

МЕХАНИЗМЫ И ВРЕМЕННОЙ ФАКТОР ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПАЛЕОПОЧВ

© 2017 г. Н.Н. Каширская, Л.Н. Плеханова, С.Н. Удальцов,
Е.В. Чернышева, А.В. Борисов

*Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН,
142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 2*

E-mail: nkashirskaya81@gmail.com

Поступила в редакцию 31.07.17 г.

Представлены результаты исследований ферментативной активности палеопочв памятников археологического комплекса. Показано, что в почвах древних поселений активность фосфатаз и уреазы значительно превышает аналогичные показатели современных почв – в культурных слоях эпохи бронзы для уреазной активности в отдельных случаях превышение составляло 1,5–2 раза, а для фосфатазной – 7–15 раз. Это связано с большим количеством органических материалов (пищевые отходы, бытовой мусор, экскременты, мочевина), которые попали в почву в древности и вызвали увеличение продуцирования почвенными микроорганизмами ферментов, высокая активность которых сохранилась на протяжении 4000 лет. Для установления локализации ферментов проводили фумигацию почвы хлороформом и активацию внеклеточных ферментов глицином. Высвобождение внутриклеточных ферментов вследствие фумигации привело к заметному увеличению фосфатазной активности в современных почвах и палеопочвах древних поселений, в отличие от целинной палеопочвы эпохи бронзы. Активация глицином в меньшей степени повлияла на активность фосфатаз, но вызвала значительное возрастание уреазной активности. Это может указывать на преимущественно внеклеточную локализацию уреазы в палеопочвах древних поселений, тогда как фосфатаза имеет как внеклеточную, так и внутриклеточную локализацию.

Ключевые слова: ферменты, микроорганизмы, уреазы, фосфатаза, почвы, древние поселения, органические субстраты.

Почвы археологических памятников представляют собой уникальный полигон для изучения последствий поступления в почву биологических материалов антропогенной природы и связанных с этим изменений биологической активности почв. При этом почвы, а также культурные слои поселений выступают в качестве объекта, в котором дополнительное поступление неспецифических для почв органических материалов обусловило антропогенно-иницированную сукцессию почвенного микробного сообщества, последствия которой могут сохраняться неопределенно долгое время.

Различные экзо- и эндоферменты почвенных микроорганизмов, фауны и растений являются неотъемлемым каталитически активным почвенным компонентом. В результате иммобилизации ферменты в почве стабилизируются и длительное время сохраняют свою активность. Они участвуют во всех основных звеньях почвообразовательных процессов – синтезе и распаде гумуса, гидролизе органических соединений, окислительно-восстановительных процессах и т.д. Стабилизация ферментов в почве,

главным образом, происходит за счет ковалентного связывания аминной группы белка и карбоксильной группы гумусовой кислоты [1]. Кроме того, фермент может быть закреплен внутри гумусовых кислот без химического связывания. Гумусовые кислоты представляют собой органоминеральные полимеры, а полимеры, как известно, способны образовывать вокруг фермента сетеподобную матрицу, ячейки которой настолько малы, что молекула фермента не может освободиться из сети, но в то же время достаточно велики для проникновения низкомолекулярных субстратов [2]. Иммобилизованные ферменты становятся более устойчивыми к денатурации и протеолизу, и могут сохраняться даже при условиях, лимитирующих микробиологическую активность [3]. Показано, например, что активность фосфатазы и уреазы сохраняется в мерзлотных и озерных отложениях, возраст которых составлял 9 и 13 тыс. лет соответственно [4]. Кроме того, была выявлена фосфатазная активность в почве, погребенной под насыпью кургана, возраст которого составлял более четырех тысяч лет [5].

В последние годы изучение биологической активности естественных почв и культурных слоев археологических памятников показало существенные различия по ряду показателей между этим двумя группами объектов [6–12]. В отличие от фоновых почв, культурные слои формировались на протяжении точно установленного времени в условиях поступления в почву определенных органических субстратов, связанных с антропогенной деятельностью. К таким субстратам относятся белки, нуклеиновые кислоты, жиры, мочевины, хитин, углеводы, в том числе крахмал, целлюлоза, лигнин и др. Хотя постоянное поступление органического вещества характерно и для естественных почв, однако заметного обогащения почвы теми или иными субстратами в результате естественных процессов не происходит. Это связано с более устойчивым равновесием большинства естественных систем по сравнению с антропогенными: скорости антропогенных процессов значительно выше, чем скорости естественных процессов, поэтому именно антропогенные процессы являются активаторами общесистемных изменений [13]. Интенсивное поступление органических субстратов в почву можно рассматривать в качестве одной из форм подобной активации. Рост численности микроорганизмов, ответственных за утилизацию субстратов, приводит к увеличению содержания в почве определенных групп ферментов, к устойчивым изменениям ферментативного пула, которые сохраняются на протяжении тысяч лет до наших дней [10]. Представляется весьма перспективным исследование «ферментативной памяти» почв и культурных слоев археологических памятников.

Для раскрытия механизмов «ферментативной памяти» необходимо получить представление о локализации ферментов, сохраняющих свою активность в древних антропогенно измененных почвах. Исследования 70–80 гг. XX в. указывают на широкий спектр возможных сайтов локализации почвенных ферментов, в качестве которых могут выступать цитоплазма клеток живых организмов, периплазматическое пространство живых грамотрицательных бактерий, внешняя поверхность живых клеток, растущие и делящиеся клетки в водной фазе почвы, неделящиеся живые клетки (споры грибов, цисты протозоа, эндоспоры бактерий), мертвые клетки и их осколки, лизирующиеся клетки, растворимые или нерастворимые фермент-субстратные комплексы, поверхности глинистых минералов, гумусовые коллоиды [4,14]. Известно, что внеклеточные ферменты, локализованные на гумусовых коллоидах и, в меньшей степени, на поверхности глинистых минералов,

могут сохраняться в почве в течение длительного периода [1]. Однако в связи с тем, что почвенные микроорганизмы также способны сохраняться в жизнеспособном состоянии на протяжении неопределенно долгого времени [15,16], по-прежнему остается открытым вопрос о том, к какой именно категории общего ферментного пула относится тот или иной фермент, активность которого регистрируется в культурном слое. Наиболее вероятными представляются два варианта: либо молекулы исследуемой ферментной группы ассоциированы с сохранившимися микробными клетками, либо они иммобилизованы на почвенном органическом матриксе. В первом случае мы можем оценить время пребывания микробных клеток в жизнеспособном и функционально активном состоянии, во втором же случае – оценить продолжительность существования в почве самих ферментов, не связанных с микробными клетками.

Активность таких ферментов может быть выявлена только в случае сохранения правильной конформации их молекул после адсорбции на минеральных и органоминеральных почвенных частицах. Молекулы органического вещества почвы образуют матрицу гумусового «студня» [17], при формировании которого адсорбированные органические вещества не образуют сплошной пленки на поверхности минералов, а закрепляются на незначительной доле их суммарной поверхности, так называемых активных центрах адсорбции [18,19], которые влияют на конформацию адсорбированных органических молекул, прочность поверхностных соединений и их устойчивость к разрушению [20]. Поверхность почвенной частицы – мицеллы – приобретает свойства адсорбированных органических молекул, влияющих, в свою очередь, на расположение молекул очередного слоя [21]. Очевидно, что ферменты, поступающие в почву, будут сохранять свою активность только в том случае, когда их взаимодействие с центрами адсорбции будет происходить без нарушения правильной конформации белковых глобул. Исследование влияния заряженных коллоидных частиц на третичную и четвертичную структуру белка показало, что заряженные поверхности (мембраны, мицеллы и т.д.) не являются нейтральными по отношению к сорбированным на них белкам [22]. Так, для уреазы – специфического гидролазного фермента из группы амидаз – при образовании комплекса с полиакриламидом было установлено ингибирование, вызванное торможением подвижной петли в районе каталитического центра, имеющего отрицательный электроста-

тический потенциал. Однако при взаимодействии с полиакриламидом в составе сложных микрочастиц, напоминающих комплексы с полиакриламидом в экспериментах по моделированию почвенных мицелл [20], активность уреазы практически не изменялась [22]. Согласно современным представлениям, сохранение энзиматической активности внеклеточных ферментов в почве обусловлено их иммобилизацией на поверхности почвенных частиц, хотя иммобилизация ферментов может приводить к существенному снижению их активности [2]. Молекула фермента, необратимо прикрепленная к матрице, для сохранения своей активности не должна претерпевать каких-либо структурно-функциональных изменений [23]. Поэтому иммобилизация ферментов на заряженных поверхностях требует увеличения длины связующего звена между макромолекулой и матрицей носителя, чтобы воздействие матрицы на состояние белковой макромолекулы было минимальным [24]. Представляется очевидным, что эффективность иммобилизации ферментов на почвенных частицах будет зависеть как от свойств адсорбирующихся молекул, так и от свойств самих почвенных частиц, имеющих определенный суммарный заряд поверхности. Так, для чернозема с его высокой площадью поверхности порового пространства установлен суммарный отрицательный заряд поверхности с величиной отрицательного ζ -потенциала, равной $-13,85$ [21]. Ферменты после адсорбции на такой поверхности далеко не всегда смогут сохранить «правильную» третичную структуру [25], при которой участки полипептидных цепей, важные для катализа, останутся достаточно подвижными. Известно, что удельная активность большинства адсорбированных ферментов падает, и лишь некоторые из них – те, которые *in vivo* связаны с биомембраной, – активируются при адсорбции на твердых носителях [26]. Поэтому вопрос о сохранении активности ферментов, адсорбированных на поверхности почвенных органоминеральных комплексов, представляет особый интерес в плане изучения третичной структуры белка.

Для белковых молекул, рассматриваемых как «абстрактные» молекулярные цепочки, при прогнозировании оптимальных вариантов формирования третичной структуры было введено понятие конформационно-стабильных участков, т.е. таких участков, конформация которых слабо зависит от внешних условий [27]. По-видимому, молекулы почвенных ферментов, способные сохранять свою активность на протяжении тысячелетий, имеют достаточно высокую конформационную стабильность. Это особенно

важно для ферментов со сложной четвертичной структурой, активность которых определяется не только оптимальной конформацией белковых глобул, но и правильным взаимодействием между отдельными протомерами. К числу подобных ферментов относятся такие маркеры «ферментативной памяти» древних антропогенно преобразованных почв, как уреазы и щелочная фосфатаза.

Уреазы (КФ 3.5.1.5) обладают специфическим свойством разлагать мочевину на углекислоту и аммиак. Молекула уреазы состоит из шести субъединиц. Для уреазы показаны как высокая способность к адсорбции на модельных микрочастицах с полиакриламидом, так и сохранение исходного уровня активности при адсорбции [22].

Щелочная фосфатаза (КФ 3.1.3.1) – специфический фермент, способный к гидролизу широкого спектра малых моноэфиров ортофосфорной кислоты и концевых фосфатных групп ДНК, – представляет собой димер со сложным межглобульным контактом между отдельными неактивными протомерами, по типу конформационного замка [28,29]. Между активным центром фермента и отдельными участками конформационного замка установлена взаимозависимость за счет перекрывания полипептидных цепей: существенные для катализа аминокислоты одновременно присутствуют и в межбелковых контактах между отдельными протомерами щелочной фосфатазы, и в ее активных центрах [30]. При исследовании культурных слоев археологических памятников именно фосфатазная активность ведет себя наиболее контрастно в почвенном профиле: ее различия в соседних почвенных слоях могут достигать сотни и тысячи раз. К настоящему времени выявлены механизмы регуляции активности внеклеточных почвенных ферментов низкомолекулярными соединениями с функциями химических шаперонов, которые способны оптимизировать конформацию белковых молекул, адсорбированных на поверхности почвенных органоминеральных комплексов [31,32]. В этой связи увеличение ферментативной активности почвы в присутствии таких модифицирующих соединений может указывать на внеклеточную локализацию фермента в почве.

В данной работе предпринята попытка оценить уреазную и фосфатазную активность культурных слоев эпохи бронзы в сравнении с погребенной почвой эпохи бронзы и современной фоновой почвой, а также предположить наиболее возможные варианты локализации этих ферментов, их преимущественную связь либо с

живыми организмами, либо с почвенными микрочастицами органоминеральной природы.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования послужили почвы и культурные слои археологического памятника поселения Ишкининское Гайского района Оренбургской области (N 51°27'42"; E 58°17'03,6"). Для сравнения брали современную фоновую почву (чернозем обыкновенный). Поселение функционировало в эпоху средней бронзы (начало II тысячелетия до н.э.), после чего территория не осваивалась и использовалась для эпизодического выпаса скота. На территории поселения был заложен раскоп, вскрывший антропогенно-преобразованные почвы (палеоурбаноземы). Для палеоурбаноземов характерен пепельно-серый цвет, бесструктурность, карбонатность, неоднородное содержание органического углерода и подвижных фосфатов, обедненность илистой фракцией, а также многочисленные включения антропогенной природы (керамика, угольки, фрагменты прокаленного суглинка). Также была исследована целинная почва, законсервированная в древности под мощным выкидом из рудника, соответствующего по времени эксплуатации исследуемому поселению и относящегося к единому с поселением хозяйственно-экономическому комплексу. Морфологические и физико-химические характеристики изученных почв приведены в работе [33].

Ферментативную активность почвенных образцов определяли по количеству продукта реакции, образованного в течение 1 ч при избытке внесенного в почву субстрата. Для оценки фосфатазной активности в качестве субстрата использовали фенолфталеинфосфат натрия по методу Галстяна–Арутюнян [1], для оценки уреазной активности – мочевины в боратном буфере по методу Кандлера–Гербер [34]. К наиболее простым методам выявления активности ферментов, связанных с живыми клетками, относятся применение ингибиторов микробного роста, высушивание почвы [1], а также фумигационные методы [35,36]. В данной работе использовали метод фумигации почвы хлороформом. Образцы инкубировали в атмосфере хлороформа в эксикаторе на протяжении пяти суток, что вызывало гибель почвенного микробного сообщества; затем проводили оценку фосфатазной и уреазной активности фумигированных образцов, как описано выше. Для выявления вклада внеклеточных ферментов в общий пул ферментативной активности использовали эффект их активации путем модификации белковых молекул низкомолекулярными со-

единениями [31]. В качестве активатора применяли глицин. Почвенные образцы увлажняли 0,02% раствором глицина до 60% от полной влагоемкости и инкубировали при 22°C в течение суток.

Статистическую обработку проводили стандартными методами [37]. Ошибка среднего составляла 3–7%, поэтому более высокие различия ферментативной активности считались достоверными как в отдельных слоях почвенного профиля, так и при сравнении активности фумигированных и активированных образцов с ее исходным уровнем.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Рассматривая ферментативную активность современного чернозема, формирование которого происходило в условиях минимального антропогенного влияния (рис. 1а), отметим, что фосфатазная активность его верхнего горизонта составляла 130 мкг P₂O₅/г·ч и уменьшалась с глубиной в 20 раз. Снижение уреазной активности в данном почвенном профиле было значительно менее выражено по сравнению со снижением фосфатазной активности: в верхнем горизонте уреазная активность составляла 86 мкг NH₄/г·ч, а в нижних оставалась на уровне 14–15 мкг NH₄/г·ч. В целом уменьшение ферментативной активности в профиле современных почв связано со снижением биологической активности более глубоких горизонтов, в которые, в отличие от верхних почвенных слоев, не поступает органическое вещество.

Изменения ферментативной активности почвенных образцов после фумигации микробного сообщества хлороформом, а также в результате активации внеклеточных ферментов глицином, представлены в процентах от исходных значений активности до обработки (рис. 1б). Как при активации, так и при фумигации в верхнем горизонте современной почвы значения фосфатазной активности увеличивались в два раза по сравнению с исходным уровнем. В подповерхностных горизонтах изменения фосфатазной активности были несущественны, за исключением почвенного слоя на глубине 25 см, где значения данного показателя возрастали в 1,3 раза при активации и в 1,5 раза при фумигации. Увеличение ферментативной активности в результате фумигации может быть связано с разрушением микробных клеток, которое приводит к высвобождению внутриклеточных соединений, в том числе и ферментов, во внешнюю среду [38]. Уреазная активность после фумигации (рис. 2в) в верхних слоях современной почвы практически не изменялась,

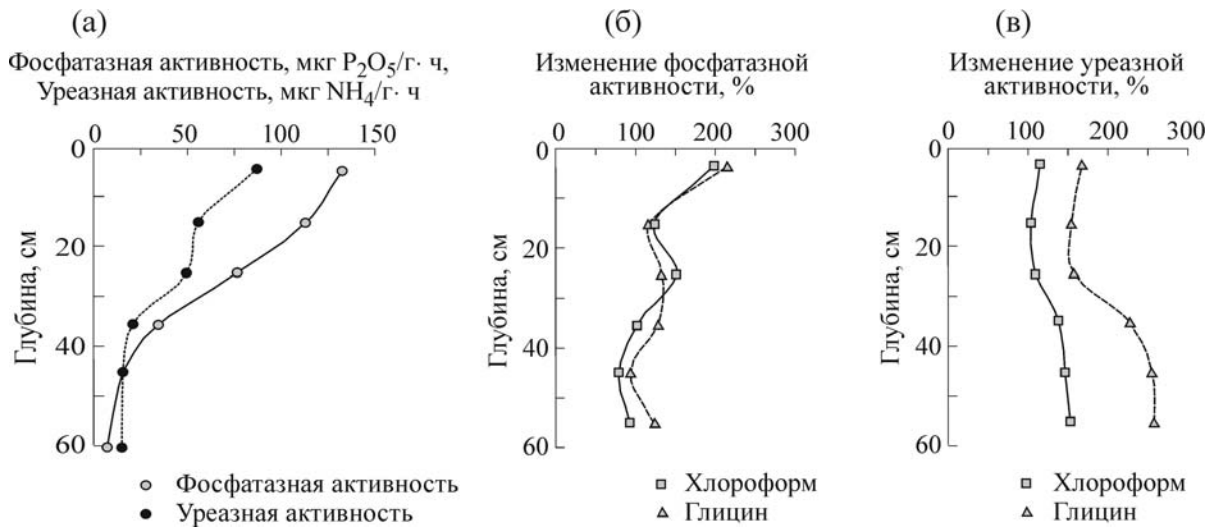


Рис. 1. Ферментативная активность в профиле современной фоновой почвы: почвенные образцы до обработки (а); изменение фосфатазной активности (б) и уреазной активности (в) после обработки хлороформом и глицином.

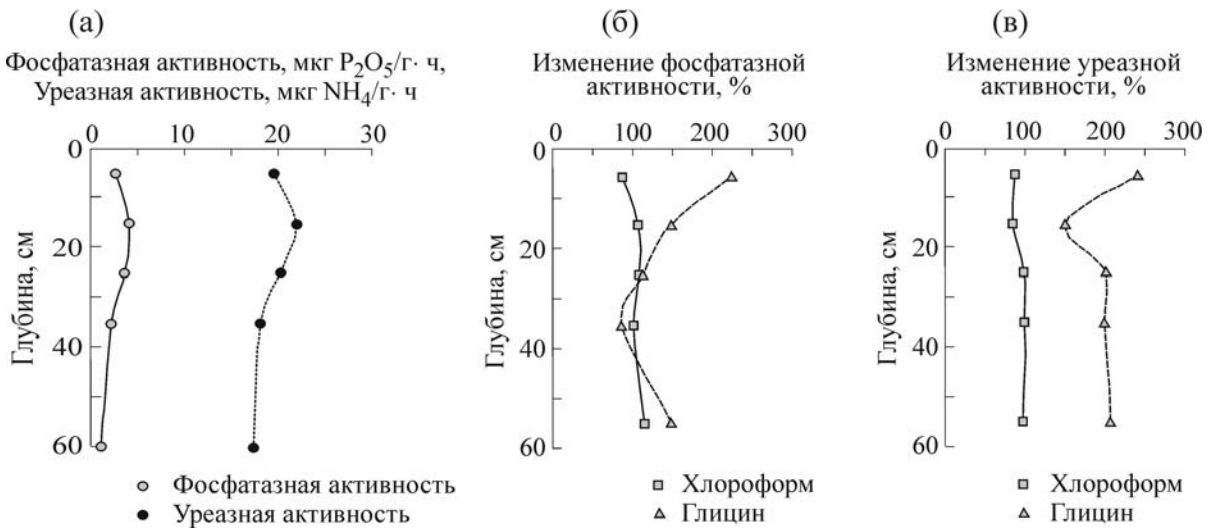


Рис. 2. Ферментативная активность в профиле целинной палеопочвы эпохи бронзы, погребенной под отвалом рудника: почвенные образцы до обработки (а); изменение фосфатазной активности (б) и уреазной активности (в) после обработки хлороформом и глицином.

а в нижних увеличивалась на 40–50%. Активация внеклеточной уреазы после обработки почвы глицином привела к существенному увеличению уреазной активности в профиле современной почвы: в верхних горизонтах оно составляло 50–65%, а в нижних слоях уреазная активность увеличивалась в 1,2–1,6 раза по сравнению с исходным уровнем. Более выраженное увеличение фосфатазной активности по сравнению с уреазной в ответ на фумигационное разрушение микробных клеток связано, очевидно, с тем, что фосфатазной активностью обладают все живые клетки, в то время как уреазная активность почвы зависит от специ-

фических групп микроорганизмов, численность которых составляет определенную долю от общей численности микробного сообщества.

В профиле палеопочвы, погребенной под отвалом рудника (рис. 2а), фосфатазная активность уменьшалась с глубиной от 2,7 до 1,0 $\mu\text{g P}_2\text{O}_5/\text{г} \cdot \text{ч}$. Снижение фосфатазной активности в профиле палеопочвы было выражено значительно слабее, чем в профиле современной фоновой почвы, поскольку верхние горизонты погребенной почвы претерпели существенную потерю органического вещества. Если в верхних горизонтах палеопочвы эпохи бронзы фосфа-

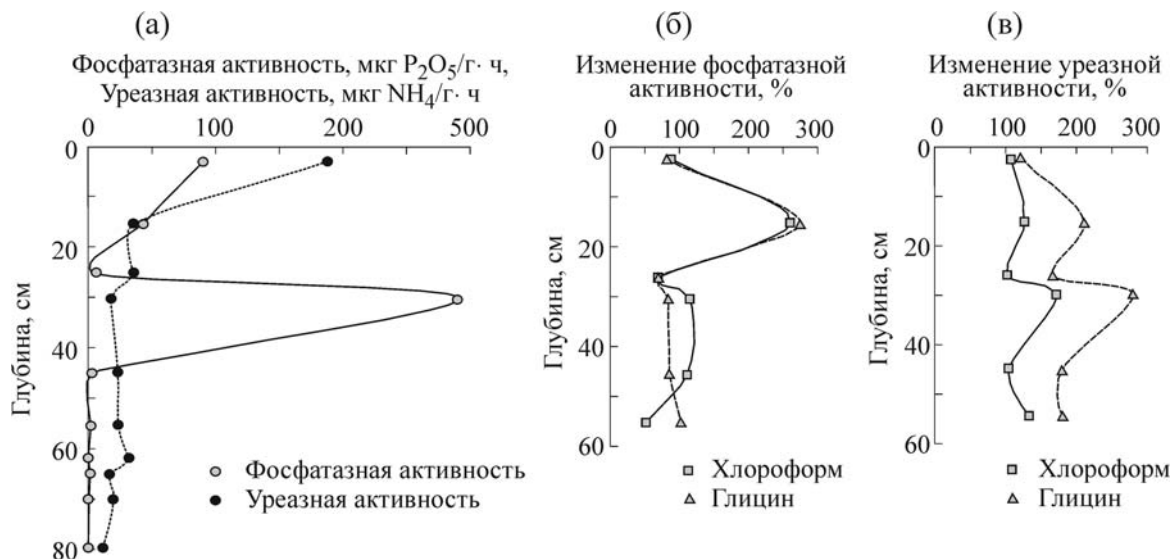


Рис. 3. Ферментативная активность в профиле палеопочвы поселения эпохи бронзы: почвенные образцы до обработки (а); изменение фосфатазной активности (б) и уреазной активности (в) после обработки хлороформом и глицином.

тазная активность сохранилась на уровне 2–3% от современного, то в нижних горизонтах этой же почвы степень сохранности фосфатазы была значительно выше. Здесь величины фосфатазной активности составляли 14–15% от современных величин на аналогичной глубине. Уреазная активность в профиле погребенной почвы сохранилась в большей степени, чем фосфатазная активность. Верхние горизонты характеризовались достаточно высоким уровнем данного показателя, составившим 20–40% от современного. В нижних горизонтах погребенной почвы уреазная активность практически не отличалась от таковой в аналогичных горизонтах современной фоновой почвы.

Заметного влияния фумигации на ферментативную активность погребенной целинной почвы не зафиксировано. Это, по-видимому, связано с тем, что практически все клетки микробного сообщества в погребенной почве находятся в покоящемся состоянии, они окружены плотными органоминеральными капсулами [39] и не так легко поддаются разрушению, как микроорганизмы верхних горизонтов современной почвы.

Активация внеклеточных ферментов после обработки палеопочвы глицином привела к увеличению фосфатазной активности в 1,5–2,2 раза (за исключением почвенных слоев на глубине 25 и 35 см) и к увеличению уреазной активности в 1,5–2,5 раза по всей глубине почвенного профиля. Это может указывать на то, что в палеопочве эпохи бронзы как фосфатазная, так и уреазная активность преимущественно обу-

словлены функционированием ферментов, имеющих внеклеточную локализацию.

Ферментативная активность чернозема, сформированного на поселении эпохи бронзы и включающего в свой профиль разновозрастные культурные слои данного поселения, представлена на рис. 3. Фосфатазная активность нативных почвенных образцов, не подвергавшихся активации и фумигации (рис. 3а), широко варьировала и составляла от 7 до 490 мкг $P_2O_5/г \cdot ч$ в верхних слоях и от 0,4 до 2,8 $P_2O_5/г \cdot ч$ в нижних слоях. Поверхностный слой почвы, сформированной на поселении эпохи бронзы, характеризовался в полтора раза меньшей фосфатазной активностью по сравнению с верхним горизонтом современной фоновой почвы. Это связано с меньшим содержанием органического вещества в антропогенно-нарушенной почве поселения по сравнению с фоновой почвой, которая испытывала лишь незначительное антропогенное влияние.

В верхней части рассматриваемого почвенного профиля, до глубины 15 см, фосфатазная активность уменьшалась от 90 до 7 мкг $P_2O_5/г \cdot ч$. На глубине 30 см, в прослойке, наиболее богатой органическим веществом, было отмечено максимальное увеличение данного показателя до 490 мкг $P_2O_5/г \cdot ч$ – в 5,5–70 раз больше по сравнению с вышерасположенными слоями. В нижней части профиля фосфатазная активность фиксировалась на очень низком уровне.

Уреазная активность поверхностного слоя почвы на поселении была в два раза выше,

чем в аналогичном слое современной фоновой почвы. С глубиной она уменьшалась от 189 до 12 мкг $\text{NH}_4/\text{г}\cdot\text{ч}$. На уровне 62 см было отмечено ее увеличение, связанное с повышенным содержанием органического вещества в культурном слое, залегающем на данной глубине. В целом уреазная активность в культурных слоях эпохи бронзы была более высокой по сравнению с фосфатазной активностью, за исключением слоя на глубине 30 см с ярко выраженным фосфатазным максимумом.

Фустигация микробных клеток в верхнем слое почвы, сформированной на культурных слоях поселения эпохи бронзы, привела к уменьшению фосфатазной активности на 13%. Это может указывать на связь определенной доли фосфатазной активности с поверхностью жизнеспособных клеток, не обладающих плотными органоминеральными капсулами, характерными для большинства почвенных микроорганизмов [39]. Более вероятным может быть предположение о том, что итоговая величина фосфатазной активности после фустигации является своеобразной суммой разрушительного эффекта хлороформа на микробные клетки – с высвобождением внутриклеточного фермента – и ингибирующего эффекта хлороформа на активность самого фермента. Уменьшение фосфатазной активности после фустигации, хотя и не столь существенное вследствие чрезвычайно низких исходных величин, было зафиксировано в культурных слоях, расположенных на глубинах 26 и 55 см. В остальных случаях обработка почвы хлороформом приводила к возрастанию фосфатазной активности: более чем в 2,5 раза в слое на глубине 15 см (с исходно низкой активностью), на 14% – в слое 30 см (с исходно наиболее высокой активностью) и на 12% – в слое 45 см (с исходно низкой активностью). Активирующее влияние глицина на комплекс почвенных фосфатаз проявлялось только в слое на глубине 15 см. Здесь увеличение фосфатазной активности в результате активации было практически таким же, как и ее увеличение после фустигации.

Уреазная активность под влиянием фустигации в отдельных слоях рассматриваемого почвенного профиля увеличилась на 5–70% (рис. 1в), тогда как активация внеклеточной почвенной уреазы с помощью глицина привела к возрастанию данного показателя в 1,2–3,0 раза. В целом была выявлена сходная динамика изменений уреазной активности в почвенных образцах после обработки хлороформом и в тех же образцах, инкубированных с раствором глицина. Максимальные ответы уреазной активности как на фустигацию, так и на

активацию были зафиксированы в слоях на глубине 15 и 30 см. Эти культурные слои, соответствующие активным периодам развития древнего поселения, сохранили повышенное содержание органического вещества – в 1,5–2,5 раза выше по сравнению с поверхностным слоем.

Для фосфатазной активности была выявлена положительная корреляция с содержанием органического вещества ($r = 0,86$). Для уреазной активности такая тесная корреляция не выявлена, однако было показано максимальное увеличение активности уреазы относительно исходного уровня при активации глицином в культурных слоях эпохи бронзы, характеризующихся высоким содержанием органического углерода. Это может указывать на связь уреазной активности с органоминеральными комплексами почвы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Очевидно, что одним из основных условий длительного сохранения почвенной ферментативной активности является высокая концентрация молекул фермента, закрепленных на почвенной матрице и не потерявших при этом своей каталитической способности. Стабилизация почвенных ферментов, по-видимому, представляет собой достаточно спонтанный процесс, в отличие от искусственной иммобилизации, направленной на создание и поддержание необходимых условий для эффективного функционирования чистых ферментов, которые, как правило, утрачивают часть своей активности после связывания с носителями. Потери активности обусловлены изменениями исходной конформации белка – например, формированием плотно упакованных гидрофобных ядер у иммобилизованной инулиназы [40] или с частичным переходом конфигурации пептидной группировки из α -спирали в более плоскую β -структуру у иммобилизованного альбумина [41]. При иммобилизации почвенных ферментов снижение их суммарной активности представляется неизбежным, поскольку на молекулярном уровне оно обусловлено невозможными потерями как правильной конформации, так и способности к необходимым для катализа конформационным изменениям. Однако на уровне целостной системы, в качестве которой можно рассматривать весь почвенный органоминеральный комплекс, потери активности должны в достаточной мере компенсироваться за счет концентрирования ферментативных молекул, прошедших успешную иммобилизацию. Почвенная частица, рассматриваемая в качестве им-

мобилизационной матрицы, характеризуется наличием множества микроскопических зон, каждая из которых, обладая определенным зарядом поверхности, создает локальный эффект распределения для ионов почвенного раствора. Эффект ионного распределения [2] затрагивает важнейшие параметры, влияющие на кинетику ферментативных реакций. Сюда относится рН, концентрация субстрата и продукта реакции, а также концентрация соединений, способных выступать в качестве активаторов или ингибиторов. Кроме того, для ферментов, которые встроены в полимерные матрицы гумусовых кислот, доступ субстрата может быть затруднен за счет диффузионного ограничения [2]. В таком случае, при недостаточной концентрации субстрата, наиболее активные почвенные ферменты не смогут функционировать в оптимальном режиме, а ингибирование их активности, напротив, будет приводить к более эффективному результату ферментативного катализа.

Необходимо отметить, что наиболее распространенные в почвенной энзимологии методы регистрируют ферментативную активность почвы не на молекулярном, а на системном уровне, определяя ее как скорость накопления продукта, образованного в результате функционирования ферментативного пула. В подобных экспериментальных условиях высокая активность определяется прежде всего величиной ферментативного пула и в значительно меньшей степени – кинетическими характеристиками отдельных белковых макромолекул, условия функционирования которых невозможно привести к общему знаменателю без их выделения из почвы и разделения на фракции. В этой связи особенный интерес для почвенной энзимологии представляет вопрос о сохранении фермента в количестве, которое необходимо и достаточно для проявления его активности. Можно полагать, что стабилизированные белки, связанные с гумусовыми полимерами [42], инкапсулированные в макроорганическом веществе или в супрамолекулярных объединениях [43], будут сохраняться в почве при наличии тех же самых условий, которые в целом обеспечивают сохранность почвенного органического вещества. В рамках нового взгляда на динамику почвенного органического вещества, сохранение в почве органического вещества обусловлено не его особыми внутренними свойствами, а тем, что внешние физико-химические, биологические и экологические условия частично или полностью ограничивают скорость разложения органического вещества, обеспечивая, тем самым, его сохранность [44]. Иными словами, сохранение почвенного органического ве-

щества обеспечивается в первую очередь не на молекулярном уровне, а на уровне экосистемы. К числу наиболее распространенных явлений, стабилизирующих почвенное органическое вещество, относится окклюзия – покрытие поверхности органических фрагментов поглощаемыми из раствора минеральными частицами фракций пыли и глины, делающее органическое вещество закрытым для микроорганизмов [45]. Время существования в почве окклюдированного органического вещества на порядок продолжительнее, чем свободного [46]. Это во многом объясняет возможность сохранения внеклеточных почвенных ферментов на протяжении неопределенно длительного времени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В профиле почвы поселения эпохи бронзы обнаружено многократное увеличение фосфатазной активности в культурном слое на глубине 30 см. При этом увеличение уреазной активности выражено в меньшей степени и не совпадало с максимумом фосфатазной активности. Вероятно, возрастание фосфатазной активности связано с большими объемами органического материала, поступавшего в почву поселения в период его активного функционирования. После прекращения функционирования поселения повышенный уровень активности ферментов в почве сохранился на протяжении более 4000 лет.

Фумигация почвенного микробного сообщества хлороформом привела к заметному увеличению как фосфатазной, так и уреазной активности в верхнем горизонте современной почвы, что связано с разрушением микробных клеток и высвобождением внутриклеточных ферментов. В почве поселения эпохи бронзы подобный эффект выявлен в культурном слое с высоким содержанием органического вещества на глубине 15 см, но отсутствовал в целинной палеопочве. По-видимому, на фоне сравнительно невысокой микробной биомассы и при наличии плотных органоминеральных капсул, покрывающих микробные клетки, не происходит их разрушения и высвобождения внутриклеточных ферментов во внешнюю среду.

Активация внеклеточных ферментов глицином в профиле современной почвы вызвала изменения фосфатазной активности, подобные наблюдаемым после фумигации микробных клеток хлороформом. Это может свидетельствовать о том, что в современной почве фосфатазная активность связана как с живыми клетками, так и с внеклеточным пулом фермента. Увеличение уреазной активности в со-

временной почве, как и в культурных слоях эпохи бронзы, при активации глицином значительно выше, чем после фумигации. Максимальные значения уреазной активности выявлены в культурных слоях с высоким содержанием органического углерода. Это может указывать как на сравнительно небольшую численность микроорганизмов, обладающих уреазной активностью, по сравнению с их общей численностью, так и на внклеточную локализацию уреазы и ее связь с органо-минеральными почвенными комплексами.

В палеопочве эпохи бронзы увеличение фосфатазной и уреазной активности после активации глицином при сохранении исходного уровня активности этих ферментов после фумигации указывает, по-видимому, на их преимущественно внклеточную локализацию.

Таким образом, повышенный уровень активности ферментов, инициированный поступлением в почву древних поселений органических субстратов антропогенной природы, способен сохраняться до настоящего времени. В данном случае почвы и культурные слои древних поселений можно рассматривать как уникальный объект для изучения времени и механизмов ферментативной организации почв, исследование которого открывает новые возможности для реконструкции особенностей бытовой и производственной деятельности древнего населения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-18-01406).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ф. Х. Хазиев, *Методы почвенной энзимологии* (Наука, Москва, 2005).
2. М. Тривен, *Иммобилизированные ферменты* (Мир, Москва, 1983).
3. P. Nannipieri, E. Kandeler, and P. Ruggiero, in: *Enzymes in the environment. Activity, ecology and applications*, Ed. by R. G. Burns and R. P. Dick (New York, 2002), pp. 1–33.
4. J. J. Skujins, *Crit. Rev. Microbiol.* **4**, 383 (1976).
5. Т. Е. Хомутова, Т. С. Демкина, Н. Н. Каширская, and V. A. Demkin, *Eurasian Soil Sci.* **45** (4), 423 (2012).
6. Г. В. Добровольский, И. П. Бабьева, Л. Г. Богатырев и др., *Структурно-функциональная роль почв и почвенной биоты в биосфере* (МГУ им. М.В. Ломоносова, Ин-т почвоведения, Москва, 2003).
7. С. А. Сычева, Н. Б. Леонова, А. Л. Александровский и др., *Естественно-научные методы исследования культурных слоев древних поселений* (Москва, 2004).
8. О. Е. Марфенина, *Антропогенная экология почвенных грибов* (Москва, 2005).
9. А. А. Гольева, *Микробиоморфные комплексы природных и антропогенных ландшафтов. Генезис, география, ин-формационная роль* (Ин-т географии, Москва, 2008).
10. Е. В. Чернышева, А. В. Борисов и Д. С. Коробов, *Биологическая память почв и культурных слоев археологических памятников* (ГЕОС, Москва, 2016).
11. А. В. Прохорова и Л. Н. Плеханова, *Проблемы региональной экологии*, № 2, 67 (2016).
12. Н. Н. Каширская и Л. Н. Плеханова, в сб. *Материалы Всероссийской научной конференции «Палеопочвы, палеоэкология, палеоэкономика»*, Под ред. А. В. Борисова, Л. Н. Плехановой и С. Н. Удальцова (Товарищество научных изданий КМК, Пушкино, 2017), сс. 91–93.
13. А. Э. Сидорова, Н. Т. Левашова, А. А. Мельникова и Л. В. Яковенко, *Биофизика* **60** (3), 574 (2015).
14. R. G. Burns, *Soil Biol. Biochem.* **14**, 423 (1982).
15. Д. Г. Звягинцев, И. П. Бабьева и Г. М. Зенова, *Биология почв* (Изд-во МГУ, Москва, 2005).
16. Т. С. Демкина, Т. Э. Хомутова, Н. Н. Каширская и др., *Почвоведение*, № 2, 213 (2010).
17. Г. Н. Федотов, Г. В. Добровольский, В. И. Путляев и др., *Почвоведение*, № 7, 824 (2006).
18. Т. Б. Ермакова и Е. П. Сергеев, в сб. *Структура и динамика молекулярных систем* (Яльчик, 2002), т. 1, сс. 181–185.
19. В. В. Добровольский, *Почвоведение*, № 1, 32 (2004).
20. Г. Н. Курочкина, Д. Л. Пинский, М. Хайнос и др., *Агрохимия*, № 10, 46 (2013).
21. Г. Н. Курочкина, Д. Л. Пинский, Г. Н. Федотов и др., *Почвоведение*, № 8, 993 (2013).
22. Е. В. Дурденко, С. М. Кузнецова, Л. В. Басова и др., *Биофизика* **56** (4), 623 (2011).
23. К. Мартинек, в сб. *Биотехнология*, под ред. А. А. Баева (Наука, Москва, 1984), сс. 93–102.
24. Т. А. Ковалева, В. Г. Артюхов, О. М. Кожокина и др., *Сорбционные и хроматографические процессы* **5** (5), 704 (2005).
25. В. А. Намиот, А. В. Батыновский, И. В. Филатов и др., *Биофизика* **56** (4), 594 (2011).
26. О. М. Полторак и Е. С. Чухрай, *Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия* **11** (3), 133 (1970).
27. В. А. Намиот, А. В. Батыновский, И. В. Филатов и др., *Биофизика* **61** (1), 54 (2016).
28. S. McCracken and E. Meigher, *Methods Enzymol.* **135**, 492 (1987).
29. О. М. Полторак и Е. С. Чухрай, *Журн. физ. химии* **76**, 1836 (2002).
30. Е. С. Чухрай и Л. Ф. Атякшева, *Журн. физ. химии* **84** (5), 805 (2010).
31. Н. А. Кряжевских, *Автореферат дис. ... канд. биол. наук* (Москва, 2013).
32. Е. В. Демкина, Е. Ф. Шаненко, Ю. А. Николаев и Г. И. Эль-Регистан, *Микробиология* **86** (2), 217 (2017).
33. Л. Н. Плеханова и В. В. Ткачев, *Поволжская археология* **4** (6), 225 (2013).

34. E. Kandeler, H. Gerber, *Biol. Fertil. Soils* **6** (1), 68 (1988).
35. A. Margon and F. Fornasier, *Soil Biol. Biochem.* **40**, 2178 (2008).
36. F. Fornasier, J. Ascher, M. T. Ceccherini, et al., *Ecol. Indicators* **45**, 75 (2014).
37. Е. А. Дмитриев, *Математическая статистика в почвоведении* (Изд-во МГУ, Москва, 1995).
38. P. C. Brookes, D. S. Powlson, and D. S. Jenkinson, *Soil Biol. Biochem.* **14**, 319 (1982).
39. Н. Н. Каширская, Т. Э. Хомутова, В. В. Дмитриев и др., *Почвоведение*, № 10, 1229 (2010).
40. М. Г. Холявка, Т. А. Ковалева, С. И. Карпов и др., *Биофизика* **59** (2), 274 (2014).
41. Н. А. Эльтекова, Н. П. Соколова, А. М. Горбунов и А. Ю. Эльтеков, *Физикохимия поверхности и защита материалов* **49** (4), 397 (2013). DOI: 10.7868/S0044185613040037.
42. Ф. Х. Хазиев, *Системно-экологический анализ ферментативной активности почв* (Наука, Москва, 1982).
43. J. E. Tomaszewski, R. P. Schwarzenbach, and M. Sander, *Environ. Sci. Technol.* **45**, 6003 (2011).
44. M. W. I. Schmidt, M. S. Torn, S. Abiven, et al., *Nature* **478**, 49 (2011).
45. В. М. Семенов, А. С. Тулина, Н. А. Семенова и Л. А. Иванникова, *Почвоведение*, № 4, 393 (2013). DOI: 10.7868/S0032180X13040114.
46. M. Von Lützw, I. Kögel-Knabner, B. Ludwig, et al., *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **171**, 111 (2008).

Mechanisms and Time Factor of Paleosol Enzyme Groups

N.N. Kashirskaya, L.N. Plekhanova, S.N. Udaltsov, E.V. Chernysheva, and A.V. Borisov

*Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 2, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

The article presents the results of studies on the enzymatic activity in paleosols at archaeological sites. It is shown that in the soils of ancient settlements, the activities of phosphatase and urease activity are much higher than those of modern soils. In the cultural layers of the Bronze Age, urease activity in some cases exceeded the background value by 1.5–2 times compared to that in modern soils, and an elevation of phosphatase activity to as much as 7 to 15 times has been recorded. This is due to the large amount of organic materials (food waste, household garbage, excrement, urea) deposited in soil in ancient times and caused an increase in the activity of enzymes which have been preserved for 4000 years. Chloroform fumigation and activation of extracellular enzymes by glycine were performed to detect enzyme localization. Intracellular enzymes are released following fumigation leading to a marked increase in phosphatase activity in the paleosols of ancient settlements, while no such effect was found in the buried virgin Bronze Age paleosols. Activation by glycine less affected the activity of phosphatase, but caused a significant increase in urease activity. This may indicate a predominantly extracellular localization of urease in paleosols of the ancient settlements, while phosphatase has both extracellular and intracellular localization.

Keywords: enzymes, microorganisms, urease, phosphatase, soils, ancient settlements, organic substrates