

А. Ш. ГАЛСТЯН, Л. А. ХАЧИКЯН, Н. А. ОГАНЕСЯН

ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ОКИСИ ЖЕЛЕЗА ПОЧВЕННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

С помощью реакции 2,2'-дипиридила изучалась ферриредуктазная активность некоторых почвенных микроорганизмов. Споровые, железо-марганцевые бактерии и клостридиум способны восстанавливать окись железа в присутствии доноров водорода и коферментов—НАД, НАДФ и ФАД. Микроорганизмы имеют оксидоредуктазную систему, в которой действует ферриредуктаза, осуществляющая реакцию восстановления Fe_2O_3 в почве.

До настоящего времени в ферментной системе почвы из редуктаз, осуществляющих микробиологические процессы, обнаружено действие нитратредуктазы, сульфатредуктазы, нитритредуктазы и гидроксилламинредуктазы, которые в анаэробных условиях передают мобилизованный дегидрогеназами водород соответственно кислороду нитратов, сульфатов, нитритов и гидроксиламинов, восстанавливая их [1—4]. Кислород указанных соединений является акцептором водорода при анаэробном дыхании почвенной микрофлоры. В случае недостаточного количества указанных соединений или их отсутствия в почве эту функцию выполняют другие кислородсодержащие вещества. Установлено, что кислород двуокиси марганца и окиси железа также может акцептировать водород $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$ и $\text{НАДФ} \cdot \text{H}_2$ в результате действия MnO_2 —редуктазы и Fe_2O_3 —редуктазы в почве [5, 6].

Многочисленные исследования показали, что восстанавливать железо способны многие виды микроорганизмов [7—9, 11—16, 18—22]. Однако лишь в некоторых работах имеются сведения о возможном участии ферментов в этом процессе [6, 19, 21]. В результате деятельности микроорганизмов и их ферментов в почве труднорастворимые формы железа превращаются в легкорастворимые. Поэтому изучение этих процессов имеет определенное научное и практическое значение.

Материал и методика. В лабораторных условиях на модифицированных агаровых и жидких средах Оттау, Бромфильда и Виноградского изучалась способность микроорганизмов восстанавливать Fe_2O_3 . В опытах использовались микроорганизмы и новые штаммы культур, выделенные из почв Армении и идентифицированные по Красильникову [10] и Гильман [17]. Культуры были инкубированы в течение 1, 2 и 3 недель в термостате (30°). В каждую пробирку на 25 мл питательной среды прибавлялось 10 мг тонкоизмельченного порошка окиси железа. Стерилизация проводилась в автоклаве в течение 20 мин при температуре 116° . Количественное определение железовосстанавливающей способности микроорганизмов в соответствующих средах проводилось учетом двухвалентного железа с помощью 2,2'-дипиридила. Для этой цели инкубированные

среды с культурами были суспензированы и центрифугированы. Опыты по определению ферриредуктазной активности микроорганизмов ставились с чистыми культуральными жидкостями и при взаимодействии культуры с почвой. Активность ферриредуктазы определялась следующим образом.

В стерильных 100 мл вакуумных колбах помещалось 10 мг тонкоизмельченной окиси железа, 1 мл культуральной жидкости, 1 мл 1%-го раствора глюкозы в качестве донатора водорода и 1 мл 0,5% раствора коферментов—НАД, НАДФ и ФАД. Воздух из колб эвакуировался при разряжении 10—12 мм рт. ст. Колбы ставились в термостат при 30° на 48 час. Контролем служили чистая культуральная жидкость, стерильная вода, соответствующие среды с окисью железа и без нее. После инкубации в колбы добавлялись 10 мл 1 н серной кислоты для экстрагирования восстановленного железа и 12 мл ацетатного буферного раствора (100 г ацетата натрия растворяют в 500 мл дистиллированной воды, добавляют 300 мл ледяной уксусной кислоты и доводят объем раствора до 1 л). Колбы встряхивались в течение 30 мин и содержимое фильтровалось. К фильтрату был добавлен 1 мл 0,5%-го раствора 2,2'-дипиридила. Через 30 мин окрашенный раствор подвергался центрифугированию при 5—6 тысяч оборотов в течение 20 мин и фотокolorиметрированию прибором ФЭК-М. Использовались 10 мм кювета и светофильтр с пропусканием лучей длиной волны 500 нм. Активность ферриредуктазы выражалась в мг восстановленного Fe^{2+} на 1 мл культуральной жидкости. Количественный учет восстановленного железа был произведен с помощью калибровочного графика, полученного из стандартных растворов соли Мора (0,7022 г/л, 1 мл этого раствора содержит 0,1 мг Fe). Образцовый раствор железа был приготовлен разбавлением рабочего раствора в 10 раз.

Результаты и обсуждение. Опыты показали, что многие виды микроорганизмов, выделенных и идентифицированных из различных типов почв Армении (черноземов, лугово-черноземных, бурых почв и солончаков), обладают способностью восстанавливать железо (табл. 1). Наиболее интенсивная железовосстанавливающая способность обнаруживается в культуральных жидкостях бактерий родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*. Эти микроорганизмы восстанавливают железо как в анаэробных условиях, так и в аэробных. Аналогичной способностью обладают все культуры из рода *Bacillus*. В анаэробных условиях *Bac. cereus* может восстанавливать до 40,0 мг железа на 100 г почвы, а *Pseudomonas*—59,8 мг. Некоторые культуры, как, например *Act. rectus* и *Asp. oguzae*, в чистых культурах почти не обладают способностью восстанавливать железо, а при взаимодействии с почвой, особенно в анаэробных условиях, проявляют высокую ферриредуктазную активность (50 мг Fe^{2+}). Было установлено, что железовосстанавливающее свойство у бактерий выражено более интенсивно, чем у грибов и актиномицетов. Причем молодые клетки микроорганизмов значительно активнее восстанавливают железо.

Исследования показали, что новые штаммы микроорганизмов, выделенных из черноземов, содовых солончаков и лугово-черноземных почв, также активно восстанавливают железо (табл. 2). Этот процесс интенсивнее протекает в анаэробных условиях.

Для выявления ферментативного характера реакции восстановления окиси железа почвенными микроорганизмами были использованы коферменты. Прибавление к культуральной жидкости коферментов НАД(Ф) и ФАД ускоряет реакцию восстановления окиси железа, что

Т а б л и ц а 1

Ферриредуктазная активность микроорганизмов, выделенных из почв Армении

Микроорганизмы	В чистых культурах*	Культуральная жидкость, Fe ²⁺ мг/мл	Культуры с почвой, Fe ²⁺ мг/100 г		
		Условия определения			
		анаэробные	аэробные	анаэробные	аэробные
Pseudomonas	+++	51,8	21,5	59,8	28,5
Bact. coli	—	42,0	26,9	50,0	23,9
St. aureus	+	32,0	13,0	40,0	20,0
Clostridium pasteurianum	++++	22,1	21,0	30,1	28,0
Bac. mycoides	++	22,1	3,1	30,1	10,1
Bac. megaterium	+++	20,7	3,1	28,7	10,1
Bac. cereus	+++	32,0	13,0	40,0	20,0
Bac. mesentericus	+++	22,0	13,0	30,0	20,0
Bac. pumilis	+++	42,2	3,1	50,2	10,1
Act. rectus	—	4,0	0,0	12,0	7,0
Saccharomyces	++	12,2	0,0	20,2	10,2
Stachybotrys	++	22,1	3,2	30,1	10,1
Penicillium	+	12,1	3,1	20,1	11,0
Aspergillus oryzae	—	16,0	4,0	24,0	10,0
82 (832)	++	11,9	3,0	19,9	9,1
84 (834)	++	27,1	2,0	35,1	9,0
85 (860)	+++	12,2	2,0	20,2	9,0
86 (865)	++	6,0	2,8	14,0	9,8

* Реакция на 2,2'-дипиридил: очень сильная (+++), сильная (++), средняя (++), слабая (+), отсутствует (—).

свидетельствует о ее ферментативном характере. Следовательно, кислород окиси железа является акцептором водорода в окислительно-восстановительных системах при дыхании почвенных микроорганизмов

Т а б л и ц а 2

Ферриредуктазная активность железомарганцевых микроорганизмов типа *Pedamicrobium*, Fe^{2+} мг/мл

Варианты опыта	Штаммы микроорганизмов*					
	68 (832)	70 (834)	71 (835)	81 (861)	83 (865)	88 (892)
Культура + стерильная вода	0,20	0,14	0,14	0,10	0,14	0,07
Культура — стерильная вода + Fe_2O_3	1,02	1,00	0,21	0,14	0,21	1,01
Культура + глюкоза + Fe_2O_3	1,02	2,01	1,02	1,00	1,01	5,01
Культура + глюкоза + Fe_2O_3 + НАД + НАДФ + ФАД	6,50	5,01	4,03	3,01	5,00	6,00

* 68 (832), 70 (834), 81 (835) — выделены из лугово-черноземной почвы, 81 (861), 83 (865) — чернозема, 88 (892) — содового солончака.

(табл. 3). Почвенные микроорганизмы в системе оксидоредуктаз содержат ферриредуктазу, которая мобилизованный дегидрогеназами водо-

род передает окиси железа, осуществляя ее восстановление. В результате этой реакции железо переходит в растворимую форму. Таким образом, анаэробный *Clostridium pasteurianum* и аэробный *Bac. megaterium* обладают высокой ферриредуктазной активностью и широко распространены в различных типах почв.

Таблица 3

Ферриредуктазная активность микроорганизмов, Fe^{2+} мг/мл

Варианты опыта	<i>Bac. megaterium</i>	<i>Pedamicrobium</i>	<i>Clostridium pasteurianum</i>
Культура + стерильная вода	0,00	0,00	0,10
Культура + стерильная вода + Fe_2O_3	1,02	1,01	1,00
Культура + глюкоза + Fe_2O_3	3,02	4,03	3,50
Культура + глюкоза + Fe_2O_3 + НАД + НАДФ + ФАД	4,51	6,01	11,96

Эти микроорганизмы доминируют в нижних горизонтах лугово-черноземных почв, где преобладают глеевые процессы. Факультативный анаэробный микроаэрофил *Pedamicrobium* (железо-марганцевый) распространен также в черноземах и солончаках. Указанные микроорганизмы активно восстанавливают окись железа на средах МПБ, Виноградского, Бромфильда.

Итак, проведенные исследования показали, что восстановление окиси железа почвенными микроорганизмами осуществляется редуктазной системой ферментов, где действует ферриредуктаза. Почвенные микроорганизмы, особенно бактерии, обладают высокой ферриредуктазной активностью. Этот фермент, согласно новой номенклатуре, может быть назван Fe_2O_3 —редуктазой (Восстановленный НАД(Ф): Fe_2O_3 —оксидоредуктаза). Fe_2O_3 —редуктаза осуществляет перенос водорода дегидрогеназных систем НАД- H_2 , НАДФ- H_2 кислороду окиси железа, которая является акцептором электронов и водорода при дыхании почвенной микрофлоры, способствующих растворению и миграции железа в почве.

НИИ почвоведения и агрохимии

МСХ АрмССР

Поступило 4.VII 1973 г.

Ա. Շ. ԳԱԼՏՅԱՆ, Լ. Ա. ԽԱՉԻԿՅԱՆ, Ն. Ա. ՇՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ

ԵՐԿԱԹԻ ՕՔՍԻԴԻ ՖԵՐՐԵՆՏԱՅԻՆ ՎԵՐԱԿԱՆԳՆՈՒՄԸ ՀՈՂԻ ՄԱՆՐԷՆԵՐԻ ԿՈՂՄԻՑ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Հայաստանի տարբեր հողատիպերից՝ սևահողերից, աղուտներից, կիսաանապատային գորշ հողերից անջատված մանրէների մոտ հայտնաբերվել է ֆերրիոքսիդատազային ակտիվություն, Այդ ֆերմենտի ակտիվությունը հա-

մեծատաքար բարձր է երկաթ-մանգանային, սպորավոր բակտերիաների և կլոստրիդիումի մոտ: Որոշ մանրէներ՝ ջրածնի դոնորի և կոնֆերմենտների ներկայությամբ ուժգնորեն վերականգնում են երկաթը: Երկաթի օքսիդի վերականգնման ռեակցիան մանրէների կողմից իրականանում է ռեդուկտազադասի ֆերմենտների օգնությամբ, որոնց սիստեմում գործում է ֆերրիռեդուկտազան: Ֆերրիռեդուկտազային ակտիվության որոշումը հիմնված է երկարժեք երկաթի քանակական հաշվառման վրա 2-2'-դիպիրիդիլի ռեակցիայով: Այս հարցի ուսումնասիրությունը հնարավորություն է տալիս բացահայտելու երկաթի միացությունների ձևափոխությունը՝ նրանց շարժուն ձևերի առաջացումը հողում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Галстян А. Ш., Маркосян Л. В. ДАН АрмССР, 43, 9, 1966
2. Галстян А. Ш. ДАН СССР, 47, 5, 1968
3. Галстян А. Ш., Саакян Э. Г. ДАН АрмССР, 50, 2, 1970
4. Галстян А. Ш., Саакян Э. Г. ДАН АрмССР, 53, 3, 1971
5. Галстян А. Ш. ДАН АрмССР, 55, 2, 1972.
6. Галстян А. Ш., Оганесян Н. А. ДАН АрмССР, 55, 5, 1972.
7. Дараган А. Ю. Почвоведение, 9, 1971.
8. Илятединов А. П., Телянова З. Ф. Микробиология, 26, 2, 1957.
9. Калакуцкий Л. В., Дуда В. И. Научн. докл. высш. шк. 1, 1961.
10. Красильников Н. А. Определитель бактерии и актиномицетов. М.—Л., 1949.
11. Непомилуев В. Ф., Козырев М. А. Докл. ТСХА, 169, 1971.
12. Перфильев Б. В., Габе Д. П. Роль микроорганизмов в образовании железо-марганцевых озерных руд. М.—Л., 1969.
13. Трошанов Э. П. Микробиология, 37, 5, 1968.
14. Aristovskaja T. V., Zavarzin G. A. Soil Biochemistry, 2, New-York, 1971.
15. Bromfield S. M. The Journal of Soil Science, 5, 1, 1954.
16. Bromfield S. M. Journal Gen. Microbiology, 11, 3, 1954.
17. Gllman J. G. A manual of Soil fungi. The Lowe State College. Press Amer. Lowe, 1945.
18. Ottow J. C. G. Zeit. für Allg. Microbiologie, 8, 5, 1968.
19. Ottow J. C. G., Von Klonotek A. Appl. Microbiology., 18, 1, 1969.
20. Ottow J. C. G. Zeit. für Allg. Microbiologie. 10, 1, 1970.
21. Ottow J. C. G., Glathe H. Soil Biol. Biochem., 3, 1971.
22. Roberts I. L. Soil Sci., 63, 135, 1947.