

WPLYW TEMPERATURY NA PARAMETRY KINETYCZNE MICHAELISA-MENTENA UREAZY GLEBOWEJ

A. Samborska³, Z. Stępniewska^{1,2}

¹ Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN, ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin,

² Katolicki Uniwersytet Lubelski, Al. Kraśnicka 102, 20-718 Lublin

³ Katedra Inżynierii i Ochrony Środowiska, Politechnika Lubelska
ul. Nadbystrzycka 40, 20-618 Lublin, e-mail:ruda@akropolis.pol.lublin.pl

Streszczenie: Celem badań było zbadanie wpływu różnego zakresu temperatur na parametry kinetyczne Michaelisa-Mentena ureazy glebowej. Badaniom poddano próby zawierające czysty enzym (E), glebę nie nawadnianą ściekami wzbogaconą enzymem (E + G) i glebę wielokrotnie nawadnianą ściekami (G). Aktywność ureazową przy różnych stężeniach mocznika 0,01–3% i w różnych temperaturach: 0, 20, 37, 60°C oznaczano metodą Bonmanti i współ [1]. Stałą Michaelisa (Km) i szybkość maksymalną (Vmax) wyznaczono metodą Liweavera-Burka.

Aktywność ureazowa (AU) najniższa była w temperaturze 0°C, i wynosiła: 0,02 $\mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ w próbie z enzymem, 0,013 $\mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ w kombinacji enzym + gleba, 0,05 $\mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ w glebie irygowanej ściekami.

Wraz ze wzrostem temperatury obserwowano wzrost aktywności enzymu. W temperaturze 20°C AU przedstawiała się następująco dla: E = 0,10 $\mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$, E + G = 0,08 $\mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$, G = 0,03 $\mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Najwyższe wartości aktywności ureazowej zanotowano w temperaturze 37°C : 0,33 $\mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ dla próby zawierającej preparat handlowy, 0,16 $\mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ w kombinacji gleba wzbogaconą enzymem, 0,125 $\mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ dla gleby irygowanej ściekami miejskimi. Wzrost temperatury do 60°C powodował spadek aktywności enzymatycznej. W zakresie temperatur 0–37°C zanotowano spadek wartości stałej Michaelisa i wzrost szybkości maksymalnej zachodzącej reakcji we wszystkich analizowanych wariantach, natomiast w 60°C twierdzono wzrost Km i spadek wartości Vmax.

W oparciu o analizę otrzymanych wyników można stwierdzić że ureaza wykazuje największe powinowactwo względem substratu w temperaturze 37°C, natomiast wzrost temperatury jak również jej spadek zmniejsza dostępność mocznika dla enzymu.

Słowa kluczowe: aktywność ureazowa, temperatura, stała Michaelisa, prędkość maksymalna.

WPROWADZENIE

Problem utylizacji mocznika urasta do rozmiarów proporcjonalnych do liczności aglomeracji, a według danych literaturowych oszacowanych w roku 1994 dla Polski wprowadzono 623 tys. ton mocznika do gleb i wód powierzchniowych [9]. Przeprowadzany proces technologiczny z uwzględnieniem I stopnia oczyszczania mechanicznego i II stopnia oczyszczania metodą osadu czynnego nie powoduje całkowitego usuwania mocznika wraz ze ściekami. Niekompletna hydroliza mocznika powoduje, że 10% tego składnika, w praktyce odprowadzana jest do wód powierzchniowych. Stosowanie tzw. „doczyszczania” ścieków poprzez irygację upraw przemysłowych, powoduje przy aktywnym udziale roślin pobieranie przez nie formy amonowej azotu w wyniku rozkładu mocznika pod wpływem ureazy glebowej, bądź wydzielanie do atmosfery uwolnionego amoniaku.

Aktywny w tym procesie enzym-ureaza należy do grupy enzymów z klasy hydrolaz o bardzo wysokiej specyficzności substratowej [2]. Jej masa molekularna waha się w granicach 151 000–480 000 Da. Ureaza produkowana jest przez liczne bakterie: *Proteus*, *Helicobacter*, *Klebsiella Spp*, *Providencia stuartii*, *Morganella morgani* [4, 7, 10], *Staphylococcus spp* [11], *Bacillus spp* [6] jak również przez algi, grzyby i rośliny wyższe [7].

Jest aktywna w szerokim zakresie pH: 6–10 [8, 12] i odporna na działanie zarówno wysokich jak i niskich temperatur [3, 5, 13].

Aktywność ureazowa (AU) regulowana jest dostępnością substratu, dlatego też wyznaczenie parametrów kinetycznych K_m i V_{max} reakcji hydrolizy mocznika, charakteryzuje powinowactwo ureazy względem substratu w danym środowisku i dostarcza istotnych informacji o przebiegu procesu, jego szybkości i wartościach granicznych stężeń, przy których czynność tego enzymu praktycznie ustaje.

Celem pracy była analiza wpływu temperatury na parametry kinetyczne Michaelisa-Mentena ureazy w trzech różnych doświadczeniach: obecności ureazy handlowej (z BDH), w kombinacji gleba (nie nawadniana ściekami) z dodatkiem handlowego enzymu i dla gleby wielokrotnie irygowanej ściekami.

METODYKA BADAŃ

Badania były prowadzone z: enzymem handlowym (E) pochodzącym z firmy BDH, enzymem z dodatkiem gleby organicznej z poletka nigdy nie nawadnianego ściekami miejskimi (E + G) oraz gleby irygowanej ściekami po II stopniu oczyszczenia (G), (10-krotnie w ciągu sezonu wegetacyjnego).

Aktywność ureazową (AU) oznaczano metodą Bounmanti i współ. [1] polegającą na oznaczeniu zawartości NH_4^+ po wytworzeniu barwnego kompleksu z fenylonitroprusydkiem i podchlorynem sodowym. W tym celu próby były przygotowane w elenmayerkach zawierających odpowiednio: 0,01 mg enzymu, 0,01 mg enzymu w połączeniu z 1g gleby uprzednio nie nawadnianej ściekami, 1 g gleby poddawanej irygacji ściekami. Następnie po dodaniu buforu cytrynowego o pH 6,7 oraz mocznika w różnych stężeniach 0,01–3% próby były inkubowane w temperaturze 0, 20, 37 i 60°C przez okres 1,5 godziny. Po zakończeniu inkubacji poddawano je ekstrakcji 2M KCl, przesączono a po dodaniu fenylonitroprusydku i podchlorynu sodu oznaczano absorbancję barwnego kompleksu przy długości fali 630 nm na spektrofotometrze Shimadzu UV – 1601PC. Aktywność enzymu wyrażono w μM uwolnionego N-NH_4^+ wydzielonego w czasie 1 h w stałej temperaturze w odniesieniu do 1kg gleby.

Stała Michaelisa i V_{max} wyznaczono metodą Lineweavera-Burka, z równania prostej typu: $1/V = ax + b$.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Próby poddane badaniom wykazywały zróżnicowanie aktywności ureazowej zależnie od rodzaju próby i temperatury, w której wykonano dane oznaczenie. Najniższą wartość aktywności ureazowej zanotowano w temperaturze 0°C, która wynosiła odpowiednio dla wariantu: z enzymem poniżej wartości 0,02 $\mu\text{M N-NH}_4^+ \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$, 0,013 $\mu\text{M N-NH}_4^+ \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ w kombinacji enzym + gleba i 0,005 $\mu\text{M N-NH}_4^+ \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ w glebie irygowanej ściekami (Rys. 1A). Podwyższenie temperatury do 20°C powodowało wzrost aktywności ureazy we wszystkich analizowanych próbach średnio o 81% (0,1026 $\mu\text{M N-NH}_4^+ \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ dla E, 0,08 $\mu\text{M N-NH}_4^+ \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ w kombinacji E + G i 0,039 $\mu\text{M N-NH}_4^+ \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ dla G) w odniesieniu do wyników uzyskanych w temperaturze 0°C (Rys. 1B). Aktywność enzymu w temperaturze 37°C charakteryzowała się wzrostem jej wartości we wszystkich anali-

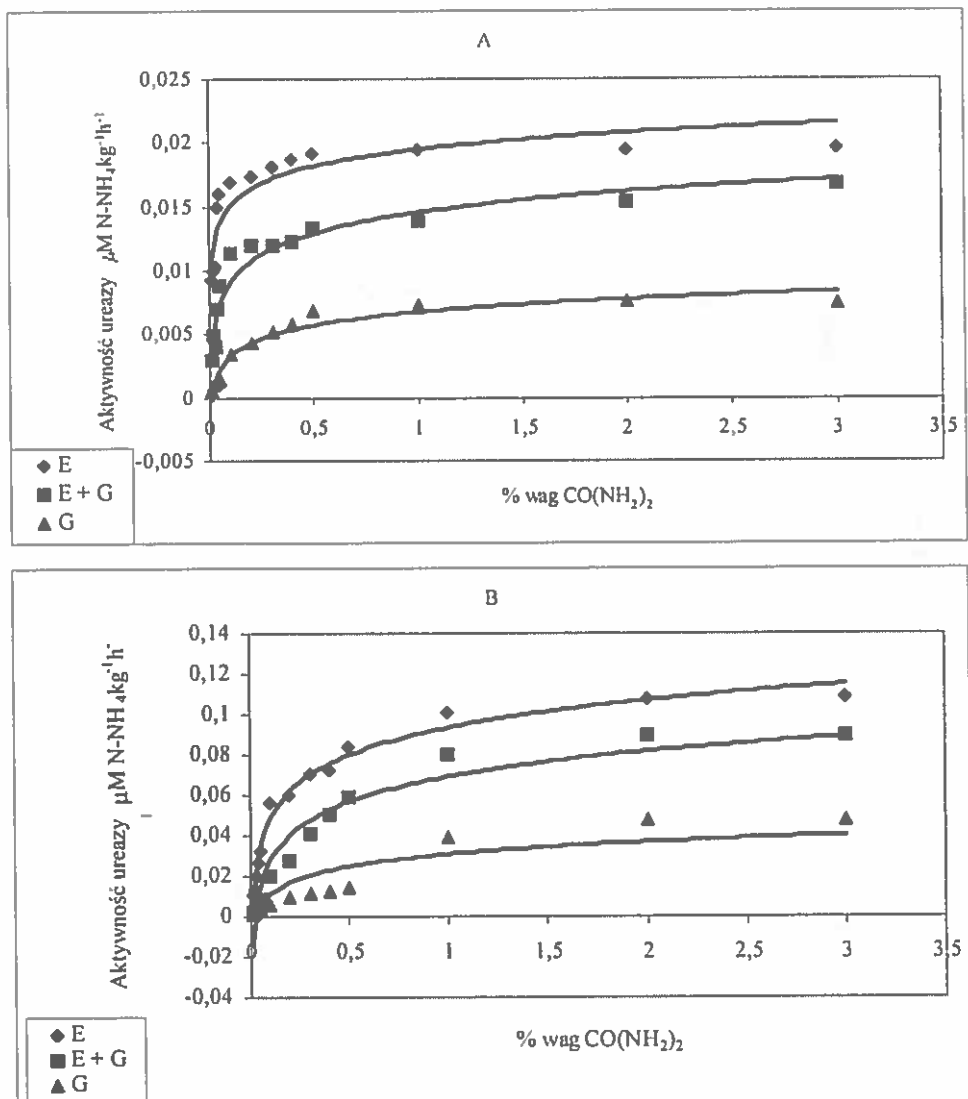
zowanych wariantach (Rys. 2C) i osiągnęła następujący poziom: $0,33 \mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ w kombinacji z enzymem handlowym, $0,16 \mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ w wariancie enzym + gleba, $0,125 \mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ w glebie irygowanej ściekami.

W temperaturze 60°C stwierdzono spadek aktywności enzymatycznej we wszystkich kombinacjach odpowiednio: z preparatem handlowym o 34% ($\text{AU} = 0,2308 \mu\text{M N-NH}_4^+ \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$), z glebą wzbogaconą enzymem o 30% ($\text{AU} = 0,1363 \mu\text{M N-NH}_4^+ \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$), a w glebie irygowanej ściekami zaledwie o 7% ($\text{AU} = 0,1363 \mu\text{M N-NH}_4^+ \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (Rys. 2D).

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń można stwierdzić, że najbardziej wrażliwy na zmiany temperatury okazał się preparat zawierający czysty enzym, natomiast pozostałe kombinacje okazały się bardziej stabilne, co znalazło odbicie w różnicach w aktywności ureazy pomiędzy poszczególnymi układami (Rys. 3). Największy przyrost aktywności w zakresie $0-37^\circ\text{C}$ wystąpił w kombinacji z handlowym preparatem ureazy (16,5-krotny, co odpowiada $0,44 \mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ na 1°C), niższy w kombinacji gleba + enzym (12,5-krotny, wzrastając o $0,33 \mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ na 1°C), najniższy w przypadku gleby irygowanej ściekami miejskimi (2,5-krotny przy wzroście aktywności ureazowej o $0,067 \mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ na 1°C).

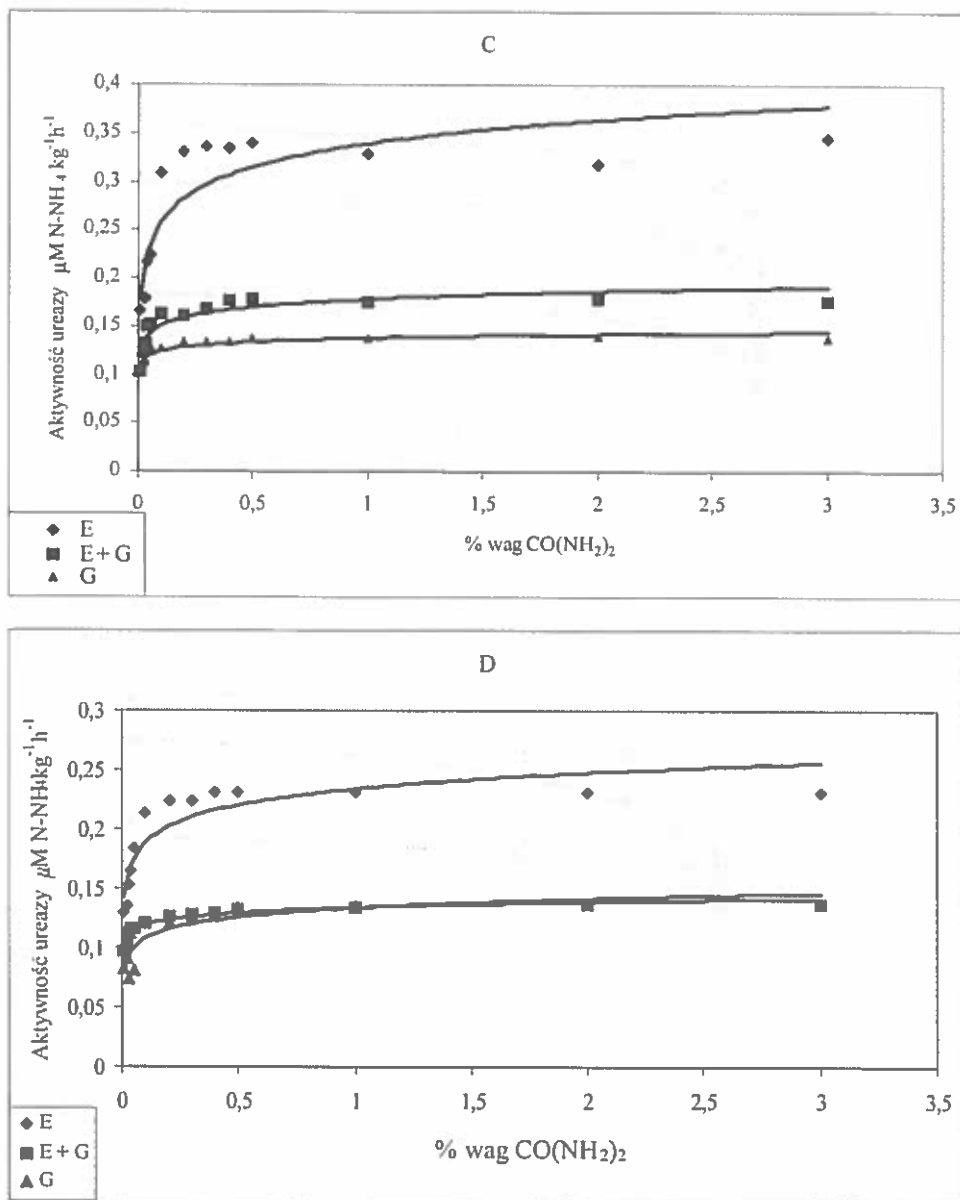
Wzrost temperatury w przedziale $0-37^\circ\text{C}$ powodował spadek wartości stałej Michaelisa (K_m), dziesięciokrotny w kombinacji: z preparatem enzymatycznym i 100-krotny w glebie i w glebie z dodatkiem enzymu. W 60°C enzym wykazywał mniejsze powinowactwo do substratu co znajdowało swoje potwierdzenie we wzroście wartości K_m , która wynosiła dla preparatu enzymatycznego $1,11 \times 10^{-2}$, gleby z dodatkiem enzymu $6,6 \times 10^{-3}$, gleby irygowanej ściekami $7,1 \times 10^{-3}$.

Szybkość maksymalna (V_{max}) osiągała wartości największe w 37°C , co sugeruje najszybszy przebieg reakcji enzymatycznej w tej temperaturze i najwyższe powinowactwo względem mocznika. Wzrost lub spadek temperatury we wszystkich analizowanych wariantach pociągał za sobą spadek tempa zachodzącej reakcji enzymatycznej.



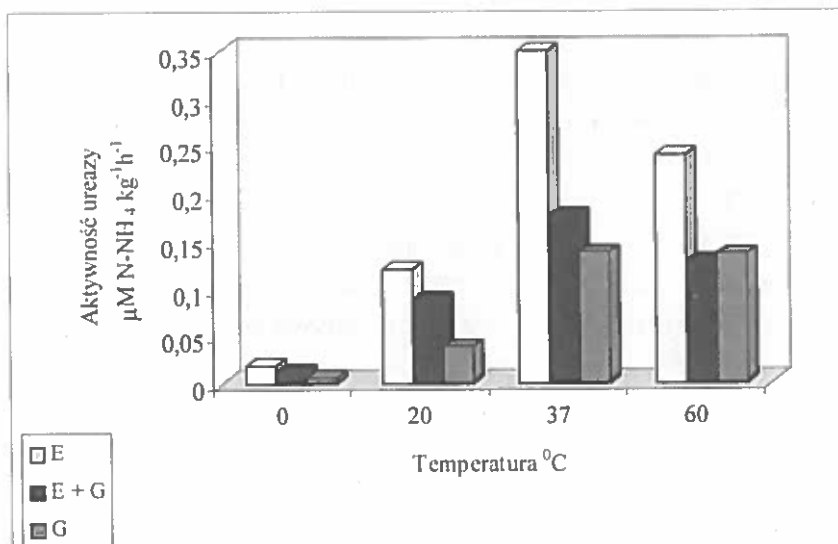
Rys. 1. Zależność od stężenia mocznika (wyrażonego w % wag roztworu) na aktywność ureazy w temperaturze: A – 0, B – 20°C.

Fig. 1. Influence of urea concentration on urease activity at temperature: A – 0, B – 20°C.



Rys. 2. Zależność od stężenia mocznika (wyrażonego w % wag roztworu) na aktywność ureazy w temperaturze: C – 37, D – 60°C.

Fig. 2. Influence of urea concentration on urease activity at temperature: C – 37, D – 60°C.



Rys. 3. Zależność aktywności ureazowej od temperatury w kombinacjach doświadczenia: E – czysty enzym, E + G – enzym + gleba, G – gleba

Fig. 3. Influence of temperature on urease activity in different samples: E – pure enzyme, E + G – enzyme with soil, G – soil.

Tabela 1. Parametry kinetyczne ureazy glebowej w temperaturze: 0, 20, 37, 60°C

Table 1. Michaelis-Menten parameters of soil urease at temperature: 0, 20, 37, 60°C

	Vmax			Km		
	Enzym	Gleba	Gleba + Enzym	Enzym	Gleba	Gleba + Enzym
0°C	$1,8 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$1,4 \cdot 10^{-2}$	$6,6 \cdot 10^{-2}$	$3,3 \cdot 10^{-1}$	$5,1 \cdot 10^{-1}$
20°C	$8,3 \cdot 10^{-2}$	$2 \cdot 10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-2}$	$1,2 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-1}$	$4,1 \cdot 10^{-2}$
37°C	$2,2 \cdot 10^{-1}$	$1,3 \cdot 10^{-1}$	$1,72 \cdot 10^{-1}$	$8,7 \cdot 10^{-3}$	$3,6 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-3}$
60°C	$3,1 \cdot 10^{-1}$	$1,25 \cdot 10^{-1}$	$1,28 \cdot 10^{-1}$	$1,11 \cdot 10^{-2}$	$6,5 \cdot 10^{-3}$	$7,1 \cdot 10^{-3}$

WNIOSKI

W wyniku przeprowadzonych badań modelowych wykazano:

1. Najniższą wartość aktywności ureazowej (AU) w temperaturze 0°C:
 - a) poniżej wartości 0,02 $\mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ w próbie z enzymem handlowym,
 - b) 0,013 $\mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ w kombinacji gleba + enzym,
 - c) 0,05 $\mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ w glebie irygowanej ściekami.
2. Wzrost temperatury w zakresie 0–37°C powodował wzrost AU we wszystkich analizowanych kombinacjach, maksimum aktywności ureazowej stwierdzono w temperaturze 37°C na poziomie:
 - a) 0,33 $\mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ w kombinacji z enzymem handlowym,
 - b) 0,16 $\mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ w wariancie enzym + gleba,
 - c) 0,125 $\mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ w glebie irygowanej ściekami.
3. Podwyższenie temperatury do 60°C spowodowało spadek aktywności ureazowej w próbach z preparatem handlowym o 34%, z glebą z dodatkiem enzymu o 30%, a w glebie irygowanej ściekami zaledwie o 7%.
4. Spadek wartości stałej Michaelisa (Km) wraz ze wzrostem temperatury w przedziale temperatur 0–37°C, dziesięciokrotny w kombinacji: z preparatem enzymatycznym i 100-krotny w glebie i w glebie z dodatkiem enzymu.
5. W 60°C enzym wykazywał mniejsze powinowactwo do substratu co znajdowało swoje potwierdzenie we wzroście wartości Km.
6. Szybkość maksymalna (Vmax) osiągała wartości największe w 37°C, malała w temperaturze 60°C.
7. Na wzrost temperatury najbardziej reaguje preparat handlowy enzymu, układ z glebą okazał się bardziej stabilny.
8. Największy przyrost aktywności w zakresie 0–37°C wystąpił w kombinacji z handlowym preparatem ureazy (16,5 krotny, co odpowiada 0,44 $\mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ na 1°C), niższy w kombinacji gleba + enzym (12,5 krotny, wzrastając o 0,33 $\mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ na 1°C), najniższy w przypadku gleby irygowanej ściekami miejskimi (2,5 krotny przy wzroście aktywności ureazowej 0,067 $\mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ na 1°C).
9. Obecność materiału glebowego sprawia większą stabilność AU w porównaniu z enzymem *in vitro* w szerokim zakresie temperatur (0–37°C) wyrażającą się słabym narastaniem aktywności oraz mniejszą wrażliwością na zanik aktywności przy wyższych temperaturach.

10. Efektywne działanie ureazy zwiększające wielokrotnie zdolności doczyszczające zarówno w glebie jak i roztworze można osiągnąć poprzez optymalizację temperatur w zakresie 37–60°C.

PIŚMIENNICTWO

1. **Bonmanti M., Pujola M., Sova I., Saliva M.:** Chemical properties, population of nitrite oxidizers urease and phosphatase activities in sewage sludge-amended soils. *Plant and soil* 84, 79–91, 1985.
2. **Burns, R. G.:** Interaction of enzymes with soil mineral and organic colloids. In *Interactions of Soil Minerals with Natural Organic and Microbes*, P. M. Huang, and M. Schnitzer (eds.). SSSA Spec. Pub. Serv. 17, 429–432, 1986.
3. **Fenn L.B., Tilton J.L., Tatum G.:** Urease activity in two cultivated and non-cultivated arid soils. *Biol. Fertil. Soils* 13, 152–154, 1992.
4. **Hu L.T., Nicholson E.B., Jones B.D., Lynch M.J., Mobley H.L.T.:** *Morganella morganii* urease: purification, characterization and isolation of gene sequences. *J. Bacteriol.* 172, 3073–3080, 1990.
5. **Kissel D.E., Carbera M.L.:** Factors affecting urease activity. In *Ammonia Volatilization from Urea Fertilizer Development Center, Muscle Shoals*. 53–66, 1988.
6. **Maeda M., Hidaka M., Nakamura A., Masaki H.:** Cloning, sequencing and expression of thermophile *Bacillus sp* strain TB-90 urease gene complex in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176: 432–442, 1994.
7. **Mobley H.L.T., Hausinger R.P.:** Microbial urease: significance, regulation and molecular characterization. *Microbiol. Rev.* 53, 85–108, 1989.
8. **Perez-Mateos M., Gonzales-Carcedo S.:** Assay of urease activity in soil columns. *Soil Biol Biochem* 20, 567–572, 1988.
9. **Sapek A.:** Zagrożenia zanieczyszczenia wód azotem w wyniku działalności rolniczej. *Zeszyty Problemowe PRN – zeszyt 440*, 309–329, 1996.
10. **Skurnik, M., Batsford, S., Mertz, A., Schiltz, E., Toivanen, P.:** The putative cationic antigen of *Yersinia enterocolitica* is a urease β -subunit. *Infect. Immun.* 63, 2498–2504, 1993.
11. **Schafer, U.K., Kaltwasser, H.:** Urease from *Staphylococcus saprophyticus*: purification, characterization and comparison to *Staphylococcus xylosum* urease. *Arch. Mikrobiol.* 161, 393–399, 1994.
12. **Tabatabai M. A.:** Effect of trace elements on urease activity in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 9, 9–13, 1987.
13. **Zantua M. I., Bremner J. M.:** Comparison of methods of assaying urease activity in soils. *Soil Biol. Biochem.* 7, 291–295, 1977.

INFLUENCE OF TEMPERATURE ON MICHAELIS-MENTEN'S KINETIC PARAMETERS OF SOIL'S UREASE

A. Samborska³, Z. Stępniewska^{1,2}

¹Catholic University of Lublin, Kraśnicka 102, 20-718 Lublin

²Institute of Agrophysics PAS, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin 27

³Technical University, Nadbystrzycka 40, 20-618 Lublin, e-mail: ruda@ukropolis.pol.lublin.pl

Summary: The aim of the investigations was to measure relationship between temperature and Michaelis-Menten's kinetic parameters of soil's urease. The measurements were performed on three kinds of samples: the first one containing pure enzyme (E), the second one containing soil never irrigated with waste water but amended with pure enzyme (E + G), the third one containing soil irrigated with waste water after II step purification (G). Urease activity at different concentration of urea 0,01–3% and temperature: 0, 20, 37, 60°C was marked with the help of Bounmanti et al. [1] method. Michaelis Constant (Km) and maximum potential activity (Vmax) were determined by method of Liweaver-Burk.

The lowest urease activity (AU) was found at 0°C and was determined for different samples: 0,02 $\mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ for the sample with pure enzyme, 0,013 $\mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ soil never irrigated with waste water but enhanced with pure enzyme, 0,05 $\mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ soil irrigated with waste water after II step purification. With an increase of temperature the urease activity level was observed. At 20°C the following value of AU was found in samples: 0,10 $\mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ for E, 0,08 $\mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ for E + G, 0,03 $\mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ for G. The highest urease activity was observed at the temperature of 37°C and it was 0,33 $\mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ for E, 0,16 $\mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ for E + G, 0,125 $\mu\text{N-NH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ for G. The rise of temperature to the level of 60°C caused a decrease of urease activity. With an increase of temperature within the range of 0–37°C a decrease of Michaelis constants was noticed and increase of maximum potential activity in all the analysed samples. At 60°C decrease Km and Vax was observed.

On the basis of results obtained it is possible to conclude that urease shows the highest activity at 37°C, whilst an increase of temperature or its decrease reduce the activity.

Key words: urease activity, temperature, Michaelis constants, and maximum velocity.