

ENZYMY WEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH PRZEMIAN REDOKS (OKYDOREDUKTAZY)

Małgorzata Brzezińska, Teresa Włodarczyk

Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN, ul. Doświadczalna 4, 20-270 Lublin 27
e-mail: mbrzez@demeter.ipan.lublin.pl

Streszczenie. Aktywność oksydoreduktaz w glebie związana jest z metabolizmem oddechowym glebowych drobnoustrojów. Dehydrogenazy, aktywne w komórkach wszystkich mikroorganizmów glebowych, katalizują utlenianie związków organicznych. Funkcja katalazy związana jest z ochroną komórki przed toksycznym działaniem nadtlenu wodoru, produktu ubocznego przemian zachodzących w warunkach tlenowych.

Słowa kluczowe: gleba, dehydrogenaza, katalaza

Oksydoreduktazy tworzą klasę enzymów (EC 1) o wysokiej specyficzności, katalizujących reakcje oksydoredukcyjne zachodzące w każdej żywej komórce.

Dehydrogenazy

Dehydrogenazy stanowią liczną grupę oksydoreduktaz zlokalizowanych w cytoplazmie lub specyficznych strukturach, utworzonych z błon cytoplazmatycznych. Katalizują utlenianie związków organicznych przez odłączenie od nich elektronów i protonów. W warunkach tlenowych są one przenoszone poprzez szereg pośredników na elementy łańcucha oddechowego i ostatecznie na O₂. W warunkach beztlenowych funkcję końcowego akceptora pełnią dostępne, utlenione formy nieorganiczne NO₃⁻, Mn(IV), Fe(III), SO₄⁻², CO₂ (oddychanie beztlenowe) lub związki organiczne (fermentacja). Niezależnie od stanu natlenienia gleby, dehydrogenazy są więc elementem metabolizmu oddechowego, ściśle związanego z wytwarzaniem energii biologicznie dostępnej (ATP) [1]. Za pośrednictwem koenzymów dehydrogenaz (NAD i NADP), protony odłączone od utlenianych substratów uczestniczą również w procesach biosyntezy.

Aktywność dehydrogenaz w glebie związana jest z czynnością wielu enzymów (dehydrogenaz) lub systemów enzymatycznych, powszechnie występujących w drobnoustrojach glebowych [42,52]. Czynne dehydrogenazy występują w glebie jako integralna część nienaruszonych komórek. Oznaczenie aktywności tych enzymów w glebie jest zatem wskaźnikiem intensywności metabolizmu oddechowego mikroorganizmów glebowych, głównie bakterii i promieniowców [11,32,33,40]. Wykazano, że zmiana stanu natlenienia gleby istotnie modyfikuje aktywność dehydrogenaz glebowych [9,10,22,50,51,53,59].

Szczególne znaczenie dehydrogenaz dla funkcjonowania mikroorganizmów glebowych sprawia, że wskaźnik ten jest powszechnie stosowany w określaniu aktywności biologicznej gleby. Obserwowano ścisłą zależność pomiędzy aktywnością dehydrogenaz oraz zawartością materii organicznej, żyznością gleby i liczebnością drobnoustrojów glebowych, a także aktywnością proteolityczną, nityfikacją, respiracją (pochłanianiem O_2 , wydzielaniem CO_2) i denityfikacyjną oraz czynnością innych enzymów obecnych w glebie, m.in. fosfatazy kwaśnej i alkalicznej, sulfatazy, β -glukozydazy, katalazy, amylazy, sacharazy [3,7,8,16,19,27,29,30,36,37,43,47,56,58,60].

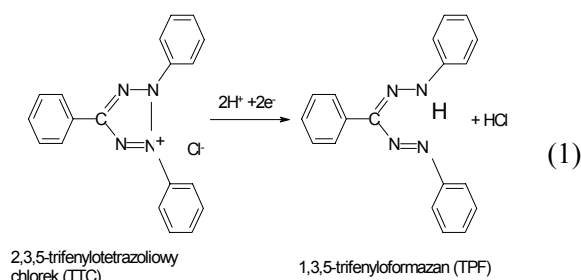
Metoda z wykorzystaniem TTC: Casida i in. [14]

Podstawy oznaczeń

Metoda polega na inkubacji gleby z bezbarwnym, rozpuszczalnym w wodzie substratem, TTC (2,3,5-trifenyloitetrazoliowy chlorek), który jest redukowany enzymatycznie do barwnego, nierozpuszczalnego w wodzie trifenyloformazanu (TPF). Zastępując tlen oraz inne naturalnie występujące akceptory, TTC przejmuje elektrony i protony, odłączone przez dehydrogenazy od utlenianych związków organicznych. Po inkubacji formazan jest ekstrahowany z gleby alkoholem i oznaczany kolorymetrycznie.

Zgodnie z założeniem metody, reakcja przeprowadzana jest w warunkach zbliżonych do naturalnych, dlatego odczyn gleby regulowany jest węglanem wapnia, a nie buforem. Miarą aktywności dehydrogenaz w glebie jest ilość wytworzonego formazanu przez jednostkę masy gleby w jednostce czasu.

Reakcja redukcji TTC:



Sprzet

1. Szafa termostatowana (inkubacja w temperaturze 30°C),
2. Spektrofotometr (odczyt przy długości fali $\lambda = 485 \text{ nm}$),
3. Dozownik przystosowany do kontaktu z alkoholem (lub cylinder szklany 25 cm³).

Odczynniki

1. 3% (w/v) wodny roztwór TTC (cz.d.a.). TTC należy przechowywać w lodówce. Bezpośrednio przed inkubacją przygotowywać potrzebną ilość roztworu TTC,
2. Węglan wapnia strącony CaCO₃ (cz.d.a.),
3. Etanol (cz.d.a.),
4. Trifenyloformazan (TPF, cz.d.a.) do sporządzenia krzywej wzorcowej.

Postępowanie w oznaczeniu

W zależności od celu oznaczenia aktywności dehydrogenaz, gleba może być świeża, sucha powietrznie, lub preinkubowana na płytach ssących. Aktywność dehydrogenaz jest istotnie determinowana przez aktualne warunki fizyczne, dlatego materiał glebowy przeznaczony do badań porównawczych powinien być przechowywany w takich samych warunkach wodno-powietrznych.

Do szklanej kolbki erlenmayerki o pojemności 50 cm³ odważyć 6 g gleby przesianej przez sito o oczkach średnicy 2 mm, pozbawionej korzeni i o oznaczonej wilgotności. Dodać 60 mg CaCO₃ oraz 2-4 cm³ wody destylowanej*. Dodać 1 cm³ substratu (3% TTC), kolbkę szczelnie zamknąć i bardzo starannie, lecz ostrożnie wymieszać glebę z TTC. Zawiesina glebowa powinna pozostawać na dnie kolbki, a nie na ściankach. Wstawić do szafy termostatowanej nagrzanej do temperatury 30°C na 20 godzin. Po zakończeniu inkubacji dozować 25 cm³ etanolu. Ponownie szczelnie zamknąć (możliwie jak najszybciej) i kilkakrotnie, energicznie wstrząsnąć. Kolbkę umieścić w ciemnym pomieszczeniu, pozostawić na 1 godzinę. Następnie zawartość kolbki energicznie, kilkakrotnie zamieszać i przesączyć przez twardy sączek (np. Filtrak nr 390). Bezpośrednio po przesączeniu mierzyć absorbancję ($\lambda = 485 \text{ nm}$) wobec etanolu.

*Ilość dodanej wody należy ustalić, biorąc pod uwagę wilgotność gleby (2 cm³ wody w przypadku gleby bardzo wilgotnej, 4 cm³ – dla gleby suchej powietrznie). Zbyt duża ilość wody spowoduje niepotrzebne rozcieńczenie alkoholu ekstrahującego wytworzony formazan. Objętość dodanej wody uwzględniona zostanie w obliczeniach. Po uzupełnieniu wszystkich odczynników, nad powierzchnią gleby powinna pozostawać kilkumilimetrowa warstwa roztworu, znacznie zmniejszająca dyfuzję tlenu.

Próby kontrolne

1. Równolegle wykonać próbę kontrolną gleby bez dodatku TTC,
2. Dalsze postępowanie jak z próbą badaną.

Uwagi do metody

1. Pomiary wykonywać w trzech powtórzeniach,
2. Wszystkie czynności należy wykonywać przy przesłoniętych oknach z uwagi na znaczną wrażliwość odczynników na światło,
3. Przesącze zawierające wysokie stężenia TPF należy rozcieńczyć alkoholem, rozcieńczenie uwzględnić przy obliczeniach aktywności,
4. Etanol można zastąpić etanolem skażonym acetonem lub metanolem (**TRUCIZNA**),
5. Dehydrogenazy są enzymami aktywnymi przede wszystkim w żyjących komórkach drobnoustrojów glebowych. Dlatego metoda nie uwzględnia stosowania toluenu (jak w przypadku zewnątrzkomórkowych hydroliz). Jednak oznaczenie aktywności dehydrogenaz w glebach niedotlenionych (bardzo wilgotnych lub zalanych wodą) powinno obejmować również próby sterylizowane, ze względu na możliwość chemicznej (abiotycznej) redukcji TTC przez formy zredukowane, obecne w glebie. Zaleca się np. 2-3 krotne autoklawowanie gleby przed dodaniem TTC. Jednokrotny zabieg sterylizacji może nie być całkowicie skuteczny. Zatem w trakcie długiej (20 godz.) inkubacji, zniszczone komórki stają się łatwo dostępnym źródłem węgla i azotu dla tych drobnoustrojów, które przeżyły,
6. Zastrzeżenia budzi niepełne wykorzystanie TTC, a także możliwość redukcji abiotycznej TTC [1,21].

Krzywa wzorcowa dla TPF

100 mg formazanu rozpuścić w około 80 cm³ etanolu, w razie potrzeby delikatnie podgrzać na łaźni wodnej do rozpuszczenia substancji, ostudzić do temperatury pokojowej i uzupełnić etanolem do 100 cm³ w kolbie miarowej. Przenieść 25 cm³ powstałego roztworu do kolby miarowej 500 cm³, dopełnić etanolem do kreski. W otrzymanym roztworze podstawowym stężenie TPF wynosi 50 µg·cm⁻³. Następnie odmierzyć 1, 3, 5, 10, 20, 30 i 40 cm³ roztworu podstawowego do kolb miarowych o pojemności 100 cm³, uzupełnić alkoholem do kreski. Stężenia powstałych wzorców wynoszą odpowiednio 0,5; 1,5; 2,5; 5; 10; 15 i 20 µg·cm⁻³. Wykonać pomiary absorbancji ($\lambda = 485 \text{ nm}$) wobec etanolu. Wyznaczyć krzywą wzorcową.

Obliczanie wyników

Odczytać stężenie formazanu w roztworach badanych korzystając z krzywej wzorcowej, z równania zależności stężenia TPF od absorbancji lub za pomocą współczynnika kalibracji [63].

Aktywność dehydrogenaz obliczyć według wzoru:

$$\mu\text{mol TPF} \cdot \text{g}^{-1} \text{ s.m.} \cdot 20\text{h}^{-1} = \frac{(S - C) \cdot V \cdot 100}{6 \cdot 300,4 \cdot \% \text{ s.m.}} \quad (2)$$

$\mu\text{mol TPF} \cdot \text{g}^{-1} \text{ s.m.} \cdot 20 \text{ h}^{-1}$ – jednostka aktywności dehydrogenaz w glebie (ilość trifenyloformazanu wytworzona przez 1 g s.m. gleby w ciągu 20 godzin),

S – stężenie TPF w próbce badanej ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$),

C – odczyt z krzywej wzorcowej dla próby kontrolnej bez TTC ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$),

V – łączna objętość (cm^3) dodanych roztworów (tzn. roztworu TTC, wody i alkoholu),

6 – naważka gleby (g),

300,4 – masa cząsteczkowa TPF,

100·%⁻¹ s.m. – współczynnik przeliczeniowy na suchą masę próbki.

Modyfikacje metody z TTC

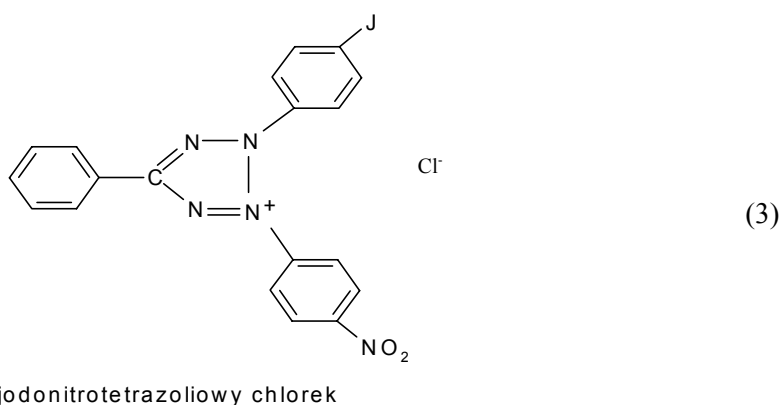
Metoda z TTC była stosunkowo często modyfikowana. Zmiany dotyczą czasu inkubacji (1-24 godz.), stężenia TTC, naważki gleby (1-10g), temperatury inkubacji (30-37°C). Aktywność dehydrogenaz w glebie przedstawiana jest w literaturze w różnych jednostkach (np. $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot 24 \text{ h}^{-1}$, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot 20 \text{ h}^{-1}$, $\text{mg} \cdot 100 \cdot \text{g}^{-1} \cdot 24 \text{ h}^{-1}$).

1. Friedel i in. [20], Alef [1], Öhlinger [39] zalecają wybór optymalnego stężenia TTC w zakresie od 1 mg TTC·g⁻¹ gleby (dla gleb piaszczystych) do 20 mg TTC·g⁻¹ gleby (dla gleb organicznych). Zbyt wysokie stężenie TTC hamuje szybkość reakcji,
2. Ross [42] – bufor TRIS lub TES, krótszy czas inkubacji (1-2 godz.). Aktywność dehydrogenaz wykazuje maksimum przy pH 7-7,8,
3. Casida [13] – 6 godzinna inkubacja z dodatkiem glukozy i ekstraktu drożdżowego. Dodatkowe źródło węgla i energii zwiększa aktywność dehydrogenaz, może jednak wystąpić stymulacja określonej grupy drobnoustrojów.

Metoda z wykorzystaniem INT: Friedel i in. [20]

Podstawy oznaczeń

Założenia metody podobne są do opisanych powyżej. Substrat reakcji – INT (2-p-jodofenilo-3-p-nitrofenilo-5-fenylotetrazoliowy chlorek) ulega redukcji do barwnego INTF (jodonitrofeniloformazanu).



Sprzęt

1. Łaźnia wodna przystosowana do umieszczenia kompletu probówek (46°C, wytrząsarką 250 min⁻¹),
2. Butla z azotem do wymiany powietrza w probówkach,
3. Spektrofotometr (odczyt przy długości fali $\lambda = 487$ nm),
4. Mikro-wytrząsarka typu Vortex,
5. Wytrząsarka przystosowana do umieszczenia kompletu probówek,
6. Dozownik przystosowany do kontaktu z tetrahydrofuranem (10 cm³).

Odczynniki

1. 0,1 M bufor Tris (pH 7,4). Rozpuścić 12,11 g Tris (hydroksymetylo)amino-metan, cz.d.a. w 700 cm³ wody destylowanej, doprowadzić odczyn roztworu do wartości pH 7,8 (gleby kwaśne o pH<6), pH 7,6 (gleby obojętne o pH 6-7), pH 7,4 (gleby alkaliczne o pH>7). Następnie dopełnić wodą destylowaną w kolbie miarowej do objętości 1000 cm³,
2. 1% (w/v) roztwór INT-Tris. 1 g INT (cz.d.a.) rozpuścić w ciepłym buforze Tris (około 50°) do objętości 100 cm³ roztworu. INT jest bardzo trudno rozpuszczalny. Rozpuszczalność można zwiększyć, korzystając z ultradźwięków,

3. Tetrahydrofuran (cz.d.a.) **TRUCIZNA**,
4. Aceton (cz.d.a.),
5. INTF (cz.d.a.) do sporządzenia krzywej wzorcowej.

Postępowanie w oznaczeniu

Odważyć 2,5 g gleby (przesianej przez sito o oczkach średnicy 2 mm i o oznaczonej wilgotności) do szklanej probówki o pojemności 20 cm³. Materiał glebowy nie może zawierać nawet drobnych korzeni roślin (informacja o wymaganej wilgotności gleby – jak w metodzie z TTC). Dodać 2,5 cm³ substratu – przygotowanego roztworu INT-Tris. Wymienić powietrze w probówce na czysty azot, natychmiast szczelnie zamknąć i dokładnie wymieszać zawartość probówek, umieszczając probówkę na 10 s na mikro-wytrząsarce. Probówkę z zawiesiną glebową wstawić do nagrzanej łaźni wodnej (o temperaturze 46°C). Inkubację prowadzić w ciemności, przez 4 godziny. Po zakończeniu inkubacji dodać ostrożnie, pod dygestorium, 10 cm³ tetrahydrofuranu, ponownie (możliwie jak najszybciej) szczelnie zamknąć. Zawartość probówki dokładnie wymieszać na mikro-wytrząsarce (10 s). Następnie umieścić probówkę w wytrząsarce w zaciemnionym pomieszczeniu o temperaturze pokojowej na 2 godziny. Po upływie wymaganego czasu, przesączyć zawartość probówki do kolbki o pojemności 50 cm³ przez twardy sączek (np. Filtrak nr 390) pod dygestorium. Następnie wciąż pod dygestorium odmierzyć 1 cm³ filtratu, dodać 7 cm³ acetonu. Bezpośrednio po przesączeniu mierzyć absorbancję ($\lambda = 487 \text{ nm}$) wobec wody.

Próby kontrolne

Równoległe, w ten sam sposób, przygotować kontrolę gleby z buforem TRIS, bez dodatku INT. Dalsze postępowanie jak z próbą badaną.

Uwagi do metody

1. Tetrahydrofuran jest toksyczny, należy pracować w rękawiczkach, **POD DYGESTORIUM**. Sączki wraz z osadem pozostawić pod wyciągiem do wyschnięcia,
2. Możliwie wszystkie czynności wykonywać przy zaciemnieniu pomieszczenia,
3. Materiał glebowy nie powinien zawierać nawet drobnych korzeni roślin,
4. Przesącze zawierające wysokie stężenia INTF należy rozcieńczyć acetonem (aceton jest mniej toksyczny, niż tetrahydrofuran),

5. Alef [1] i von Mersi [57] zalecają dawkę 10 mg INT·g⁻¹ gleby, natomiast Spothelfer-Magaña, Thalmann [49], Friedel i in. [20] – wybór optymalnego stężenia indywidualnie dla każdej gleby (10-20 mg INT·g⁻¹ gleby),
6. Podobnie jak w metodzie z TTC, oznaczenie aktywności dehydrogenaz w glebach niedotlenionych (bardzo wilgotnych lub zalanych wodą) powinno obejmować również próby sterylizowane, ze względu na możliwość chemicznej (abiotycznej) redukcji INT przez formy zredukowane obecne w glebie,
7. Pomiary wykonywać w trzech powtórzeniach, kontrole bez INT – w dwóch powtórzeniach.

Krzywa wzorcowa dla INTF

Rozpuścić 40 mg INTF w 100 cm³ tetrahydrofuranu (w kolbie miarowej, pod dygestorium). Pobrać do probówek po 0, 1, 2, 4, 5, 6 cm³ otrzymanego roztworu, uzupełnić tetrahydrofuranem do 10 cm³ (odpowiednio 10, 9, 8, 6, 5, 4 cm³ tetrahydrofuranu) oraz dodać do każdej probówki 2,5 cm³ buforu Tris. Dokładnie wymieszać. Pobierać do innego kompletu probówek po 1 cm³ przygotowanych roztworów, następnie rozcieńczyć acetonem (1 cm³ roztworu INTF + 7 cm³ acetonu). Dokładnie zamieszać, zmierzyć absorbancję przy długości fali $\lambda = 487$ nm wobec wody destylowanej. Stężenie INTF w powstałych wzorcach wynosi odpowiednio 0, 4, 8, 16, 20 i 24 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Wyznaczyć krzywą wzorcową.

Obliczanie wyników

Odczytać stężenie INTF w otrzymanych przesączach. Aktywność dehydrogenaz metodą z INT obliczyć według wzoru:

$$\mu\text{mol INTF} \cdot \text{g}^{-1} \text{ s.m.} \cdot 4 \text{ h}^{-1} = \frac{(S - C) \cdot 12,5 \cdot 8 \cdot 100}{471,3 \cdot 2,5 \cdot \% \text{ s.m.}} \quad (4)$$

$\mu\text{mol INTF}\cdot\text{g}^{-1} \text{ s.m.}\cdot 4 \text{ h}^{-1}$ – jednostka aktywności dehydrogenaz w glebie (ilość $\mu\text{mol INTF}$ wytworzona przez 1 g s.m. gleby w ciągu 4 godzin),

S – stężenie INTF w próbce badanej ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$),

C – odczyt z krzywej dla próby kontrolnej bez INT ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$),

12,5 – łączna objętość dodanych roztworów, tzn. INTF-Tris, tetrahydrofuran (cm³),

8 – mnożnik uwzględniający rozcieńczenie przesączu acetonem,

471,3 – masa cząsteczkowa INTF,

2,5 – naważka gleby (g),

100·%⁻¹ s.m. – współczynnik przeliczeniowy na suchą masę próbki.

Sole tetrazoliowe, do których należą TTC i INT, są powszechnie stosowane w biochemii, mikrobiologii, naukach medycznych do oznaczania aktywności dehydrogenaz i innych systemów enzymatycznych, związanych z reakcjami redoks (<http://www.serva.de/products/latest/tetrazolium.shtml>). Ze względu na znaczenie informacji, jakich dostarcza oznaczenie aktywności dehydrogenaz w glebie, wskaźnik ten jest często stosowany i weryfikowany. Zastrzeżenia budzi niepełne wykorzystanie zastosowanych substratów, a także możliwość ich redukcji abiotycznej [1,21]. Badania porównawcze z zastosowaniem TTC i INT prowadzili m.in. Trevors [55], Friedel i in. [20], Gong [24]. TTC został wprowadzony do określania aktywności dehydrogenaz w glebie przez Lenharda w 1956 r. [33], natomiast INT jako pierwszy zastosowali Benefield i in. w 1977 r. [6].

KATALAZA (EC 1.11.1.6)

Katalaza (oksydoreduktaza $H_2O_2:H_2O_2$) katalizuje rozkład nadtlenu wodoru do wody i tlenu cząsteczkowego (5)



Funkcja katalazy jest bardzo cenna dla komórki. Naturalny substrat enzymu, H_2O_2 , powstaje w trakcie metabolizmu oddechowego jako produkt uboczny czynności pewnych oksydoreduktaz (dysmutazy ponadtlenu i niektórych oksydaz), i stanowi jedną z reaktywnych postaci tlenu – silnie utleniającą i łatwo reagującą z białkami, DNA i innymi składnikami komórek. Prawdopodobnie bez przeszkód pokonując błony komórkowe, H_2O_2 powoduje nieodwracalne uszkodzenia struktur biologicznych [25].

Enzym ten jest bardzo aktywny katalitycznie, reaguje z H_2O_2 około 10 000 razy szybciej, niż np. peroksydazy roślinne. W ciągu sekundy cząsteczka katalazy rozkłada około 200 000 cząsteczek nadtlenu wodoru [4]. Katalaza wykazuje pewne właściwości peroksydazowe, utleniając takie substancje jak metanol, etanol, mrówczan, chinony, związki fenolowe ($AH_2 + H_2O_2 \rightarrow A + 2H_2O$, gdzie AH_2 – zredukowany substrat) [4,15,31].

Mikroorganizmy posiadają pojedynczą katalazę produkowaną konstytutywnie lub kilka (2-6) izozymów, których synteza jest ściśle zależna od fazy wzrostu populacji [61]. Niektóre drobnoustroje (np. *Escherichia coli*) produkują specyficzne enzymy o podwójnej aktywności katalazy i peroksydazy (katalazoperoksydazy), charakteryzujące się zmienioną wrażliwością na temperaturę, inhibitory oraz innym optimum pH [4,17,18,31,34,46].

Szeroko rozpowszechniona wśród organizmów żywych, katalaza występuje w mikroorganizmach, roślinach i zwierzętach. W środowisku glebowym obecna

jest w komórkach wszystkich drobnoustrojów, wykorzystujących tlen do procesów oddechowych (tlenowce, beztlenowce fakultatywne). Beztlenowce obligatoryjne wykazują bardzo niską aktywność katalazy, lub jej brak [18].

Katalaza jest przede wszystkim enzymem wewnątrzkomórkowym, pełniącym istotną funkcję ochronną w odniesieniu do substancji (H_2O_2) wytwarzanej w cytoplazmie i peroksysomach. Pewne badania wskazują na możliwość występowania katalazy zewnątrzkomórkowej. Ta forma enzymu przejawia niski poziom aktywności – poniżej 2% aktywności całkowitej [18,62]. Enzym uwolniony z komórki wykazuje jednak w glebie znaczną stabilność dzięki sorpcji na powierzchni minerałów ilastych oraz asocjacji z glebowym koloidem organicznym [12,45,48].

Wykazano istotne dodatnie korelacje pomiędzy aktywnością katalazy w glebie i zawartością materii organicznej, biomasą, pochłanianiem O_2 , wydzielaniem CO_2 , a także aktywnością dehydrogenaz, amidazy glukozydazowej, fosfo-diesterazy [16,19,25,41,50]

Metoda manganometryczna: Johnson i Temple [28]

Podstawy oznaczeń

Metoda polega na odmiareczkowaniu nadtlenu wodoru pozostałego w glebie po inkubacji, tzn. nie rozłożonego przez katalazę zawartą w badanej próbce glebowej. Miareczkowanie przeprowadza się nadmanganianem potasu w środowisku kwaśnym (równanie 6).



Miarą aktywności katalazy jest ilość H_2O_2 rozłożonego przez enzymy obecne w glebie (lub ilość $KMnO_4$ równoważąca rozłożony H_2O_2).

Sprzet

1. Biureta automatyczna lub szklana ($25-50\text{ cm}^3$),
2. Wytrząsarka rotacyjna (30 obrotów na minutę) dostosowana do naczyń o pojemności około 100 cm^3 .

Odczynniki

1. $0,3\%$ H_2O_2 (v/v) – 30% H_2O_2 (cz.d.a.) rozcieńczyć wodą destylowaną w kolbie miarowej w stosunku 1:100 (np. 5 cm^3 przenieść do kolby o pojemności 500 cm^3 , dopełnić do kreski). Do każdej serii analiz należy przygotować świeży roztwór,

2. 1,5 M (3 N) H_2SO_4 – 84,6 cm^3 stężonego (95%) H_2SO_4 (cz.d.a.) powoli przenieść do kolby miarowej o pojemności 1000 cm^3 , wypełnionej do połowy wodą destylowaną, ostrożnie zamieszać. Po ostygnięciu dopełnić wodą destylowaną do kreski,
3. 0,02 M (0,1 N) $KMnO_4$ – zawartość odważki analitycznej w ampulce (3,161 g $KMnO_4$) przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 1000 cm^3 . Uzupełnić wodą destylowaną do kreski. Przygotowany roztwór odstawić na 3 tygodnie, po czym przesączyć. Przechowywać w ciemności [35].

Postępowanie w oznaczeniu

Do plastikowego naczynia o pojemności około 100 cm^3 naważyć 2 g gleby przesianej przez sito o oczkach średnicy 2 mm (suchej powietrznie lub o oznaczonej wilgotności). Dodać 40 cm^3 wody destylowanej, a następnie 5 cm^3 substratu (0,3% H_2O_2). Naczynie dokładnie zamknąć i umieścić w mieszkadle obrotowym. Mieszać przez 20 minut w temperaturze pokojowej ($20 \pm 2^\circ C$). Dodać 5 cm^3 1,5 M H_2SO_4 i zawartość butelki energicznie zamieszać. Przesączyć przez twardy sączonek (np. Filtrak nr 390) do szklanej kolbki o pojemności 50 cm^3 . Z otrzymanego klarownego przesączonek odmierzyć 25 cm^3 do czystej kolbki i miareczkować roztworem 0,02 M $KMnO_4$ do jasnoróżowego zabarwienia, utrzymującego się co najmniej 10 sek.

Próby kontrolne

Równoległe wykonać próbę kontrolną bez gleby, postępując jak z próbą badaną.

Obliczanie wyników

Dla określenia aktywności katalazy należy wyznaczyć ilość nadtlenu wodoru, rozłożonego w trakcie inkubacji przez enzymy obecne w glebie. W tym celu od objętości $KMnO_4$ potrzebnej do zmiareczkowania całości dodanego H_2O_2 należy odjąć objętość $KMnO_4$ zużytą do zmiareczkowania H_2O_2 nie rozłożonego przez enzymy (czyli nadmiaru pozostałego w przesączonek glebowym). Przyjęcie teoretycznej wartości dla próby zerowej (ilości $KMnO_4$ potrzebnej do zmiareczkowania całości H_2O_2 , wyznaczonej na podstawie równania reakcji i zastosowanych stężeń) pozwala na eliminację błędów, jaki można popełnić przygotowując roztwory. Następnie, stosując odpowiednie przeliczenia, określa się ilość przekształconego substratu (H_2O_2):

$$\mu mol H_2O_2 \cdot g^{-1} s.m. \cdot min^{-1} = \frac{4,4(1 - \frac{V}{V_0}) \cdot 2 \cdot 50 \cdot 100}{2 \cdot 20 \cdot \% s.m.} \quad (7)$$

$\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{ s.m.} \cdot \text{min}^{-1}$ – jednostka aktywności katalazy w glebie (ilość $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ rozłożona przez 1 g s.m. gleby w ciągu 1 min.),

$4,4(1 - V/V_o)$ – ilość $\text{cm}^3 \text{KMnO}_4$ równoważąca rozkład H_2O_2 w trakcie inkubacji, 4,4 – teoretycznie wyznaczona ilość $\text{cm}^3 0,02 \text{ M KMnO}_4$, potrzebna do zmiareczkowania H_2O_2 zawartego w próbie zerowej. Znając ilość dodanego H_2O_2 (5 cm^3 roztworu o stężeniu $0,088 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-3} = 0,44 \text{ mM}$), stężenie roztworu KMnO_4 ($0,02 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-3}$) i stosunek reagujących substancji $\text{KMnO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ (1:2,5), można wyliczyć objętość KMnO_4 , potrzebną do zmiareczkowania dodanego H_2O_2 . Wynosi ona $8,8 \text{ cm}^3$. Ponieważ miareczkowana jest połowa objętości próby zerowej (podobnie jak przesączu glebowego), teoretycznie wyznaczona ilość KMnO_4 we wzorze (3) wynosi $4,4 \text{ cm}^3$ [23],

V_o – zmierzona objętość (cm^3) $0,02 \text{ M KMnO}_4$ potrzebna do zmiareczkowania 25 cm^3 próby kontrolnej bez gleby,

V – objętość (cm^3) $0,02 \text{ M KMnO}_4$ potrzebna do zmiareczkowania 25 cm^3 przesączu badanej próbki glebowej,

2 – mnożnik uwzględniający całą objętość przesączu (miareczkowana jest $\frac{1}{2}$ objętości),

50 – współczynnik umożliwiający przeliczenie $\text{cm}^3 \text{KMnO}_4$ na $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$. Stosunek molowy reagujących substancji w środowisku kwaśnym ($\text{KMnO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$) wynosi 1:2,5. Ponieważ 1 cm^3 roztworu $0,02 \text{ M KMnO}_4$ zawiera $20 \mu\text{M KMnO}_4$, zatem $1 \text{ cm}^3 0,02 \text{ M KMnO}_4$ odpowiada $50 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$,

2 – (w mianowniku) naważka gleby inkubowanej z H_2O_2 (g),

20 – czas inkubacji gleby z H_2O_2 (min),

$100 \cdot \%^{-1} \text{ s.m.}$ – współczynnik przeliczeniowy na suchą masę próbki.

Uwagi

1. Wszystkie pomiary wykonać w trzech powtórzeniach,
2. Russel [44] zaleca wykonanie dodatkowego oznaczenia w czasie zerowym – miareczkowanie bezpośrednio po dodaniu H_2O_2 (kontrola reakcji składników gleby z H_2O_2),
3. Trasar-Cepeda i in. [54] zalecają wprowadzenie dodatkowej próby kontrolnej bez dodatku H_2O_2 (kontrola reakcji składników gleby z KMnO_4).

Metoda gazometryczna: Beck [5]

Metoda oparta jest na określeniu objętości tlenu wydzielonego w wyniku aktywności katalazy w trakcie inkubacji próbki glebowej z H_2O_2 [2,38,44].

Metoda kolorymetryczna: Holz [26]

W zaproponowanej metodzie H_2O_2 pozostały w przesączu po inkubacji, zostaje poddany działaniu peroksydazy, powodującej rozkład H_2O_2 . Wydzielony tlen wywołuje określoną reakcję barwną [54]. Autorzy wykazali istotną korelację pomiędzy aktywnością mierzoną metodą kolorymetryczną i manganometryczną.

PIŚMIENNICTWO

1. **Alef K.:** Dehydrogenase activity. In: *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry* (Eds K. Alef, P. Nannipieri). London, Academic Press, 228-231, 1995.
2. **Alef K., Nannipieri P.:** Catalase activity. In: *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry* (Eds K. Alef, P. Nannipieri). London, Academic Press, 362-363, 1995.
3. **Baran S., Bielińska J.E., Oleszczuk P.:** Enzymatic activity in an airfield soil polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Geoderma*, 118, 221-232, 2004.
4. **Bartosz G.:** Druga twarz tlenu, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 135-199, 1995.
5. **Beck Th.:** Die Messung der Katalaseaktivität von Böden. *Z. Düng. Bodenk.*, 130, 68-81, 1971.
6. **Benfield C.B., Howard P.J.A., Howard D.M.:** The estimation of dehydrogenase activity in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 9, 67-70, 1977.
7. **Bielińska E.J.:** Aktywność enzymatyczna gleby w sadzie wiśniowym w zależności od metody jej pielęgnacji. *Rozprawy Naukowe AR Lublin, Zesz. 251*. Wydawnictwo AR Lublin, 2001.
8. **Bolton H. Jr., Smith J.L., Link S.O.:** Soil microbial biomass and activity of a disturbed and undisturbed shrub-steppe ecosystem. *Soil Biol. Biochem.*, 25, 5, 545-552, 1993.
9. **Brzezińska M., Stępniewska M., Stępniewski W.:** Soil oxygen status and dehydrogenase activity. *Soil Biol. Biochem.*, 30, 1783-1790, 1998.
10. **Brzezińska M., Stępniewska Z., Stępniewski W., Włodarczyk T., Przywara G., Bencicelli R.:** Effect of oxygen deficiency on soil dehydrogenase activity (pot experiment with barley). *Int. Agro-physiology* 15, 3-7, 2001.
11. **Burns R.G.:** *Soil Enzymes*. Academic Press. New York, 1978.
12. **Calamai L., Lozzi I., Stotzyk G., Fusi P., Ristori G.G.:** Interaction of catalase with montmorillonite homoionic to cations with different hydrophobicity: effect on enzyme activity and microbial utilization. *Soil Biol. Biochem.*, 32, 815-823, 2000.
13. **Casida L.E. Jr.:** Microbial metabolic activity in soil as measured by dehydrogenase determination. *Appl. Environ. Microbiol.*, 34, 630-636, 1977.
14. **Casida L.E. Jr., Klein D.A., Santoro T.:** Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci.*, 98, 371-376, 1964.
15. **Cherry J.R.:** Directed evolution of microbial oxidative enzymes. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 11, 250-254, 2000.
16. **Dinesh R., Chamdhuri S.G., Sheeja T.E.:** Soil biochemical and microbial indices in wet tropical forests: Effect of deforestation and cultivation. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 167, 24-32, 2004.
17. **Donald L.J., Krokhin O.V., Duckworth H.W., Wiseman B., Deemagarn T., Singh R., Switala J., Carpena X., Fita I., Loewen P.C.:** Characterization of the catalase-peroxidase KatG from *Burkholderia pseudomallei* by mass spectrometry. *J. Biol. Chem.*, 278, 35687-35692, 2003.
18. **Fiedurek J., Szczodrak J.:** Katalaza – właściwości, rola fizjologiczna i zastosowanie. *Post. Mikrobiol.*, XXXVI, 71-84, 1997.
19. **Frankenberger W.T. Jr., Dick W.A.:** Relationship between enzyme activities and microbial growth and activity indices in soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 47, 945-951, 1983.

20. **Friedel J.K., Mölter K., Fischer W.R.:** Comparison and improvement of methods for determining soil dehydrogenase activity by using triphenyltetrazolium chloride and iodinitrotetrazolium chloride. *Biol. Fertil. Soils*, 18, 292-296, 1994.
21. **Glathe H., Thalmann A.:** Über die mikrobielle Aktivität und ihre Beziehungen zu Fruchtbarkeitsmerkmalen einiger Ackerböden unter besonderer Berücksichtigung der Dehydrogenaseaktivität (TTC-Reduction). *Zbl. Bakt.*, II, 124, 24-55, 1970.
22. **Gliński J., Stępniewska Z., Brzezińska M.:** Characterization of the dehydrogenase and catalase activity of the soils of two natural sites with respect to the soil oxygenation status. *Polish J. Soil Sci.*, 19, 47-52, 1986.
23. **Gliński J., Stępniewska Z., Turski R., Bennicelli R., Wolińska A., Szafranek A., Charytoniuk P.:** Wybrane metody badań gleboznawczych. *EkoKUL*, Lublin, 72-77, 2002.
24. **Gong P.:** Dehydrogenase activity in soil: a comparison between the TTC and INT assay under their optimum conditions. *Soil Biol. Biochem.*, 29, 211-214, 1997.
25. **Guwy A.J., Martin S.R., Hawkes F.R., Hawkes D.L.:** Catalase activity measurements in suspended aerobic biomass and soil samples. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 25, 669-676, 1999.
26. **Holz F.:** Automatisierte, photometrische Bestimmung der Aktivität von Bodenzymen durch Anwendung (enzymatisch)-oxidativer Kupplungsreaktionen im Durchfluß. I. Mittelung: Die Bestimmung der Katalaseaktivität. *Landwirtschaft. Forsch.*, 39, 139-153, 1986.
27. **Januszek K.:** Aktywność enzymatyczna wybranych gleb leśnych Polski południowej w świetle badań polowych i laboratoryjnych. *Zesz. Nauk. AR Kraków*, Rozprawy nr 250, Kraków, 1999.
28. **Johnson J.I., Temple K.L.:** Some variables affecting the measurements of catalase activity in soil *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 28, 207-216, 1964.
29. **Kieliszewska-Rokicka B.:** Enzymy glebowe i ich znaczenie w badaniach aktywności mikrobiologicznej gleby. In: *Drobnoustroje środowiska glebowego, aspekty fizjologiczne, biochemiczne, genetyczne*, (Eds H. Dahm, A. Pokojska-Burdziej) Toruń, 37-47, 2001.
30. **Kucharski J.:** Relacje między aktywnością enzymów a żyznością gleby. In: *Drobnoustroje w środowisku. Występowanie, aktywność i znaczenie* (Ed W. Barabasz), Kraków, 327-347, 1997.
31. **Kuusik H., Björklund M., Rydström J.:** Purification and characterization of a novel bromoperoxidase-catalase isolated from bacteria found in recycled pulp white water. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 28, 617-624, 2001.
32. **Ladd J.N.:** Origin and range of enzymes in soil. In: *Soil Enzymes* (Ed R.G. Burns) 51-96, Academic Press, New York, 1978
33. **Lenhard G.:** Die Dehydrogenaseaktivität des Bodens als Maß für die Mikroorganismen-tätigkeit im Boden. *Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk.*, 73 (118) 1-11, 1956
34. **Loewen P.:** Probing the structure of catalase HP11 of *Escherichia coli* – a review. *Gene*, 179, 39-44, 1996.
35. **Minczewski J., Marczenko Z.:** *Chemia analityczna. Analiza ilościowa*. Tom 2, 263-274, 1973.
36. **Mysków W.:** Wpływ głębokiej uprawy i zmianowania roślin na właściwości biologiczne gleby. *Pam. Puł.*, 90, 7-26, 1987.
37. **Nannipieri P., Grego S., Ceccanti B.:** Ecological significance of the biological activity in soil. In: *Soil Biochemistry* (Eds J.M. Stotzky, G. Bollag) Vol 6. Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, Hong Kong, 293-355, 1990.
38. **Öhlinger R.:** Catalase activity. In: *Methods in Soil Biology* (Eds F. Schinner, R. Öhlinger, E. Kandeler, R. Margesin). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 237-240, 1995.
39. **Öhlinger R.:** Dehydrogenase activity with the substrate TTC. In: *Methods in Soil Biology* (Eds F. Schinner, R. Öhlinger, E. Kandeler, R. Margesin). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 241-243, 1995.

40. **Praveen-Kumar, Tarafdar J.C.:** 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) as a electron acceptor of culturable soil bacteria, fungi and actinomycetes. *Biol. Fertil. Soils*, 38, 186-189, 2003.
41. **Riffaldi R., Saviozzi A., Levi-Minzi R., Cardelli R.:** Biochemical properties of a Mediterranean soil as affected by long-term crop management systems. *Soil and Tillage Res.*, 67, 109-114, 2002.
42. **Ross D.J.:** Some factors influencing the estimation of dehydrogenase activities of some soils under pasture. *Soil Biol. Biochem.*, 3, 97-110, 1971.
43. **Ross D.J.:** Some enzyme and respiratory activities of tropical soils from New Hebrides. *Soil Biol. Biochem.*, 5, 559-567, 1973.
44. **Russel S.:** Metody oznaczania enzymów glebowych. PTG. Komisja Biologii Gleby. Warszawa, 1972.
45. **Schäffer A.:** Pesticide effects on enzyme activities in the soil ecosystem. In: *Soil Biochemistry 8* (Eds J.M. Bollag, G. Stotzky). Marcel Dekker Inc. New York, Basel, Hong Kong, 273-340, 1993.
46. **Schellhorn H.E.:** Regulation of hydroperoxidase (catalase) expression in *Echerichia coli*. *FEMS Microb. Letters*, 131, 113-119, 1995.
47. **Schuller E.:** Microbial biomass measured by fluorescence microscopy and its relation to total organic carbon and dehydrogenase activity in selected soil samples. *Z. Pflanzenemähr. Bodenk.*, 152, 115-120, 1989.
48. **Serban A., Nissenbaum A.:** Humic acid association with peroxidase and catalase. *Soil Biol. Biochem.*, 18, 41-44, 1986.
49. **Spothelfer-Magana J., Thalmann A.:** Eine verbesserte Methode zur Bestimmung der Dehydrogenase aktivität von Böden unter Einsatz von Iodonitrotetrazoliumchlorid (INT) *Agribiol. Res.*, 45, 244-256, 1992.
50. **Stępniewska Z., Brzezińska M., Gliński J., Stępniewski W., Włodarczyk T., Čurlík J., Houšková:** Aeration status of some Slovakian soils. *Int. Agrophysics*, 14, 327-339, 2000.
51. **Stępniewski W., Stępniewska Z., Gliński J., Brzezińska M., Włodarczyk T., Przywara G., Várallayay G., Rajkai K.:** Dehydrogenase activity of some Hungarian soils as related to their water and aeration status. *Int. Agrophysics*, 14, 341-354, 2000.
52. **Thalmann A.:** Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität im Boden mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). *Landwirtschaft, Forschung*, XXI, 3-4, 1968.
53. **Tiwari M.B., Tiwari B.K., Mishra R.R.:** Enzyme activity and carbon dioxide evolution from upland and wetland rice soils under three agricultural practices in hilly regions. *Biol. Fertil. Soils*, 7, 359-364, 1989.
54. **Trasar-Cepeda, C., Camina, F., Leirós, M.C., Gil-Sotres, F.:** An improved method to measure catalase activity in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 31, 483-485, 1999.
55. **Trevors J.T.:** Dehydrogenase activity in soil: A comparison between the INT and TTC assay. *Soil Biol. Biochem.*, 14, 673-674, 1984.
56. **Vandna S., Anubha K., Rajesh K., Sethi V., Kaushik A., Khatri R.:** Soil dehydrogenase activity and nitrifier populations in relation to different soil-plant associations. *Tropical Ecol.*, 31, 112-117, 1990.
57. **von Mersi W.:** Dehydrogenase activity with the substrate INT. In: *Methods in Soil Biology* (Eds F. Schinner, R. Öhlinger, E. Kandeler, R. Margesin) Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 243-245, 1995.
58. **von Mersi W., Schinner F.:** An improved and accurate method for determining the dehydrogenase activity of soils with idonitrotetrazolium chloride. *Biol. Fertil. Soils*, 11, 216-220, 1991.
59. **Włodarczyk T.:** Some aspects of dehydrogenase activity in soils. *Int. Agrophysics*, 14, 365-376, 2000.
60. **Włodarczyk T., Stępniewski W., Brzezińska M.:** Dehydrogenase activity, redox potential, and emission of carbon dioxide and nitrous oxide from Cambisols under flooding conditions. *Biol. Fertil. Soils*, 36, 200-206, 2002.

61. **Wood N.J., Sorensen J.:** Catalase and superoxide dismutase activity in ammonia-oxidising bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 38, 53-58, 2001.
62. **Yumoto I., Iwata H., Sawabe T., Ueno K., Ichise N., Matsuyama H., Okuyama H., Kawasaki K.:** Characterization of a facultatively psychrophilic bacterium, *Vibrio rumoiensis* sp. nov., that exhibits high catalase activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 67-72, 1999.
63. **Zgirski A., Gonko R.:** *Obliczenia Biochemiczne*, 371-414, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1998.

ENZYMES OF INTRACELLULAR REDOX TRANSFORMATIONS (OXIDOREDUCTASES)

Małgorzata Brzezińska, Teresa Włodarczyk

Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, ul. Doświadczalna 4, 20-270 Lublin 27
e-mail: mbrzez@demeter.ipan.lublin.pl

Abstract. The oxidoreductase enzymes are involved in the respiration metabolism of soil microorganisms. Soil dehydrogenases, active in intact cells, represent the total oxidative activity of microbial populations in soil. The enzyme catalase has a detoxifying function in cells by catalyzing the reaction of the decomposition of hydrogen peroxide.

Keywords: soil, dehydrogenase, catalase