

33. **Протопопова В. В.** Адвентивні рослини Лісостепу і Степу України / В. В. Протопопова. – К., 1973. – 192 с.
34. **Протопопова В. В.** Синантропная флора Украины и пути ее развития / В. В. Протопопова. – К., 1991. – 204 с.
35. **Работнов Т. А.** Экология луговых трав / Т. А. Работнов. – М., 1976. – 176 с.
36. **Серебряков И. Г.** Жизненные формы высших растений и их изучение / И. Г. Серебряков // Полевая геоботаника. – Т. 3. – М. – Л., 1964. – С. 146–208.
37. **Стецюк Н. О.** Флористична, ценологічна та созологічна характеристика пониззя р. Ворскли: автореф. дис. ... канд. біол. наук / Н. О. Стецюк / Ін-т ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України. – К., 1997. – 24 с.
38. **Сукачев В. Н.** О внутривидовых отношениях в растительном мире / В. Н. Сукачев // Бюлл. МОИП. – Отд. Биологии. – 1956. – Т. 61. – Вып. 2. – С. 5–19.
39. **Травлев А. П.** Опыт детализации структурных компонентов лесного биогеоценоза в степи / А. П. Травлев // Біогеоценологічні дослідження на Україні / Дніпропетров. держ. ун-т. – 1973. – С. 38–41.
40. **Травлев А. П.** Типология степных лесов и лесное почвообразование (к 50-летию Комплексной экспедиции ДНУ) / А. П. Травлев, Н. А. Белова, Л. П. Травлев // Питання степового лісознавства та лісової рекультивації земель / Дніпропетров. нац. ун-т імені Олеся Гончара. – 2004. – Вип. 8 (33). – С. 4–13.
41. **Якубенко Б. Є.** Природні кормові угіддя Лісостепу України: флора, рослинність, динаміка, оптимізація: автореф. дис. ... докт. біол. наук / Б. Є. Якубенко. – К., 2007. – 47 с.
42. **Якубенко Б. Є.** Флористичний аналіз природних кормових угідь Лісостепу України / Б. Є. Якубенко // Науковий вісник Національної академії України. – К., 2002. – Вип. 50. – С. 55–65.

*Надійшла до редколегії 05.04.2012.*

УДК 631.42

**Н. Ф. Павлюкова**

*Днепропетровский национальный университет им. Олеся Гончара*

### **КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ АКТИВНОСТИ ПОЧВЕННЫХ ФЕРМЕНТОВ АЗОТНОГО ОБМЕНА В УСЛОВИЯХ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ГОРОДСКОЙ СРЕДЫ**

**Вивчені кількісні показники, які відображають кінетику активності ферментів азотного обміну та особливості впливу промислового забруднення на ці показники. Установлено залежність кінетичних параметрів ферментів уреазы і нітритредуктази від кількісного і якісного складу промислових інгредієнтів.**

*Ключові слова:* ферменти, інгредієнти, кінетичні параметри ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ).

**Изучены количественные показатели, изображающие кинетику активности ферментов азотного обмена и особенности влияния промышленного загрязнения на эти показатели. Установлена зависимость кинетических параметров ферментов уреазы и нитратредуктазы от количественного и качественного состава промышленных ингредиентов.**

*Ключевые слова:* ферменты, ингредиенты, кинетические параметры ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ).

**Learning of quantitave metrics, which reflect kinetica of activity enzymes of nitric exchange and features of influnce of indystrial pollution on these metrics. Dependence of**

**kinetic parameters of enzymes ureasa and nitrat-reductase from compositions of industrial components is established.**

*Key words:* enzymes, pollution, kinetica metrics ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ).

Процессы превращения азота и его соединений в почве составляют одно из центральных звеньев почвенного метаболизма. Это связано с исключительной ролью азота в функционировании биосферы, живых её компонентов, и в почвообразовании [6]. Особого внимания заслуживает изучение почвенных ферментов, определяющих направленность и интенсивность биологических процессов в почве. Ферменты в почве действуют в сложной среде, и для их характеристики приложимы законы ферментативных реакций в гетерогенных системах [3].

При исследовании механизма ферментативного катализа в энзимологии широко применяются кинетические методы – это определение скорости ферментативной реакции в зависимости от различных факторов – температуры, pH, концентрации фермента и субстрата, ингибиторов, адсорбции ферментов. Кинетический подход, состоящий в количественном описании протекания метаболической реакции на основе молекулярных представлений и законов химической кинетики, является перспективным и для изучения ферментативной активности почвы. Кинетические параметры ферментативных процессов в почве характеризуют состояние ферментов в ней и влияние окружающих условий, в которые они поступают, стабилизируются и функционируют.

Выполненные кинетические исследования ферментативной активности почв позволяют утверждать о реальности применения методов классической стационарной кинетики для описания энзиматических процессов в почве и познания механизма действия почвенных ферментов [1].

К наиболее фундаментальным кинетическим константам химии ферментов относятся константа Михаэлиса –  $K_m$  и максимальная скорость ферментативной реакции –  $V_{max}$ . Эти характеристики ферментативной кинетики в почве позволяют выявить характер влияния различных факторов на отдельные стадии ферментативных реакций. Применение кинетических принципов анализа может явиться теоретическим фундаментом для определения вероятности, направления, устойчивости почвенно-биохимических процессов трансформации азота, конечной целью которых является рациональное использование азота почвы, удобрений и оценка плодородия [5].

Как один из перспективных методов изучения ферментативной активности почвы, кинетический метод используется в данной работе для определения влияния промышленного загрязнения на активность ферментов азотного обмена.

**Материалы и методы исследований.** Исследования проводились на пробных площадях, заложенных в пределах границ городской застройки Днепропетровска и Днепродзержинска, где сосредоточены предприятия химической и металлургической промышленности.

Для изучения степени влияния антропогенной нагрузки на биохимическую активность почв г. Днепропетровска выделены пробные площади в районах города с допустимым, низким, умеренным, высоким и очень высоким уровнем загрязнения, охватывающие как жилые районы, так и районы промышленных предприятий. Одна пробная площадь выбрана в г. Днепродзержинске. Пробы отбирались в районе ДПО «Азот», где преобладали выбросы, содержащие азот.

На каждой пробной площади отбирали по два варианта почвенных образцов в поверхностном слое почвы (0–10 см). Вариант А – почва под газонами, с большой плотностью корневых систем газонных трав; пробы отбирались с открытых участков, без древесно-кустарниковой растительности и листового опада.

Вариант Б – почвы, которые подвергаются интенсивной рекреационной нагрузке (вытаптыванию), без травяного покрова и листового опада.

Методы определения активности уреазы (мг аммиака, который образовался, на 1 г навески за 1 мин), определяли по содержанию аммиака с использованием реактива Несслера. Метод определения активности нитратредуктазы почвы (мг  $\text{NO}_3^-$  / 1 г за сутки) почв основан на учете остаточного количества невосстановленных нитратов после их взаимодействия с почвой [8]. Определения  $V_{\max}$  (максимальная скорости и константы Михаэлиса ( $K_m$ ) по методике Ф. Х. Хазиева [7]. Полученные результаты обрабатывались статистично ( $p < 0,05$ ) [4].

**Результаты и их обсуждение.** При изучении ферментативных процессов, как правило, определяют ряд параметров, характеризующих кинетику образования продуктов реакции: константу Михаэлиса, максимальную скорость ферментативной реакции. Такие показатели вполне приемлемы и для описания почвенных энзиматических процессов, что особенно важно для количественной оценки изменений активности ферментов, вызванных антропогенными факторами.

Известно, что скорость ферментативной реакции непостоянна во времени. Обобщая исследования многих авторов, Э. Корниш-Боуден [2] показывает, что кинетическая кривая ферментативной реакции состоит из трех участков, четко разграниченных во времени: на первом этапе прохождения ферментативной реакции скорость её резко увеличивается и достигает максимальных значений; на втором этапе (участок «плато» на графике) – величина скорости некоторое время остается неизменно высокой и соответствует «начальной скорости» реакции; на третьем этапе – резкое падение скорости.

В случае почвенных ферментов сохраняется наличие трех фаз процесса, однако наблюдаются более длительные интервалы времени протекания каждого из трех периодов.

Проведенное нами изучение активности ферментов азотного обмена на участках с различной степенью загрязнения показало, что на участке с повышенным фоном азотсодержащих соединений в почве (район производства ДПО «Азот») наблюдаются изменения в ходе ферментативных процессов, особенно четко выраженные для уреазы и нитратредуктазы.

Поэтому изучение кинетических показателей ферментов уреазы и нитратредуктазы проводили в почвах двух вариантов пробной площади №4, различающихся уровнем биологического потенциала и рекреационной нагрузки.

Для изучения кинетики ферментативного процесса, прежде всего, необходимо определить оптимальные экспозиции времени, при которых скорость реакции максимальна, и, таким образом, соответствует «начальной скорости» процесса.

В ходе модельного эксперимента определены экспозиции времени для измерения начальной скорости реакции. Результаты, отражающие ход временной зависимости скорости реакции уреазы и нитратредуктазы, представлены в табл. 1.

*Таблица 1*

**Временной ход скорости ферментативных реакций уреазы и нитратредуктазы**

| Экспозиция времени, t | Уреазы                        |                              | Нитратредуктаза                                     |  |
|-----------------------|-------------------------------|------------------------------|---|--|
|                       | Активность фермента, мг N/г t | Скорость реакции, мг N/г час | Активность фермента, мг восст. $\text{NO}_3^-$ /г t | Скорость реакции, мг восст. $\text{NO}_3^-$ /г час |
| 20 мин                | 0,186                         | 0,558                        | 3,72  | 11,16  |
| 40 мин                | 0,078                         | 0,116                        | 3,46  | 5,19   |
| 1 час                 | 0,141                         | 0,141                        | 3,42  | 3,42   |
| 2 час                 | 0,192                         | 0,095                        | 3,39  | 1,70   |
| 4 час                 | 0,720                         | 0,179                        | 3,46  | 0,86   |
| 6 час                 | 0,445                         | 0,074                        | 3,36  | 0,56   |

Полученные кривые скорости реакции сходны для двух ферментов и имеют выраженный максимум, соответствующий экспозиции 20 мин. Выявленные экспериментальным путем экспозиции времени, для которых характерна максимальная скорость реакции, использованы при определении величины  $V_{\max}$  и  $K_m$  ферментативных реакций уреазы и нитратредуктазы.

Величина  $V_{\max}$  – это максимальная скорость реакции, которая не лимитируется концентрацией субстрата ( $S$  – в избытке), а определяется лишь наличием фермента в системе, его доступностью субстрату и скоростью распада фермент-субстратного комплекса.  $V_{\max}$  наряду с  $K_m$  является важнейшей характеристикой ферментативных процессов.

В таблицах 2 и 3 представлена субстратная зависимость скорости ферментативных реакций для двух вариантов.

Таблица 2

**Субстратная зависимость скорости ферментативной реакции уреазы**

| Концентрация субстрата | Начальная скорость реакции, мг N/г час |           |
|------------------------|--|-----------|
|                        | Вариант А                              | Вариант Б |
| 10 мг/мл. (0,2M)       | 0,54                                   | 0,12      |
| 50 мг/мл. (0,8M)       | 1,31                                   | 0,52      |
| 100 мг/мл. (1,7M)      | 1,27                                   | 0,43      |
| 150 мг/мл. (2,5M)      | 1,39                                   | 0,74      |
| 200 мг/мл. (3,3M)      | 1,54                                   | 0,65      |
| 250 мг/мл. (4,2M)      | 1,36                                   | 0,68      |

Таблица 3

**Субстратная зависимость скорости ферментативной 2 реакции нитратредуктазы**

| Концентрация субстрата | Начальная скорость реакции, мг восст. $\text{NO}_3/\text{г час}$ |           |
|------------------------|--|-----------|
|                        | Вариант А  | Вариант Б |
| 2 мг/мл. (0,01M)       | 1,68   | 2,52      |
| 5 мг/мл. (0,05M)       | 6,62   | 3,95      |
| 10 мг/мл. (0,10M)      | 8,81   | 10,6      |
| 15 мг/мл. (0,15M)      | 9,63   | 15,6      |
| 20 мг/мл. (0,20M)      | 13,3   | 16,2      |
| 25 мг/мл. (0,25M)      | 11,25  | 22,25     |

Предварительное изучение данных, представленных в таблицах, свидетельствует о существенных изменениях процессов азотного обмена в различных экологических условиях, имеющих противоположную направленность. Начальная скорость уреазы уменьшалась в варианте Б, нитратредуктазы – в варианте А.

Данные по субстратной зависимости скорости ферментативной реакции можно представить в виде графиков (рис. 1 и 2).

Полученные кривые субстратной зависимости отражают изменения кинетики ферментативных процессов для вариантов А и Б. Кроме того, можно отметить, что для каждого фермента в вариантах А и Б характерны свои особенности хода ферментативной реакции. Для уреазы происходит достаточно быстрое насыщение субстратом (при концентрации 100 мг/мл). Такая же концентрация используется и для определения фона уреазной активности. Для нитратредуктазы насыщение субстратом происходит при значительно больших концентрациях, чем мы использовали в эксперименте, о чем говорит пологий профиль кривых. Для определения фона нитратредуктазной активности мы используем концентрацию субстрата, значительно меньшую от насыщающей (10 мг/мл.). Поэтому необходимо внести коррективы в методические приемы определения активности нитратредуктазы.

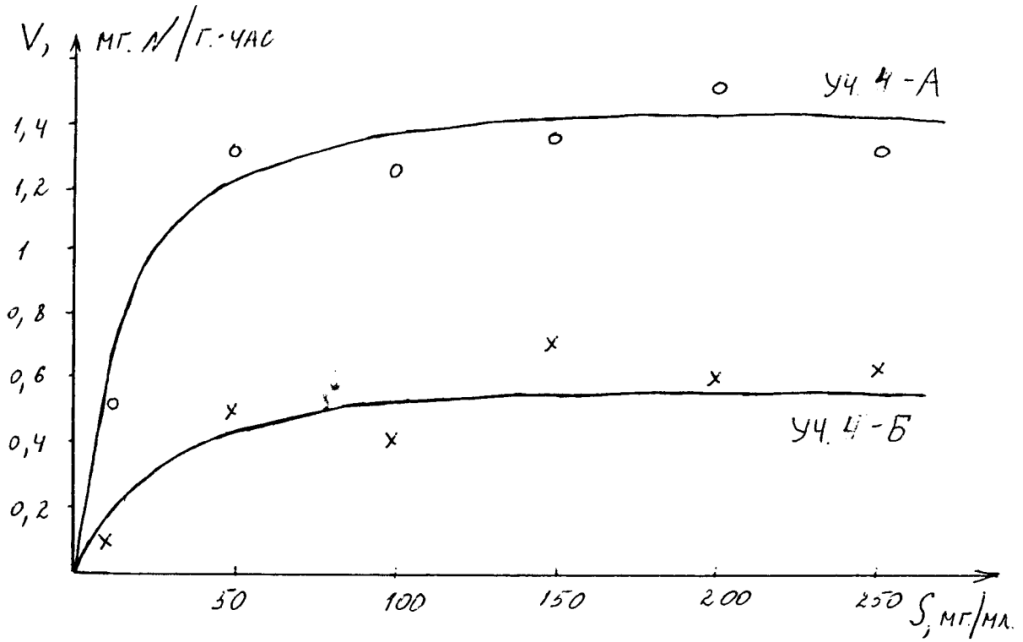


Рис. 1. Субстратная зависимость начальной скорости уреазы

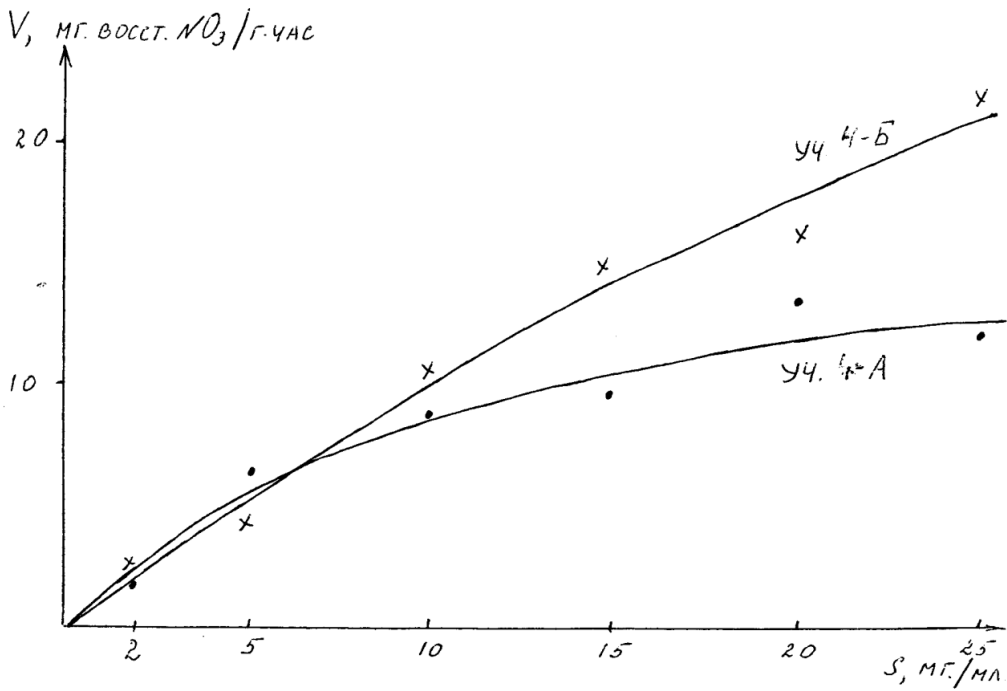


Рис. 2. Субстратная зависимость начальной скорости нитратредуктазы

Для наглядного представлення изменений кинетических показателей активности уреазы и нитратредуктазы целесообразно использовать сравнительную диаграмму (рис. 3 и 4). Для того, чтобы можно было сравнить величины, имеющие разные размерности и порядок, значения кинетических констант выразили в условных единицах. Значения констант для варианта А принимали за единицу, а значения констант варианта Б относили к этой условной единице. Снижение  $K_m$  практически в два раза в варианте А для ферментов уреазы и нитратредуктазы свидетельствует об активации ферментативного процесса, так как кривая процесса приобретает большую крутизну, это, вероятно, может происходить вследствие увеличения константы  $K_{+1}$  – образования фермент-субстратного комплекса. Активация фермента уреазы в варианте А подтверждается и повышенным в два раза значением  $V_{max}$ , в то время как для нитратредуктазы  $V_{max}$  варианта А вдвое ниже по сравнению с вариантом Б.

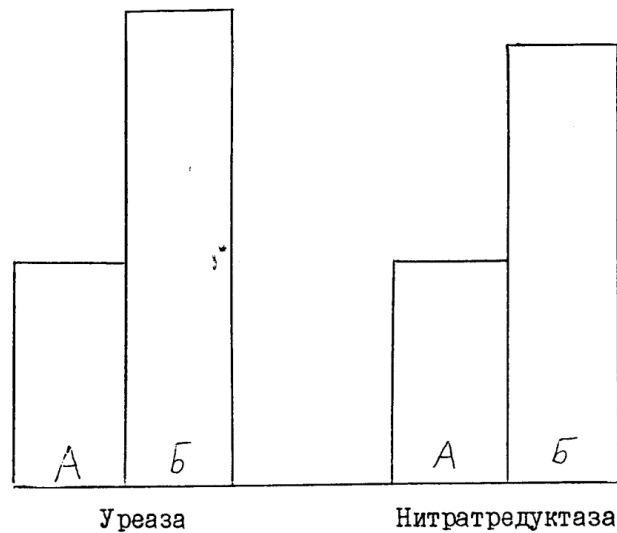


Рис. 3. Сравнительная диаграмма величины константы Михаэлиса

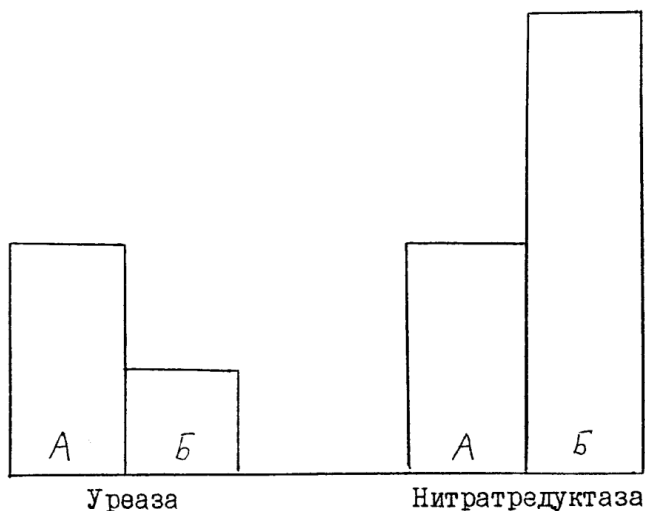


Рис. 4. Сравнительная диаграмма величины максимальной скорости ферментативной реакции

Таким образом, наличие в почве корневых систем растений, которые создают повышенный фон биологической активности почв, приводит к активации процессов аммонификации, направленных на перевод органических азотсодержащих соединений в доступный для растений ион  $\text{NH}_4^+$ . Эти процессы создают более благоприятный питательный режим почвы.

Для нитратредуктазы, в этих же условиях, характерно снижение показателей  $V_{\text{max}}$  и  $K_m$  по сравнению с вариантом Б, что говорит о некотором угнетении процессов денитрификации. Это замедляет потери  $\text{NO}_3$  из почвы, что также оказывает положительное влияние на минеральное питание растений.

Почвы с низким биологическим потенциалом, подвергающиеся усиленной рекреационной нагрузке, характеризуются повышенным значением  $K_m$  уреазы и нитратредуктазы и  $V_{\text{max}}$  нитратредуктазы это говорит о подавлении аммонификации и некоторой активации денитрификации, а следовательно, ухудшении питательного режима почв.

**Выводы.** 1. Интенсивность процессов аммонификации и денитрификации зависит от количественного и качественного состава промышленных ингредиентов: наблюдается стимуляция этих процессов в присутствии азотсодержащих выбросов, угнетение в условиях промышленного загрязнения. Минимальная активность проявляется под влиянием выбросов металлургического и машиностроительного заводов по сравнению с контрольным участком.

2. При анализе кинетических констант ферментов уреазы и нитратредуктазы в разных экологических условиях наблюдали снижение  $K_m$  для обоих ферментов, увеличение в два раза значения  $V_{\text{max}}$  для уреазы и уменьшения значения  $V_{\text{max}}$  для нитратредуктазы в варианте с травяным покровом по сравнению с почвой, испытывающей рекреационную нагрузку. Это свидетельствует об активации процессов аммонификации и некотором угнетении процессов денитрификации в почвах с высоким биологическим потенциалом, что оказывает влияние на питательный режим почв.

### Бibliографические ссылки

1. **Зайцева И. А.** Кинетические характеристики почвенных фосфатаз под действием ксенобиотиков / И. А. Зайцева // Материалы международной конференции «Экология почв». – 2004. С. 123–126.
2. **Корниш-Боуден Э.** Основы ферментативной кинетики / Э. Корниш-Боуден. – М., 1989. – 265 с.
3. **Кузнецов К. Л.** Ферменты в почве / К. Л. Кузнецов. – М., 1993. – С. 115–125.
4. **Лакин Г. Ф.** Биометрия / Г. Ф. Лакин. – М., 1990. – 293 с.
5. **Хазиев Ф. Х.** Константы Михаэлиса почвенных ферментов / Ф. Х. Хазиев, Я. М. Агафарова // Почвоведение. – 1979. – № 8. – С. 150–157.
6. **Хазиев Ф. Х.** Ферментативный путь превращения азота в почве / Ф. Х. Хазиев, Я. М. Агафарова, Н. А. Киреева // Экология и физиолого-биохимические основы микробиологического превращения азота. – 1982. – С. 333–339.
7. **Хазиев Ф. Х.** Ферментативная активность почв / Ф. Х. Хазиев. – М., 1990. – С. 147.
8. **Яковлев А. С.** Биологическая диагностика и мониторинг состояния почв / А. С. Яковлев // Почвоведение. – 2000. – № 1. – С. 51–52.

*Надійшла до редколегії 12.03.2012.*