативных процессов восстановления нитритов в почве, интенсивность которых не уступает или даже превышает участие микрофлоры в этих процессах.

В результате проведенных исследований мы предлагаем методы определения активности внеклеточных диссимиляционных нитрат- и нитритредуктаз в почве. За основу этих методов были взяты методы Галстяна по определению активности внутриклеточных диссимиляционных нитрат- и нитритредуктаз почвенных микроорганизмов. Описание методов приведено ниже.

1. Рабочая методика по определению внеклеточной нитратредуктазной активности почвы. Навеску 1 г растертой и пропущенной через сито с отверстиями 0,25 мм воздушно-сухой дерново-подзолистой почвы и 50—60 мг гидросульфита натрия помещают в конические колбы емкостью 50 мл и перемешивают в сухом состоянии. Оптимальные стабильные значения pH реакционных смесей (7,8) создают добавлением 1 мл 1/6-молярного раствора фосфатного буфера (pH=8,04—8,34) и нескольких капель насыщенного раствора NaHCO_3 . К суспензии почвы с гидросульфитом в фосфатном буфере добавляют 1 мл 1%-ного раствора KNO_3 (10 мг). В контрольные колбы того же объема помещают все компоненты опытной смеси, кроме почвы. Их используют для измерения химических реакций гидросульфита с нитратом. Кроме того, используют контрольные колбы той же емкости, содержащие эквивалентную опытным колбам навеску почвы в фосфатном буфере без добавления остальных реагентов опытной смеси, которые используют для определения нитрата в исходных образцах почвы. В контрольных колбах создают значения pH, равные таковым в опытных, также при помощи фосфатного буфера в той же концентрации и насыщенного раствора NaHCO_3 . Общий объем жидкости во всех колбах доводят до 4 мл дистиллированной водой.

Затем все колбы помещают в вакуум-экссикатор или анаэроустат и инкубируют в анаэробных условиях при температуре 37° в течение 1 часа. В этом случае создаются более равномерные условия разряжения в колбах по сравнению с индивидуальными колбами типа Тунберга, а время, затраченное на эвакуацию воздуха из общего сосуда, сокращается во столько раз, сколько проб используется. По окончании экспозиции на ферментативную активность определяют содержание нитратов во всех колбах. Для этого содержимое колб фильтруют через двойной фильтр с синей лентой в мерные колбы на 100 мл. После многократного промывания почвы на фильтре дистиллированной водой, фильтрат доводят до метки также дистиллированной водой. Контрольные колбы обрабатывают так же, как и опытные. Содержание нитратов в фильтрах определяют фотоэлектроколлометрически при 453 мμ путем измерения светопропускания продукта взаимодействия нитрата с дисульфифеноловой кислотой. Испытание спектрофотометрического определения нитратов методом Бастиана в модификации Борисовой [1] и математическая обработка полученных результатов показали его непригодность для производства анализов внеклеточных почвенных нитратредуктаз.

При получении мутных опалесцирующих экстрактов мы не рекомендуем добавление насыщенного раствора алюмо-калиевых квасцов. Это вызывает резкое падение pH почвенного экстракта, вследствие чего при выпаривании, предусмотренном использованным методом определения нитратов, может произойти их химическое разрушение, что искажает результат и приводит к ошибочным выводам о величинах ферментативной нитратредукции. Мы показали, что опалесценция почвенного экстракта, если таковая наблюдается, не отражается на определении

нитрата данным методом. Применение же растворов солей для снижения извлечения из почвы окрашенных гумусовых веществ мы не рекомендуем, так как анионы используемых для этой цели солей мешают коллометрическому определению нитратов, вызывая уменьшение интенсивности образуемой желтой окраски.

2. Рабочая методика по определению внеклеточной нитритредуктазной активности почвы. Способ подготовки почвы и постановка опыта аналогичны таковым при определении активности нитратредуктаз. Опытную реакционную смесь готовят следующим образом. К смеси 1 г почвы и 40 мг гидросульфита добавляют фосфатный буфер в тех же количествах и концентрации исходного раствора, как и при измерении нитратредуктазной активности, и несколько капель насыщенного раствора соды для доведения рН реакционной смеси до оптимального уровня, равного 7,75—8,35. Затем приливают 1 мл 0,5%-ного раствора NaNO_2 (5 мг нитрита) и 2 мл дистиллированной воды. Так же готовят контрольные колбы с реактивами и контрольные колбы с почвой без реактивов. Через 15 мин. экспозиции проб при температуре 37° в анаэробных условиях определяют содержание нитрита в пробах. Для этого содержимое колб фильтруют через двойной фильтр с синей лентой в мерные колбы на 100 мл и доводят до метки дистиллированной водой. Если в исходной почве содержание нитрита незначительно, то присутствие в почвенном экстракте темноокрашенных веществ гумусовой природы мешает определению нитрита. Для устранения этого явления к содержимому колб добавляют по 10 мл 0,01-молярного водного раствора CaCl_2 в качестве экстрагента нитрита и коагулятора гумусовых веществ. После перемешивания содержимое колб фильтруют, промывают несколько раз этим же раствором CaCl_2 , а затем дистиллированной водой, и объем фильтрата доводят до 100 мл также дистиллированной водой. Содержание нитрита в фильтратах определяют по Илосвею — Гриссу с последующим измерением светопропускания окрашенных растворов на фотоэлектроколориметре при 536 нм.

Так как выявление активности нитрат- и нитритредуктаз почвы проводится в анаэробных условиях, мы считаем, что в данных случаях главным образом определяется активность диссимиляционных ферментов. Активность ферментов определяют по разнице между количеством нитрата или нитрита в контрольных колбах (суммарным количеством нитрата или нитрита в исходной почве и контроле реактивов) и их содержанием в опытных образцах почвы. Ее выражают в мг восстановленного азота нитрата или нитрита на 100 г почвы.

Полученные результаты показывают, что в дерново-подзолистой суглинистой почве содержатся внеклеточные диссимиляционные нитрат- и нитритредуктазы и что они могут проявлять характерную для них активность. При изучении роли данных энзиматических факторов в других почвах необходимо проведение исследований по выявлению оптимальных условий для проявления их активности в исследуемой почвенной разности. Однако принцип метода остается тем же — использование гидросульфита для обнаружения активности внеклеточных почвенных нитрат- и нитритредуктаз. Оценка активности этих ферментов и условий ее проявления в почве является важной предпосылкой разработки регулирования биохимических превращений азота в почве с целью уменьшения или устранения его непроизводительных потерь в результате ферментативных процессов денитрификации и нитратного дыхания. Использование данных методов, но с дополнительной доработкой для конкретно изучаемых почв целесообразно опробовать также для почвенных исследований при изучении биологических механизмов глееобразования и содового засоления, так как, по литературным данным, нитратредуктазы принимают участие в восстановлении

Fe [17, 22] и являются одной из причин происхождения соды [3]. Нитритредуктазы наряду с нитратредуктазами участвуют в образовании соды в ходе биохимического восстановления нитратов [3].

Литература

1. Борисова Н. И. Спектрофотометрический метод определения нитратов в почве. Агрохимия, 1968, № 8.
2. Всесоюзное научно-методическое совещание по применению стабильного изотопа азота ^{15}N в исследованиях по агрохимии, почвоведению, сельскохозяйственной микробиологии и физиологии растений. Тез. докл. Ташкент, 1974.
3. Галстян А. Ш. Ферментативная активность почв Армении, вып. VIII. Ереван, 1974.
4. Галстян А. Ш., Маркосян Л. В. Определение активности нитратредуктазы почвы. Докл. АН АрмССР, 1966, т. 43, № 3.
5. Галстян А. Ш., Саакян Э. Г. Метод определения активности нитритредуктазы почвы. Докл. АН АрмССР, 1970, т. 50, № 2.
6. Доспехов Б. А. Методика полевого азота. «Колос», 1973.
7. Ильина Т. К. Ферментные системы микроорганизмов, участвующие в восстановлении нитратов. Агрохимия, 1973, № 6.
8. Ильина Т. К., Ходакова Р. Н. Изучение химизма денитрификации у спороносных почвенных бактерий. Микробиология, 1976, т. XLV, вып. 3.
9. Смирнов П. М. Превращение азотных удобрений в почве и их использование растением. Автореф. дис. М., 1970.
10. Шершукова Г. А., Павлова Т. И. Элементарные структуры почвенного покрова целинных дерново-подзолистых почв Смоленско-Московской и Вологодской возвышенностей. Бюл. Почв. ин-та им. В. В. Докучаева, вып. 8, 1975.
11. Garrett R. H., Nason A. Involvement of *b*-type cytochrome in the assimilatory nitrate reductase of *Neurospora crassa*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1967, v. 58, № 4.
12. Gray C. T., Jacobs N. J., Ely S. A new cytochrome *b*-like pigment with a peak at 567 m μ and a low redox potential in denitrifying bacteria. Biochim. et biophys. acta, V. Bioenergetics, 1973, v. 325, № 1.
13. Hori K. Electron transporting components participating in nitrate and oxygen respiration from a halotolerant *Micrococcus*. III. The pathways of electron transfer. J. Biochem., 1963, v. 53, № 5.
14. Kuronen T., Ellfolk N. A new purification procedure and molecular properties of *Pseudomonas* cytochrome oxidase. Biochim. et biophys. acta, 1972, v. 275, № 3.
15. Marques E. D., Brodie A. F. The effect of cations on the heat stability of a halophilic nitrate reductase. Biochim. et biophys. acta E. Enzymology, 1973, v. 321, No. 1.
16. Nason A. Symposium on metabolism of inorganic compounds. II. Enzymatic pathways of nitrate, nitrite and hydroxylamine metabol. Bacteriol. Revs, 1962, v. 26, No 1.
17. Ottow J. C. G. Bacterial mechanisms of iron reduction and gley formation. Pseudogley and Gley. Weinheim/Bergstr., 1973.
18. Vangnai S., Klein D. A. A study of nitrite-dependent dissimilatory microorganisms from Oregon soils. Soil Biol. Biochem., 1974, v. 6, No 5.
19. Woldendorp J. W. The influence of living plants on denitrification. Mededelingen van de Landbouwhogeschool te Wageningen, Nederland, 1963, v. 63 (13).
20. Yamanaka T. Identity of *Pseudomonas* cytochrome oxidase with *Pseudomonas* nitrite reductase. Nature, 1964, v. 204, № 4955.
21. Yamanaka T., Ota A., Okunuki K. A nitrite reducing system reconstructed with purified cytochrome components of *Pseudomonas aeruginosa*. Biochim. et biophys. acta, 1961, v. 53, № 2.
22. Yasuo T., Yochi U. Nitrification and denitrification in the surface layer of submerged soil. Part I. Oxidation—reduction condition nitrogen transformation and bacterial flore in the surface and deeper layers of submerged soils. Abstr. Soil Sci. and Plant Nutr., 1974, v. 20, № 4.

Почвенный институт
им. В. В. Докучаева

Дата поступления
3.V.1977 г.

T. K. ILYINA, V. V. NEGRU - VODE, E. S. VASILENKO

ACTIVITY OF DISSIMILATION EXTRACELLULAR NITRATE- AND NITRITE-REDUCTASES IN SOIL

Methods for determination of dissimilation nitrate-reductases and nitrite-reductases in the soil have been worked out. Both reductases show their specific activity, irrespective of the vital activity of microorganisms reducing nitrates and nitrites. The investigations have been carried out with a soddy-non-deep podzolic loamy soil.