

УДК 579.26

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ И КРАТКОВРЕМЕННЫХ ЗАСУХ НА ГИДРОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ СЕРОЙ ПОЧВЫ

© 2023 г. А. В. Якушев^а, *, А. И. Журавлева^б, И. Н. Кузнецова^с^аМГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия^бИнститут физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН,
ул. Институтская, 2, Пушкино, 142290 Россия^сООО “Агро-С”, ул. Шишкова, 2г, Воронеж, 394049 Россия

*e-mail: a_yakushev84@mail.ru

Поступила в редакцию 16.10.2022 г.

После доработки 06.02.2023 г.

Принята к публикации 07.02.2023 г.

Трансформация органического вещества в почве во многом определяется гидролитическими ферментами. В условиях климатических изменений особое значение имеет понимание механизмов микробного отклика для прогнозирования цикла углерода. До сих пор мало изучалось влияние продолжительности и частоты засухи на гидролитические ферменты почвы. Проведен многофакторный полевой манипуляционный эксперимент, моделирующий в присутствии растений и без них: две кратковременные засухи, длительную засуху и оптимальный уровень увлажнения почвы. Определяли максимальную скорость реакции V_{\max} , константу Михаэлиса K_m и каталитическую эффективность K_a пяти групп ферментов, участвующих в цикле углерода (целлюбиазы, глюкозидазы, ксиланазы), фосфора (фосфатазы) и азота (хитиназы). У фосфатаз, глюкозидаз и ксиланаз V_{\max} снижалось при кратковременной засухе. В ходе длительной засухи снижалось значение V_{\max} фосфатаз, целлюбогидролаз, ксиланаз и возрастало у хитиназ, оставаясь при этом неизменным у глюкозидаз. Как длительная, так и кратковременные засухи приводили к увеличению K_m и уменьшению K_a почти для всех ферментов. Кратковременные засухи не являлись ослабленным вариантом длительной засухи, но имели свою специфику – снижение у глюкозидаз K_m , которое приводило к увеличению K_a . Длительная засуха отличалась увеличением V_{\max} хитиназ и пространственной вариативности V_{\max} фосфатаз и глюкозидаз. Влияние присутствия растений было второстепенным и сказывалось только при коротких засухах. Обратимость действия засухи на V_{\max} , K_m , K_a уменьшалась в ряду: первая кратковременная засуха > вторая кратковременная засуха > длительная засуха – за счет увеличения общей продолжительности стрессового воздействия.

Ключевые слова: почвенная засуха, почвенные ферменты, кинетика Михаэлиса–Ментен, каталитическая эффективность ферментов

DOI: 10.31857/S0032180X2260130X, **EDN:** FPMQMO

ВВЕДЕНИЕ

В условиях наблюдаемого изменения климата возрастает количество и продолжительность различных экстремальных явлений: пожаров, ветров, засух, ливней, наводнений и т.д. Ряд климатических моделей предсказывают увеличение частоты и продолжительности засушливых периодов во многих регионах мира в будущем [11].

Почвенные микроорганизмы продуцируют широкий спектр ферментов, которые могут находиться в разном состоянии [3]. Внеклеточные ферменты катализируют реакции превращения сложных С-содержащих полимеров растительного происхождения на биодоступные соединения, которые стимулируют метаболизм и дыхание почвенных микроорганизмов [4]. Прямое воздей-

ствие на микробную активность оказывают такие климатические характеристики, как влажность и температура, которые изменяют диффузию, скорость реакций и осмотический потенциал [24]. Температура и влажность определяют состав растительных сообществ, их продуктивность, что косвенно влияет на биологическую почву.

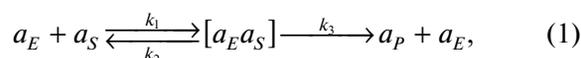
Доступность влаги определяет жизнеспособность и функционирование почвенных микроорганизмов. Кроме того, вода в почве является растворителем большинства веществ, потребляемых микроорганизмами. Сильный дефицит влаги приводит к возникновению осмотического стресса и лизису клеток, вызывая гибель микроорганизмов. Косвенно засушливые условия изменяют физиологическое состояние почвенных микро-

организмов и их ферментативную активность [6]. Метаболический отклик на экстремальный дефицит воды зависит от доступности субстрата [29]. Внеклеточные ферменты имеют небольшой размер и находятся в тесном контакте с субстратом, поэтому для функционирования им требуются более тонкие водные пленки и мелкие заполненные водой поры, по сравнению с крупными микробными клетками [24].

Действие засухи проявлялось в снижении активности гидролитических ферментов [24], однако исследователями показано увеличение активности лейцинаминопептидазы, контролирующей гидролиз белков и участвующей в почвенном цикле азота, в варианте с растениями, что указывало на потребность в азоте в условиях засухи. В этой работе авторы сообщают и об отрицательном влиянии или отсутствии влияния засухи на активность ферментов цикла углерода в почве с растениями. Такой парадокс можно объяснить сложным сочетанием ряда факторов таких, как сезон года, длительность засухи, интенсивность осадков, устойчивость растений, изменчивость почвенных и микробных свойств.

В последнее время для характеристики энзиматической активности в почве все чаще применяют классическую модель ферментативной кинетики Михаэлиса—Ментен. Данная модель в большинстве случаев удовлетворительно объясняет связь между скоростью ферментативной реакции и концентрацией доступного субстрата в почве [30].

Модель имеет вид:



где a_E — химическая активность ферментов, a_S — химическая активность ферментов, a_P — химическая активность продуктов реакции, k_1, k_2, k_3 — константы скоростей химических реакций. Само уравнение

Михаэлиса—Ментен имеет вид: $V(a_s) = \frac{V_{\max} a_s}{a_s + K_m}$, где

$V_{\max} = k_3 a_E$ — максимальная скорость реакции, катализируемой ферментом при условии полного насыщения активных центров ферментов суб-

стратом реакции, $K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$ — константа Миха-

элиса, численно равная концентрации субстрата, при которой скорость реакции равна $0.5V_{\max}$ [17, 19]. K_m характеризует степень сродства фермента к субстрату [20] — чем меньше величина K_m , тем выше устойчивость фермент-субстратного комплекса и эффективнее фермент связывается с субстратом [7, 20]. Ферменты, катализирующие одну и ту же реакцию в почве, но имеющие разное происхождение, характеризуются разными значениями K_m [22]. Продemonстрировано, что ферменты микро-

организмов с разной экологической стратегией характеризуются разными величинами K_m [14, 21]. Окультуривание лесных почв, пастбищ и засоленных пустынных почв увеличивало K_m у целлюлазы, но уменьшало значение V_{\max} [13]. Основываясь на результатах предыдущих наблюдений, можно заключить, что кинетические параметры ферментативных реакций V_{\max} и K_m высоко чувствительны к сезонным колебаниям свойств почв [9, 10, 20, 28].

Наиболее реалистично скорость протекания процессов в почве характеризует каталитическая эффективность $K_a = V_{\max}/K_m$ [21, 30]. $K_a = \frac{k_1 k_3 a_E}{k_2 + k_3}$, которая позволяет оценить константу скорости реакции в ненасыщенных субстратом условиях, характерных для большинства почв: при $a_s \rightarrow 0$, $V(a_s) \rightarrow K_a a_s$. Исследователями продемонстрировано, что на K_a сильно влияют физико-химические свойства почвы и доступность субстрата [8].

В работе основное внимание уделялось определению кинетических параметров ферментов в ходе засух и увлажнения почвы для оценки интенсивности стресса и степени восстановления ферментативной активности до уровня исходных значений.

Рабочие гипотезы заключались в следующем:

1. В условиях микрополевого эксперимента циклы высушивания—увлажнения приводят к увеличению пространственной изменчивости кинетических параметров почвенных ферментов из-за неоднородности увлажнения и иссушения почвы, возникновения зон повышенной ферментативной активности возле отмерших корней и погибших почвенных животных. Для того, чтобы проверить эту гипотезу, сравнили коэффициенты вариации (CV) для кинетических параметров до, после и во время засухи.

2. Ферменты одной группы, которые участвуют в цикле углерода (целлюбиогидролазы, ксиланазы и β -глюкозидазы), будут реагировать аналогичным образом на высушивание—увлажнение. Для проверки этой гипотезы провели корреляционный анализ.

3. Присутствие растений в большей степени будет влиять на кинетические параметры ферментов при длительной засухе, в основном за счет гибели растений. Это приведет к высвобождению растительных ферментов в почве и всплеску микробной ферментативной активности на свежих растительных остатках.

Изучали влияния засух и увлажнения на кинетические параметры гидролитических ферментов в почве под луговой растительностью и в парующей почве. Цели работы заключались в оценке изменчивости V_{\max} и K_m в почве, подвергшейся

высушиванию—увлажнению; степени влияния засухи на V_{\max} и K_m ; скорости восстановления ферментативного комплекса почвы после повторного увлажнения.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Описание эксперимента и отбор проб почвы. Модельный опыт был заложен в 2021 г. на полевых опытных участках Института физико-химических и биологических проблем почвоведения (г. Пушкино Московской области, 54°50' N, 37°36' E) на серой почве (Haplic Luvisol по WRB). Экспериментальный участок был разделен на 48 делянок (1 × 1 м). 24 делянки засеяны мятликом луговым, остальные оставлены под черным паром. В пределах каждой делянки образцы гумусово-аккумулятивного горизонта отбирали в 4 точках, а затем в них определяли содержание влажности и ферментативную активность как в четырех отдельных повторностях. Над всеми опытными площадками была установлена прозрачная крыша для предотвращения попадания атмосферных осадков на почву. По ходу эксперимента проводили имитацию следующих условий:

1. Поддержание оптимального уровня влажности почвы (**ОВ**). Были предусмотрены участки с имитацией осадков в виде дождя 2–3 раза в неделю для поддержания весовой влажности почвы на уровне 20–25% на луговых участках и 17–20% — под паром (что примерно соответствовало 60–70% от предельной полевой влагоемкости (наименьшей влагоемкости) для исследуемых почв. Сумма осадков составила 98 мм, что соответствует метеоданным, собранным за это же время на юге Московской области.

2. Имитация двух кратковременных сезонных засух (летом и осенью) (**КЗ**). Летняя засуха длилась 30 дней (4.07–3.08), при этом влажность почвы снижалась до 10–14%, затем моделировали сильные дожди 2 раза в сутки с 4 по 8 августа с итоговыми осадками, аналогичными оптимальному режиму увлажнения в соответствующий период засухи. Влажность почвы после полива увеличивалась до 25–30%. Продолжительность осенней засухи составила 48 дней (8.08–23.09), при этом влажность снижалась до 13–18%, с последующими осадками в период 24–27 сентября. Влажность почвы после полива увеличивалась до 27–31%.

3. Имитация длительной засухи (**ДЗ**), которая продолжалась 82 дня (с 3 июля по 23 сентября), что привело к снижению влажности почвы до 3–7%, затем последовали 4-дневные осадки, имитирующие поступление 20 мм воды. Влажность почвы при этом увеличилась до 20–27%.

Для предотвращения боковой миграции почвенных вод участки были отделены друг от друга пластиковыми барьерами, зарытыми в почву до

глубины 30 см. Образцы почв отбирали из верхнего слоя 0–5 см по следующей схеме: 1) перед началом засухи; 2) за один день до повторного увлажнения и 3) через неделю после окончания засухи (данный срок был выбран для того, чтобы микробное сообщество сумело отреагировать на увлажнение почвы). Образцы почвы просеивали влажными через сито диаметром 2 мм, а затем хранили при температуре 4°C до момента проведения анализа не более 7 дней.

Определение кинетических параметров гидролитических почвенных ферментов. Внеклеточную ферментативную активность в почве измеряли с использованием субстратов, меченных флуорохромом — 4-метилумбеллифероном (**МУФ**) [19]. Метод основан на том, что при гидролизе флуорогенно-меченого субстрата образуется флуоресцирующее соединение МУФ, количество которого измеряют флуорометрически. Использование флуорогенно-меченых субстратов позволяет проводить измерение концентрации продукта реакции в одинаковых единицах (нмоль/мл МУФ), что делает возможным сравнение активности ферментов, осуществляющих разные функции в почве. Ранее для серой почвы установлена прямая линейная зависимость между активностью гидролитических ферментов, определенных этим методом и величиной микробной биомассы [1]. Эффективность и скорость разложения органического вещества серой лесной почвы и растительных остатков больше зависели от вида разлагаемого материала, чем от уровней температуры и влажности [2]. Во многих исследованиях оценивают потенциальную активность ферментов, пренебрегая скоростью диссоциации и образования субстрат-ферментного комплекса. Полагаем, что более глубокий анализ с определением кинетических параметров ферментов позволит получить новые оригинальные результаты, описывающие свойства комплекса гидролитических ферментов.

Следует особо указать, что в почве всегда определяем кинетические параметры не одного конкретного фермента, а интегральные значения целой группы родственных ферментов: хитиназ, фосфатаз и т.д. Всего исследовано 5 групп гидролитических ферментов (Fluka, Германия):

β -1,4-глюкозидазы (**ГЛ**), катализирующие гидролиз целлюлозы и целлобиозы до глюкозы;

целлобиазы (β -целлобиогидролазы) (**ЦЕЛ**), участвующие в гидролизе целлобиозы до глюкозы;

хитиназы (N-ацетил-D-глюкозаминидаза) (**ХИТ**), участвующие в гидролизе хитина и пептидогликана муреина;

ксилазазы (**КС**), гидролизующие ксилан до ксилозы;

фосфатазы (**ФОС**), катализирующие гидролиз как сложных эфиров, так и ангидридов фосфорной кислоты.

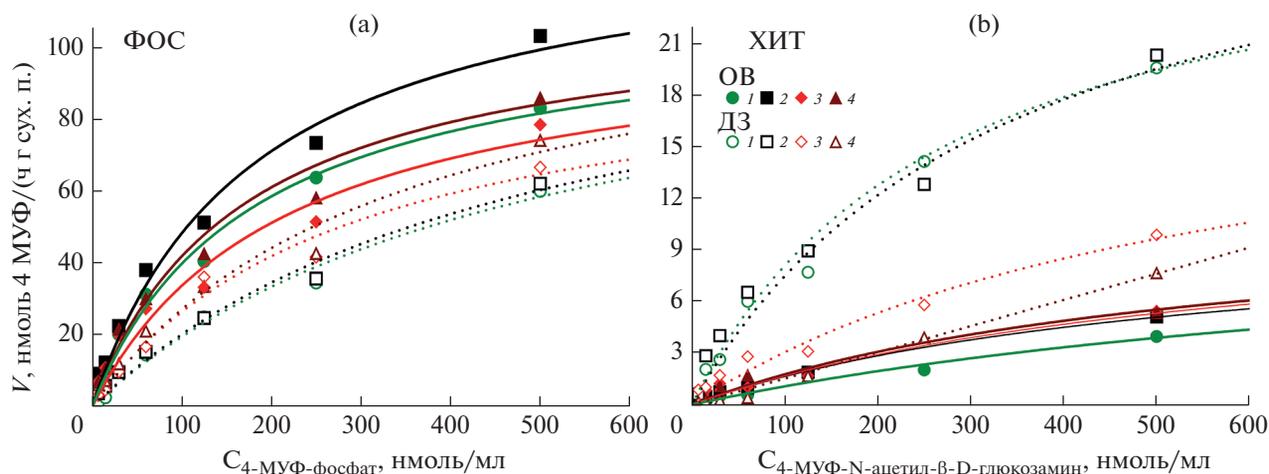


Рис. 1. Примеры кривых насыщения почвенных ферментов фосфатаз (ФОС) (а) и хитиназ (ХИТ) (б) субстратом реакции (вариант опыта без растений). Точки — экспериментальные данные, линии — аппроксимация зависимости согласно модели Михаэлиса–Ментен. 1, 2, 3, 4 — номера повторностей измерения. ОВ — вариант опыта с оптимальным увлажнением почвы, ДЗ — длительная засуха.

В анализе использовали серию концентраций растворов, меченных по МУФ субстратов 0, 7, 15, 30, 60, 125, 250, 500 и 1000 нмоль/мл. Свежую почву массой 1 г помещали в пластиковые флаконы объемом 45 мл, добавляли 20 мл H_2O и встряхивали на горизонтальном орбитальном шейкере в течение 30 мин. Аликвоту почвенной суспензии 50 мкл помещали в 96-луночные черные микропланшеты с добавлением 100 мкл меченных МУФ-субстратов. Планшеты инкубировали в темноте при $22^\circ C$ в течение 1 ч для глюкозидазы и фосфатазы и в течение 3 ч для целлюбиазы, ксиланазы и хитиназы. Интенсивность флуоресценции измеряли с помощью микропланшетного ридера Filter Max F5 (Molecular Devices, США) с длинами волн эмиссии и возбуждения 355 и 460 нм соответственно. Скорость ферментативной реакции выражали в нмоль 4-МУФ/(г ч) [19].

Расчеты кинетических параметров согласно модели ферментативной кинетики Михаэлиса–Ментен проводили с помощью программы Statistica 8.0 методом наименьших квадратов [16, 30]. На рис. 1 приведены примеры кривых насыщения для двух самых контрастных вариантов опыта: контроль и длительная засуха.

В отличие от большинства работ по изучению ферментативной кинетики [16, 30] Михаэлиса–Ментен в почве, полагаем, что K_m следует выражать не как нмоль вещества на г почвы или объем почвы [9] или просто нмоль [19, 32], а как нмоль вещества на объем раствора (на л, мл, мкл и т.д.), как [28] или г/л [14]. Поскольку субстрат во время проведения анализа находится в почвенной суспензии в растворенном виде и никак не привязан к массе почвы. Ошибочный пересчет на грамм почвы приводит к тому, что величина K_m стано-

вится зависимой от степени разведения почвенной суспензии, что неверно. Реакционный раствор следует воспринимать как аналог свободного почвенного раствора. Отметим, что V_{max} следует, как и принято выражать на грамм почвы, так как количество ферментов в реакционной смеси прямо пропорционально связано с массой почвы. Таким образом, предлагаем выражать K_a в нмоль продукта реакции мл/(г почвы ч нмоль субстрата реакции). Эта величина отражает количество продукта ферментативной реакции, произведенного в единицу времени (в расчете на единицу субстрата) в 1 г почвы. В этом случае от степени разведения почвенной суспензии величина каталитической эффективности не зависит, т.е. исходя из вышесказанного, представлять размерность K_a как $ч^{-1}$ [18] неверно.

Статистическая обработка данных. Результаты определения кинетических параметров ферментов статистически обрабатывали в программе Statistica 8.0. Кинетические параметры ферментов определяли с помощью аппроксимации по уравнению Михаэлиса–Ментен отдельно для четырех кривых насыщения — по одной кривой на навеску почвы (рис. 1). Таким образом, на каждый вариант опыта получается по 4 повторности K_m и V_{max} , которые затем подвергаются статистической обработке. Для оценки достоверности и силы влияния засух и присутствия растений на кинетические параметры ферментов проводили отдельно для длительной и коротких периодических засух медианный тест и двухфакторный дисперсионный анализ данных. В качестве факторов дисперсионного анализа выбрали: 1 — стадия засухи (градации фактора: контроль, засуха, после засухи); 2 — присутствие растений на почве (градации:

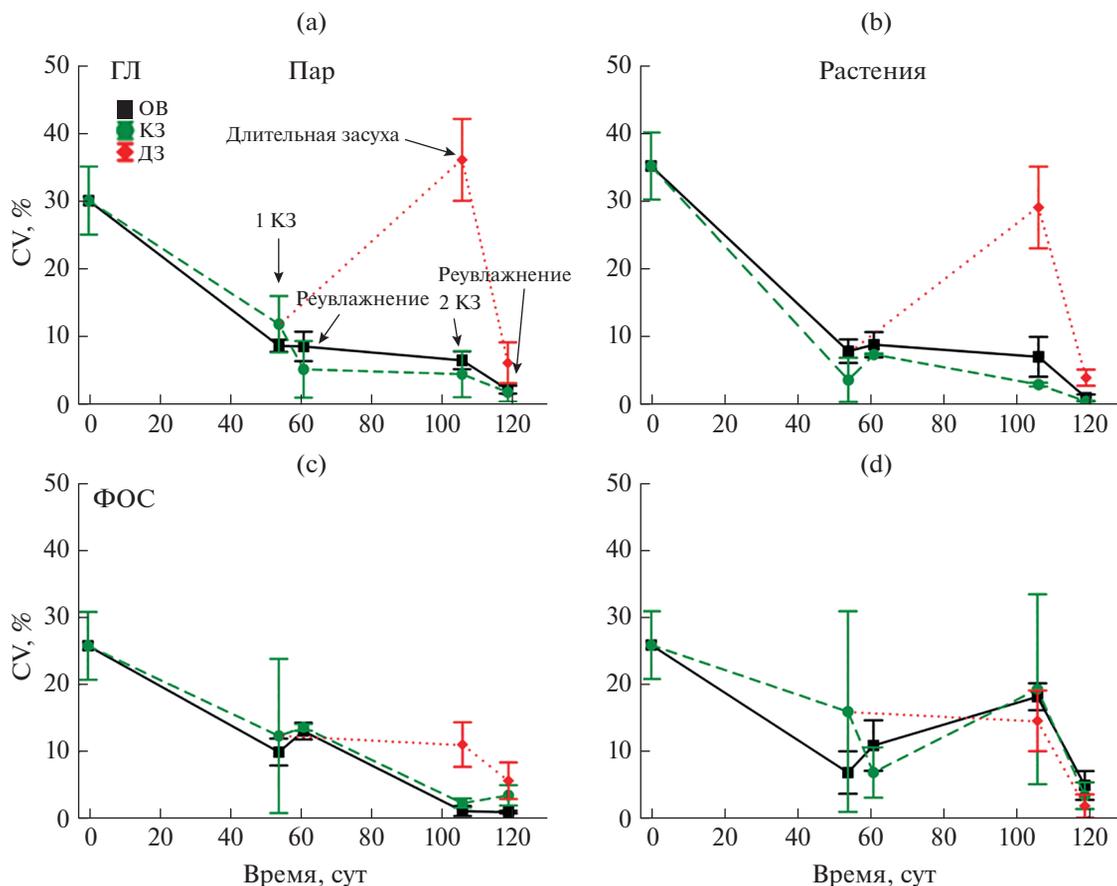


Рис. 2. Динамика значений (точки – среднее арифметическое значение, “усы” – ошибка среднего) коэффициента вариации (CV) для V_{\max} у глюкозидаз (ГЛ) и фосфатаз (ФОС). ОВ – вариант опыта с оптимальным увлажнением почвы, ДЗ – длительная засуха, КЗ – короткая засуха.

растения присутствуют, растения отсутствуют). Медианный тест, как метод непараметрической статистики, позволяет проанализировать параметры распределения частот встречаемости значений в независимости от типа функции распределения. Для оценки пространственной неоднородности ферментативной активности в почве (от навески к навеске почвы) рассчитывали CV. Корреляционный анализ проводили для выявления взаимосвязи между кинетическими параметрами разных групп ферментов. Дискриминантный анализ применяли для оценки изменений ферментативной кинетики как в целом, так и для выявления наиболее характерных черт влияния периодических и длительной засух на кинетические параметры ферментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Пространственная изменчивость кинетических параметров почвенных ферментов. Для K_m не наблюдалось достоверных изменений значений пространственной изменчивости (оцененной по

CV) для всех вариантов опыта. Для V_{\max} в пределах каждой делянки наблюдается снижение CV от начала лета к осени. Короткие засухи не повлияли на CV. При длительной засухе наблюдалось 3–4-кратное увеличение пространственной изменчивости только для глюкозидаз (вариант с растением и без) (рис. 2а, 2б) и фосфатаз (вариант с растениями) (рис. 2д). Удивительно, но присутствие растений, которые благодаря живым и отмершим корням создают в почве локальные зоны повышенной ферментативной активности не повлияло на CV для параметра V_{\max} .

Влияния засухи и присутствия растений на кинетические параметры ферментов. По данным медианного теста (табл. 1) длительная засуха закономерно влияла на V_{\max} для более широкого спектра почвенных ферментов по сравнению с кратковременными засухами. Только 3 группы ферментов (глюкозидазы, фосфатазы и ксиланазы) реагировали на кратковременный стресс снижением V_{\max} , тогда как 4 группы ферментов оказались чувствительными к длительной засухе – снижа-

Таблица 1. Знаки и статистически достоверные величины эффектов (по отношению к контролю) от засух и выхода из засух по данным медианного теста

Фермент	Растения*	Кинетический параметр	КЗ	ДЗ	ПКЗ	ПДЗ
Глюкозидаза	+	V_{\max}	↓9.5	Н.э.	↓1.3	↓1.9
		K_m	↓11.2	Н.э.	Н.э.	Н.э.
	–	V_{\max}	Н.э.	Н.э.	↓4.7	Н.э.
		K_m	↓6.8	Н.э.	↓10.2	Н.э.
Фосфатаза	+	V_{\max}	↓6.4	Н.э.	Н.э.	Н.э.
		K_m	Н.э.	↑2.5	Н.э.	↑1.5
	–	V_{\max}	Н.э.	↓2.2	Н.э.	Н.э.
		K_m	↑6.9	Н.э.	↑2.2	↑3.0
Целлюбиогидролаза	+	V_{\max}	Н.э.	↓6.0	Н.э.	Н.э.
		K_m	Н.э.	↑6.1	Н.э.	Н.э.
	–	V_{\max}	Н.э.	Н.э.	Н.э.	↑2.2
		K_m	↑6.4	↑14.2	Н.э.	↑4.1
Хитиназа	+	V_{\max}	Н.э.	↑1.5	Н.э.	↑4.0
		K_m	Н.э.	↑3.0	Н.э.	↑3.2
	–	V_{\max}	Н.э.	↑3.7	Н.э.	↑2.0
		K_m	↑2.2	↑2.3	Н.э.	Н.э.
Ксиланаза	+	V_{\max}	Н.э.	↓10.8	Н.э.	Н.э.
		K_m	Н.э.	Н.э.	Н.э.	Н.э.
	–	V_{\max}	↓4.0	Н.э.	Н.э.	Н.э.
		K_m	Н.э.	Н.э.	Н.э.	Н.э.

* Наличие растительного покрова.

Примечание. ↑ – достоверное увеличение значений параметра, ↓ – достоверное уменьшение значений параметра, н.э. – нет достоверного эффекта. КЗ – периодическая короткая засуха, ДЗ – длительная засуха, ПКЗ – после периодической засухи, ПДЗ – после длительной засухи.

лась V_{\max} фосфатаз, целлюбиаз, ксиланаз и увеличивалась в 4 раза у хитиназ.

Как длительные, так и кратковременные засухи увеличивали показатель K_m для всех групп ферментов, кроме глюкозидаз, для которых K_m снижался только при кратковременной засухе. После кратковременной засухи кинетические параметры за неделю восстановились до значений, наблюдавшихся в почвах с оптимальным уровнем влажности, за исключением: V_{\max} глюкозидаз и K_m фосфатаз. Сильное последствие длительной засухи выражалось в отличие параметров V_{\max} и K_m глюкозидаз, фосфатаз, целлюбиаз и хитиназ кинетических параметров в контроле в 1.5–3 раза даже через неделю после повторного увлажнения.

Засухи обратимо снижали каталитическую эффективность (K_a) всех исследуемых ферментов, кроме глюкозидаз, для которых, напротив, наблюдалось обратимое 3–4-кратное увеличение K_a (рис. 3а). Присутствие растений было второстепенным и достоверно приводило к увеличению целлюбиазной активности в контрольном варианте опыта (рис. 3с).

Дисперсионный анализ показал, что для параметра V_{\max} влияние засухи вносит вклад от 20 до 55% в общую дисперсию (рис. 4). Влияние растений на V_{\max} было наиболее выражено при кратковременной засухе (20–40% дисперсии), тогда как при длительной засухе влияние растений снижалось и не превышало 20%. На значения K_m циклы высушивания–реувлажнения влияли в меньшей степени, чем на V_{\max} . Присутствие растений влияло на K_m трех ферментов: хитиназы (длительная засуха), фосфатазы и ксиланазы (кратковременная засуха).

Взаимосвязь между кинетическими параметрами разных групп ферментов. Корреляционный анализ кинетических параметров разных групп гидролаз показал, что есть статистически достоверная ($p < 0.05$) положительная корреляция V_{\max} целлюбиогидролаз с хитиназами ($r = 0.42$) и ксиланазами ($r = 0.44$), есть положительная корреляция K_m фосфатаз и хитиназ ($r = 0.43$).

Дискриминантный анализ кинетических параметров ферментов. Дискриминантный анализ кинетических параметров выявил две статистиче-

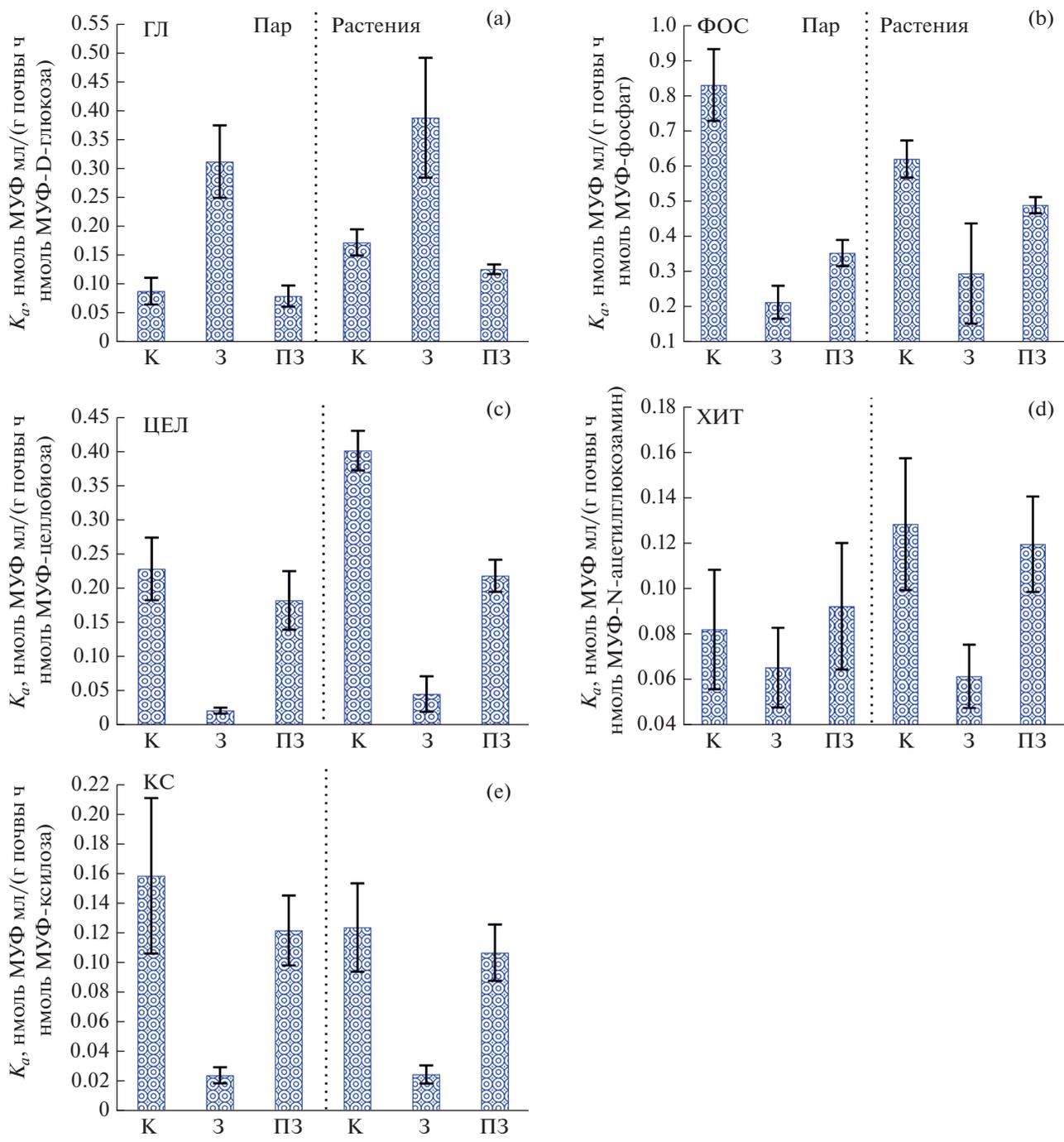


Рис. 3. Каталитическая эффективность ферментов (K_a): при оптимальном уровне влажности (ОВ); в условиях засухи – 3 (КЗ + ДЗ) и после засухи – ПЗ (ПКЗ + ПДЗ).

ски достоверные ($p < 0.05$) дискриминантные функции (ДФ1 и ДФ2). ДФ1 интерпретируется как влияние засухи как таковой, так как она разделяет на рис. 5а–5f точки, отображающие образцы контрольной почвы от образцов, отобранных при засухе. ДФ2 интерпретируется как дополнительное влияние длительной засухи, так как разделяет точки отображающие образцы почвы, ото-

бранные при длительной засухе, а также после ее окончания (рис. 5с, 5d) от всех прочих. Анализ рис. 5а–5d показал, что кинетические параметры ферментов от первой и второй коротких засух приближаются к контрольным значениям через неделю после реувлажнения, при этом для первой засухи (рис. 5а, 5b) степень восстановления выше. Длительная засуха приобретает свои отличитель-

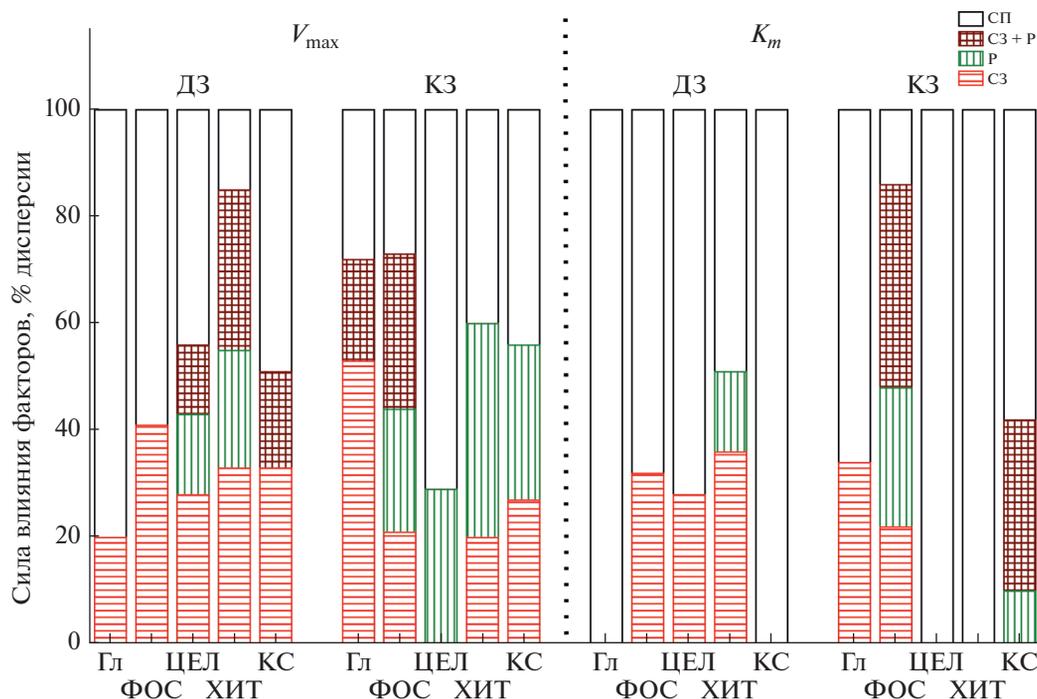


Рис. 4. Сила влияния факторов присутствия растений (Р) и стадии засухи (СЗ) на кинетические параметры ферментов по данным дисперсионного анализа. СП – случайные причины.

ные черты (изменяются значения ДФ2), и после длительной засухи через неделю не происходит восстановления кинетических параметров ферментов до контрольного уровня (рис. 5e, 5f). Анализ корреляции между ДФ и кинетическими параметрами ферментов (рис. 5g) показал, что засуха приводит к снижению V_{max} ферментов и возрастанию K_m у фосфатаз, длительная засуха при этом приводит к возрастанию V_{max} хитиназ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что высушивание оказывают стрессовое воздействие на большинство почвенных микроорганизмов, участвующих в процессах минерализации органического вещества почвы. В процессе минерализации участвуют внеклеточные ферменты микроорганизмов, вот почему столь информативно изучение кинетических параметров гидролитических ферментов, ответственных за цикл углерода в почве. Данное исследование сосредоточено на изучение степени изменения и восстановления параметров V_{max} , K_m и K_a в зависимости от продолжительности и частоты засухи в почве под травяной растительностью и под паром. Для двух групп ферментов из пяти показано обратимое увеличение пространственной изменчивости V_{max} во время длительной засухи. Высокая изменчивость кинетических параметров, скорее всего, связана с увеличением неоднородности

свойств почвы. Некоторые микролокусы могут проявлять высокую биологическую активность по мере увеличения концентрации растворенных веществ в почвенных капиллярах [6]. Показано сильное изменение кинетических параметров экзоферментов вглубь по профилю почвы. Авторы предположили, что подобные изменения могут быть вызваны различиями в доступности субстрата реакции, различиями в количестве продуцируемых экзоферментов и/или синтеза качественно различных ферментов [3].

Длительная засуха сильно снижала V_{max} целлюбиазы, фосфатазы и ксиланазы, но при этом увеличивала максимальную скорость реакции у хитиназ. Предполагаем, что последнее связано с увеличением доли грибов в микробной биомассе, вызванное длительной засухой [34]. Хитиназа участвует в расщеплении хитина клеточных стенок отмирающих грибных гиф. Исследователями показана тесная корреляция между биомассой грибов и активностью ферментов в подстилке [4]. Как бактерии, так и грибы выделяют экзоферменты, но труднорастворимые полимеры, такие как лигнин или целлюлоза, расщепляются в основном ферментами грибов, а не бактерий [25]. Другие исследования показали, что кинетические параметры ферментов могут зависеть от биомассы грибов в почвах засушливых регионов, а доступность субстрата и протеолитическую активность, вероятно, определяет измене-

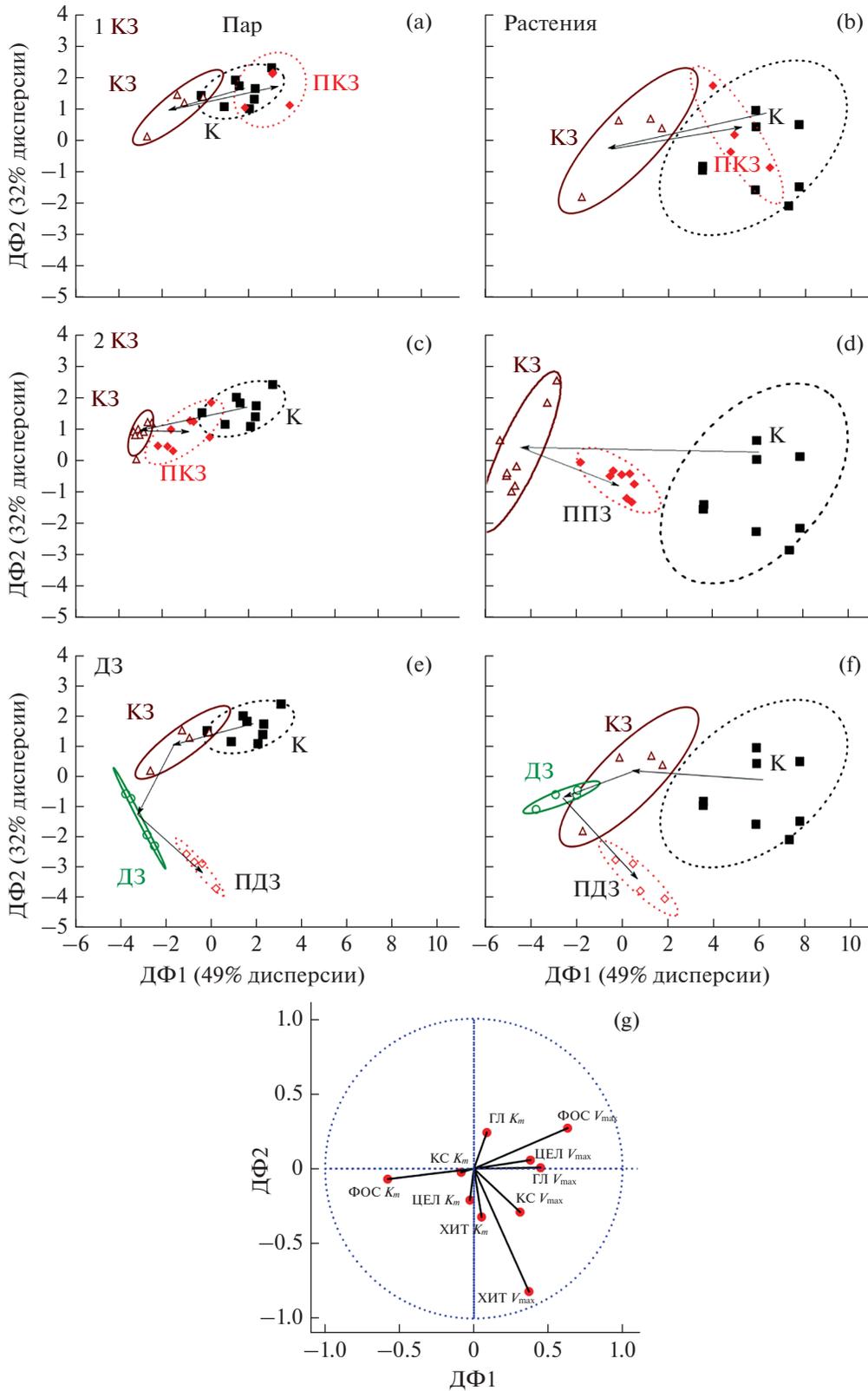


Рис. 5. Результаты дискриминантного анализа исследованных образцов почв, охарактеризованных по кинетическим параметра K_m и V_{max} для набора ферментов. а–f – взаиморасположение объектов исследования в плоскости, образованной дискриминантными функциями 1 и 2 (ДФ1 и ДФ2); g – корреляция между ДФ и кинетическими параметрами, использованными в анализе. Корреляционные эллипсы ограничивают область с $p \leq 0.95$.

ние ферментативной активности вдоль климатического градиента [4].

Снижение V_{\max} было примерно одинаковым для ксиланазы, фосфатазы и хитиназы во время обеих типов засух. V_{\max} глюкозидазы снижалась при кратковременной засухе и не изменялась по сравнению с контролем в ходе длительной засухи. Вероятно, ферменты, участвующие в цикле углерода, были более чувствительны к кратковременной засухе. Кинетические параметры ферментов после короткой засухи почти восстановились до уровня контрольных значений. Сильное последствие длительной засухи привело к тому, что даже через неделю после повторного увлажнения V_{\max} ферментов в 1.5–3 раза оставалась ниже, чем в контрольном варианте.

Ожидали сильную корреляцию между кинетическими параметрами для ферментов из одной функциональной группы, гидролизующих углеводы (глюкозидаза, целлюлаза, ксиланаза, хитиназа), на что имеется указание в литературе [31]. Однако обнаружили лишь слабую положительную корреляцию V_{\max} целлюлазы и хитиназы ($r = 0.42$) и между целлюлазами и ксиланазами ($r = 0.44$). Слабая положительная корреляция для K_m наблюдалась только между фосфатазами и хитиназами ($r = 0.43$). Некоторые исследования показали значительную разницу в измеренных в лаборатории K_m между группами (целлюлазы > лигниназы) и отсутствие существенной разницы в V_{\max} между целлюлазами и лигниназами [32]. Такая взаимозависимость кинетических параметров может быть результатом сложной суперпозиции ряда абиотических факторов, в том числе местные условия, высокая изменчивость свойств почвы (гранулометрический состав, содержание органического вещества), растительность, локализация ферментов и т.д. Ряд исследований свидетельствует о положительной корреляции между V_{\max} дегидрогеназ и содержанием глины, pH, общего азота и углерода [12]. Обнаружена положительная корреляция V_{\max} уреаз практически со всеми основными свойствами почвы, кроме объемной плотности [15]. Изучение кинетических параметров ферментов вдоль климатического градиента показало, что параметр внеклеточных ферментов V_{\max} может быть обусловлен скоростью оборота ферментов в почве, а не просто продукцией ферментов; этот эффект был наиболее выражен для протеолитических ферментов [4]. В полевых экспериментах длительная засуха не оказала существенного влияния на пул внеклеточных ферментов, хотя микробная биомасса почвы резко уменьшилась в результате этой засухи [27]. Такая стабильность экзогенного ферментного пула, скорее всего, связана с защитой ферментов от протеолитического распада путем их физической фиксации на глинистых частицах

и органических остатках в процессе засухи, что приводит к снижению гидролиза протеазами самих ферментов [27]. Показано, что ферментативная активность зависит от свойств почвы и экзогенных факторов (ботанический состав растительности и др.) [23].

Влияние растений на V_{\max} и K_m было достоверным только в случае кратковременной (периодической) засухи. По данным дисперсионного анализа влияние растений вносило 35–45% к дисперсии V_{\max} для целлюлазы, хитиназы, ксиланаз в почве, подверженной кратковременной засухе. Эти ферменты строго специфичны к субстрату по сравнению с глюкозидазами, которые синтезируются широким спектром организмов [26]. Растения, подвергшиеся кратковременной засухе, вероятно, активизировали свою корневую систему, чтобы добыть влагу из почвы, обеспечивая тем самым дополнительный приток С-субстратов и увеличивая продукцию целлюлазы, хитиназы и ксиланаз. В настоящем исследовании растения сглаживали изменчивость V_{\max} по сравнению с вкладом частоты засухи. Однако вклад комбинированного воздействия (растение + засуха) на величину V_{\max} составил 50–80%. В целом засуха сильнее повлияла на значения V_{\max} , чем на K_m . Иными словами, засуха сначала изменяла количество почвенных ферментов, а потом их качество.

Обратимое уменьшение V_{\max} в сочетании с быстрым обратимым снижением K_a было общей тенденцией как для длительной, так и для краткосрочных засух. Экстремальная засуха замедляет растворение веществ в почвенном растворе и подавляет перенос доступных питательных веществ к почвенным микроорганизмам, тем самым снижая секрецию ферментов. В этом исследовании обнаружено, что кратковременная засуха вызывает снижение K_m глюкозидаз и связанное с этим увеличение K_a . Полученные выводы хорошо согласуются с данными [33], которые обнаружили высокую величину каталитической эффективности глюкозидаз при содержании влаги в почве на уровне 10%, а не 20%. Авторы предположили, что почвенные β -глюкозидазы адаптированы к водному дефициту.

Специфической (характерной) особенностью длительной засухи было увеличение параметров V_{\max} и K_m для хитиназы как в почве под растительностью, так и в парующей почве. Увеличение V_{\max} , вероятно, было вызвано гибелью большей части микроорганизмов во время длительной засухи [4] и развитием на этой некромассе вторичной микробной биомассы, выделяющей дополнительное количество хитиназы. Предполагаем, что увеличение активности хитиназы обусловлено ростом доли и активности грибного блока в микробном сообществе. Исследователями показано,

что грибы более устойчивы к засушливым условиям по сравнению с бактериями [5].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведения модельного полевого эксперимента установлено, что длительная засуха оказывала большее влияние на кинетические параметры гидролитических ферментов, чем кратковременная (периодическая), изменяя как количественные показатели фермента (V_{\max}), так и качественные показатели (K_m и K_a). Влияние растений на активность ферментов было статистически значимо, но менее выраженным при длительной засухе, и без каких-либо специфических (характерных) признаков. В условиях длительной засухи явным специфическим (характерным) признаком почвенного пула ферментов является повышение V_{\max} хитиназ, видимо, обусловленное увеличением доли в микробной биомассе грибов, содержащих хитин в клеточных стенках, являющийся субстратом для хитиназ. Кратковременное (периодическое) засушливое воздействие не являлось ослабленным вариантом действия длительной засухи, с отличительной особенностью — снижением K_m глюкозидаз, приводящим к увеличению K_a . Обратимость действия засухи на кинетические параметры ферментов уменьшалась в ряду: первая кратковременная засуха > вторая кратковременная засуха > длительная засуха — за счет увеличения общей продолжительности стрессового воздействия.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы статьи благодарят к. б. н. Е.В. Благодатскую, к. б. н., В.О. Лопеса де Гереню и к. б. н. И.В. Евдокимова за помощь в работе.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа А.В. Якушева выполнена в рамках темы государственного задания “Почвенные микробиомы: генное разнообразие, функциональная активность, география и биотехнологический потенциал”, № 121040800174-6 и при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, проект № 075-15-2021-1396.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Овсепян Л.А., Курганова И.Н., Мостовая А.С., Лопес де Гереню В.О., Личко В.И., Благодатская Е.В., Кузьяков Я.В. Ферментативная активность пост-агро-

генных серых лесных почв нагорной дубравы “Лес на Ворскле” // Известия Самарского научного центра РАН. 2017. Т. 19. № 2. С. 151–158.

2. Семенов В.М., Лебедева Т.Н., Зинякова Н.Б., Хромычкина Д.П., Соколов Д.А., Лопес де Гереню В.О., Кравченко И.К., Ли Х., Семенов М.В. Зависимость разложения органического вещества почвы и растительных остатков от температуры и влажности в длительных инкубационных экспериментах // Почвоведение. 2022. № 7. С. 860–875. <https://doi.org/10.31857/S0032180X22070085>
3. Alves R.J., Callejas I.A., Marschmann G., Mooshammer M., Singh H.W., Whitney B., Torn M.S., Brodie E.L. Kinetic Properties of Microbial Exoenzymes Vary with Soil Depth but Have Similar Temperature Sensitivities Through the Soil Profile // *Frontiers in Microbiology*. 2021. V. 12. P. 735282. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.735282>
4. Baker N.R., Allison S.D. Extracellular enzyme kinetics and thermodynamics along a climate gradient in Southern California // *Soil Biol. Biochem.* 2017. V. 114. P. 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.07.005>
5. Barnard R.L., Osborne C.A., Firestone M.K. Changing precipitation pattern alters soil microbial community response to wet-up under a Mediterranean-type climate // *Int. Soc. Microbial Ecology*. 2014. V. 9. P. 946–957. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.192>
6. Burns R.G., DeForest J.L., Marxsen J., Sinsabaugh R.L., Stromberger M.E., Wallenstein M.D., Weintraub M.N., Zoppini A. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions // *Soil Biol. Biochem.* 2013 V. 58. P. 216–234. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.11.009>
7. Davidson E., Janssens I. Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change // *Nature*. 2006. V. 440. P. 165–173. <https://doi.org/10.1038/nature04514>
8. Dick R.P., Sandor J.A., Eash N.S. Soil enzyme activities after 1500 years of terrace agriculture in the Colca Valley, Peru // *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 1994. V. 50. P. 123–131. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(94\)90131-7](https://doi.org/10.1016/0167-8809(94)90131-7)
9. German D.P., Marcelo K.R.B., Stone M.M., Allison S.D. The Michaelis–Menten kinetics of soil extracellular enzymes in response to temperature: a cross-latitudinal study // *Global Change Biol.* 2012. V. 18. P. 1468–1479. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2011.02615.x>
10. Gianfreda L., Rao M.A., Piotrowska A., Palumbo G., Colombo C. Soil enzyme activities as affected by anthropogenic alterations: intensive agricultural practices and organic pollution // *Sci. Total Environ.* 2005. V. 341. I. 1–3. P. 265–279. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.10.005>
11. IPCC C. W. T. *Climate Change 2007: Synthesis Report*. Geneva, Switzerland IPCC, 2007. P. 104.
12. Juan Y., Chen L., Wu Z.J., Wang R. Kinetics of soil urease affected by urease inhibitors at contrasting moisture regimes // *J. Soil Sci. Plant Nutrition*. 2009. V. 9. P. 125–133.

13. *Khalili B., Nourbakhsh F., Nili N., Khademi H., Sharifnabi B.* Diversity of soil cellulase isoenzymes is associated with soil cellulose kinetic and thermodynamic parameters // *Soil Biol. Biochem.* 2011. V. 43. P. 1639–1648.
14. *Kovárová–Kovar K., Egli T.* Growth Kinetics of Suspended Microbial Cells: From Single-Substrate-Controlled Growth to Mixed-Substrate Kinetics // *Microbiol. Molecular Biol. Rev.* 1998. V. 62. P. 646–666.
15. *Kujur M., Patel A.K.* Kinetics of soil enzyme activities under different ecosystems: An index of soil quality // *Chilean J. Agric. Res.* 2014. V. 74. P. 96–104. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392014000100015>
16. *Loeppmann S., Blagodatskaya E., Pausch J., Kuzyakov Y.* Substrate quality affects kinetics and catalytic efficiency of exoenzymes in rhizosphere and detritusphere // *Soil Biol. Biochem.* 2016. V. 92. P. 111–118.
17. *von Lützw M., Kogel-Knabner I.* Temperature Sensitivity of Soil Organic Matter Decomposition – What Do We Know? // *Biol. Fertil. Soils.* 2009. V. 46. P. 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00374-009-0413-8>
18. *Liu C., Tian H., Gu X., Li N., Zhao X., Lei M., Alharbi H., Megharaj M., He W., Kuzyakov Y.* Catalytic efficiency of soil enzymes explains temperature sensitivity: Insights from physiological theory // *Sci. Total Environ.* V. 822. 2022. P. 153365. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153365>
19. *Marx M.C., Wood M., Jarvis S.C.* A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soils // *Soil Biol. Biochem.* 2001. V. 33. P. 1633–1640.
20. *Marx M., Kandeler E., Wood M.K., Wermbter N., Jarvis S.C.* Exploring the enzymatic landscape: distribution and kinetics of hydrolytic enzymes in soil particle-size fractions // *Soil Biol. Biochem.* 2005. V. 37. P. 35–48.
21. *Moscatelli M.C., Lagomarsino A., Garzillo A.M.V., Pignataro A., Grego S.* Glucosidase kinetic parameters as indicators of soil quality under conventional and organic cropping systems applying two analytical approaches // *Ecological Indicators.* 2012. V. 13. P. 322–327.
22. *Nannipieri P., Grego S., Ceccanti B.* Ecological significance of the biological activity in soil // *Soil Biochem.* 1990. V. 6. P. 293–355.
23. *Sanaullah M., Blagodatskaya E., Chabbi A., Rumpel C., Kuzyakov Y.* Drought effects on microbial biomass and enzyme activities in the rhizosphere of grasses depend on plant community composition // *Appl. Soil Ecology.* 2011. V. 48. P. 38–44.
24. *Schimel J.* Life in Dry Soils: Effects of Drought on Soil Microbial Communities and Processes // *Ann. Rev. Ecology, Evolution, Systematics.* 2018 V. 49. P. 409–432.
25. *Schneider T., Keiblinger K.M., Schmid E., Sterflinger–Gleixner K., Ellersdorfer G., Roschitzki B., Richter A., Eberl L., Zechmeister–Boltenstern S., Riedel K.* Who is who in litter decomposition? Metaproteomics reveals major microbial players and their biogeochemical functions // *The ISME J.* 2012. V. 6. P. 1749–1762.
26. *Skujins J.* Extracellular enzymes in soil // *Critical Rev. Microbiol.* 1976. V. 44. P. 383–421.
27. *Steinweg J.M.* Sensitivity of microbial community physiology to soil moisture and temperature in an old field ecosystem. Doctoral dissertation, 2011.
28. *Stone M.M., Weiss M.S., Goodale C.L., Adams M.B., Fernandez I.J., German D.P., Allison S.D.* Temperature sensitivity of soil enzyme kinetics under N-fertilization in two temperate forests // *Global Change Biol.* 2012. V. 18. P. 1173–1184.
29. *Stursova M., Baldrian P.* Effects of soil properties and management on the activity of soil organic matter transforming enzymes and the quantification of soil-bound and free activity // *Plant Soil.* 2011. V. 338. P. 99–110.
30. *Tischer A., Blagodatskaya E., Hamer U.* Microbial community structure and resource availability drive the catalytic efficiency of soil enzymes under land-use change conditions // *Soil Biol. Biochem.* 2015. V. 89. P. 226–237.
31. *Wallenstein M.D., McMahon S.K., Schimel J.P.* Seasonal variation in enzyme activities and temperature sensitivities in Arctic tundra soils // *Global Change Biol.* 2009. V. 15. P. 1631–1639.
32. *Wang G., Post W.M., Mayes M.A., Frerichs J.T., Sindhu J.* Parameter estimation for models of ligninolytic and cellulolytic enzyme kinetics // *Soil Biol. Biochem.* 2012. V. 48. P. 28–38.
33. *Zhang Y., Chen L., Wu Z., Sun C.* Kinetic parameters of soil β -glucosidase response to environmental temperature and moisture regimes // *Revista Brasileira De Ciencia Do Solo.* 2011. V. 35. P. 1285–1291.
34. *Yuste J.C., Barba J., Fernández-González A.J., Fernández-López M., Mattana S., Martínez-Vilalta J., Nolis P., Lloret F.* Changes in soil bacterial community triggered by drought-induced gap succession preceded changes in soil C stocks and quality // *Ecology Evolution.* 2012. V. 2. P. 3016–3031.

Effect of Long-Term and Short-Term Droughts on the Hydrolytic Enzymes in Haplic Luvisol

A. V. Yakushev^{1, *}, A. I. Zhuravleva², and I. N. Kuznetsova³

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

²Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

³LLC “Agro-S”, Voronezh, 394049 Russia

*e-mail: a_yakushev84@mail.ru

The transformation of organic matter in the soil is largely determined by hydrolytic enzymes. Under the conditions of climate change, understanding the mechanisms of microbial response is of particular importance

for predicting the carbon cycle. Until now, the effect of drought duration and frequency on soil hydrolytic enzymes has been little studied. A multifactorial field manipulation experiment was carried out, simulating in the presence of plants and without them: two short-term droughts, a long-term drought, and an optimal level of soil moisture. The maximum reaction rate V_{\max} , Michaelis constant K_m , and catalytic efficiency K_a of five groups of enzymes involved in the carbon cycle (cellobiase, glucosidase, xylanase), phosphorus (phosphatase), and nitrogen (chitinase) were determined. In phosphatases, glucosidases, and xylanases, V_{\max} decreased during short-term drought. During prolonged drought, the V_{\max} value of phosphatases, cellobiohydrolases, and xylanases decreased and increased in chitinases, while remaining unchanged in glucosidases. Both long-term and short-term droughts led to an increase in K_m and a decrease in catalytic efficiency (K_a) for almost all enzymes. Short-term droughts were not a “weakened version” of a long-term drought, but had their own specifics – a decrease in K_m in glucosidases, which led to an increase in K_a . Long-term drought was characterized by an increase in V_{\max} of chitinases and spatial variability of V_{\max} of phosphatases and glucosidases. The influence of the presence of plants was secondary and affected only during short droughts. The reversibility of the effect of drought on V_{\max} , K_m , K_a decreased in the series first short-term drought > second short-term drought > long-term drought due to an increase in the total duration of the stress impact.

Keywords: drought stress, soil enzymes, Michaelis-Menten kinetics, catalytic efficiency