

Л. А. ХАЧИКЯН, Н. А. ОГАНЕСЯН

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ДВУОКСИ МАРГАНЦА ПОЧВЕННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Модифицирована методика определения активности MnO_2 -редуктазы почвенных микроорганизмов. Бактерии, грибы и актиномицеты обладают MnO_2 -редуктазной активностью, которая в присутствии донаторов водорода осуществляет реакцию восстановления двуокиси марганца в почве.

Усвоение марганца в почве растениями зависит от физических и химических факторов. Наряду с этими факторами, микробиологический является одним из главных, который управляет окислительно-восстановительным потенциалом почвы. Установлено, что растения поглощают марганец, находящийся в почве в двухвалентном состоянии [4, 10, 11, 14, 16]. В результате жизнедеятельности микроорганизмов и их ферментов труднорастворимые формы марганца в почве превращаются в легко растворимые. Многими исследованиями обнаружено, что микроорганизмы обладают способностью восстанавливать марганец в почве [5, 7, 9, 13, 17, 19].

В ферментативной системе почвы Галстяном [2] установлено действие MnO_2 -редуктазы (1.6.99.), которая мобилизованный дегидрогеназами водород органических веществ передает кислороду двуокиси марганца, осуществляя реакцию ее восстановления.

Механизм реакции восстановления двуокиси марганца почвенными микроорганизмами сложен и почти не изучен. Настоящая работа посвящена изучению этих процессов.

Материал и методика. В лабораторных условиях для бактерий и актиномицетов нами модифицированы агаровые и жидкие среды с MnO_2 с компонентами: KH_2PO_4 —0,5 г; $MgSO_4$ —0,2 г; $(NH_4)_2SO_4$ —1,0 г; глюкоза—5,0 г; дрожжевой автолизат—2,0 мл; дистиллированная вода—1000 мл. Для грибов: буферная смесь— NaH_2PO_4 и Na_2HPO_4 —0,2 М на 1000 мл; глюкоза—20,0 г; дрожжевой автолизат—2,0 мл (рН 7,0). Перед посевом на 1 л агаровой среды добавляли 3,0 мл молочной кислоты, а на 25,0 мл питательной среды—20,0 мг MnO_2 . Стерилизацию проводили в автоклаве в течение 20 мин при температуре 116° . В опытах использовали микроорганизмы и новые штаммы культур [50], выделенные из почв Армении и идентифицированные по Красильникову [6] и Гильман [12]. Отобранные культуры являлись факультативно анаэробными.

Количественное определение марганцевосстанавливающей способности микроорганизмов в соответствующих средах и почвах проводили учетом двухвалентного марганца с помощью персульфата аммония, за основу взяв методику Галстяна [2].

Опыты по определению марганцередуктазной активности микроорганизмов ставили с чистыми культурами и при взаимодействии культуры с почвой в факультативно анаэробных (в пробирках) и анаэробных (вакуумных колбах) условиях. Для этой цели разработана следующая методика: в стерильных 100 мл вакуумных колбах помещали

20,0 мг тонкоизмельченной двуокиси марганца, 1 мл культуральной жидкости или 1 г почвы, 2 мл 2%-ой глюкозы, приготовленной на 0,2 М растворе фосфатного буфера ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$), pH 7,0. Перед постановкой опыта в смесь буферов добавляли глюкозу. Воздух из колб эвакуировали при разряжении 10—12 мм рт. ст. Колбы ставили в термостат при 30° на 48 час., контролем служили чистая культуральная жидкость, среды и почва с двуокисью марганца и без нее. После инкубации в колбы добавляли 23 мл свежеприготовленного фосфатного буфера без глюкозы для экстрагирования восстановленного марганца (NaH_2PO_4 —12,0 г, Na_2HPO_4 —14,0 г на 1000 мл воды). Колбы встряхивали в течение 30 мин и содержимое фильтровали в 100 миллилитровые химические стаканы с меткой. К фильтрату добавляли по 0,5 мл концентрированной H_2SO_4 и H_3PO_4 (для устранения влияния цветных соединений железа). В качестве катализатора добавляли 1 мл 2%-о р-ра азотнокислого серебра и 1—3 г персульфата аммония, затем стаканчики нагревали на электроплитке до появления первого пузырька. Добавление персульфата аммония повторяли 3 раза до появления устойчивой окраски, после чего стаканчики охлаждали, доводили до метки дистиллированной водой, встряхивали и фотоколориметрировали прибором ФЭК-М. Использовали 10 мм кюветы и светофильтр с пропусканием волны 500 им. Активность MnO_2 -редуктазы выражали в мг восстановленного Mn^{2+} на 100 мл культуральной жидкости или на 100 г почвы. Количественный учет восстановленного марганца производили с помощью калибровочного графика, полученного из стандартных растворов марганцевокислого калия. Для этого 10,0 мл 0,1 н раствора KMnO_4 переносили в 100 мл мерную колбу и объем доводили дистиллированной водой до метки (1 мл этого раствора содержит 0,11 мг марганца).

Результаты и обсуждение. Исследования показали, что в факультативно анаэробных и аэробных условиях в почве происходит восстановление марганца. Активность MnO_2 редуктазы обнаружена в основных типах почв. Активное восстановление марганца происходит в гидроморфных почвах, где в результате лугового процесса интенсивно развиваются анаэробные, в частности железо-марганцевые микроорганизмы (табл. 1). Луговая стадия почвообразования характеризуется значи-

Таблица 1
Активность восстановления двуокиси марганца в почве

Тип почвы, местонахождение	Гумус, %	pH, HO	мг Mn^{2+} / 100 г почвы	
			активность марганец-редуктазы	подвижный Mn
Лугово-черноземная, Вардахпюр	7,4	5,2	194	36
Луговая дерновая, Арагац	15,7	5,2	136	27
Коричневая лесная, Иджеван	7,8	6,9	127	23
Перегнойно-карбонатная лесная, Иджеван	11,0	7,2	121	24
Бурая лесная, Дилижан	5,7	5,2	120	22
Чернозем типичный, Раздан	5,9	7,0	126	20
Лугово-степная, черноземовидная, Семеновка	13,7	6,3	114	17
Каштановая, Абовян	3,2	7,9	95	18
Темно-бурая полупустынная, Шаумян	2,1	8,0	85	11
Лугово-орошаемая бурая, Арташат	2,2	7,9	70	13
Содовый солончак, Ерасхаун	0,4	9,1	24	5

тельным содержанием железо-марганцевых бактерий и активностью ферриредуктазы и марганецредуктазы. Существует определенная связь между действием железо-марганцевых микроорганизмов и активностью оксидоредуктаз в почве [1, 3, 4].

Опыты показали, что многие виды микроорганизмов, выделенные и идентифицированные из различных типов почв Армении (черноземы, лугово-черноземные, бурые и солончаки), обладают способностью восстанавливать марганец. Наиболее интенсивная марганецвосстанавливающая способность обнаруживается у бактерий родов *Bacillus*, *Pseudomonas*. Грибы и актиномицеты в факультативно анаэробных условиях также обладают этой способностью. Было установлено, что чистая культура рода *Bacillus* восстанавливает 99—120 мг, *Pseudomonas*—66 мг марганца. Все используемые микроорганизмы обладают марганецвосстанавливающей способностью. У бактерий это свойство выражено сильнее, чем у грибов и актиномицетов, а при взаимодействии культур с почвой бактерии проявляют особенно высокую марганецредуктазную активность, 120—150 Mn^{2+} /100 г почвы. Исследования показали также, что новый штамм бактерий (226), выделенный из лугово-черноземной почвы, при взаимодействии с почвой восстанавливает до 240 мг/100 г почвы, а из грибов *Asp. niger* восстанавливает 77 мг Mn^{2+} + (табл. 2).

Таблица 2

Марганецредуктазная активность микроорганизмов
в факультативно анаэробных условиях

Микроорганизмы	Mn^{2+} мг/ /100 мл	Mn^{2+} мг/ /100 г почвы	Микроорганизмы	Mn^{2+} мг/ /100 мл	Mn^{2+} мг/ /100 г почвы
	чистая культуральная жидкость	культура с почвой		чистая культуральная жидкость	культура с почвой
<i>Pseudomonas</i>	66	150	<i>Cladosporium</i>	29	46
<i>Bac. subtilis</i>	99	130	282 (шт.)	58	66
<i>Bac. megaterium</i>	54	120	<i>Act. albus</i>	14	34
<i>Bac. mesentericus</i>	68	120	<i>Act. griseus</i>	21	34
<i>Bac. mycolides</i>	85	130	<i>Act. rectus</i>	15	30
<i>Bact. coli</i>	72	110	403 (шт.)	22	27
226 (шт.)	59	240	<i>Saccharomyces</i>	15	28
<i>Asp. niger</i>	77	73	Питательная среда	11	—
<i>Penicillium</i>	48	60	Почва	—	25
<i>Stachybotrys</i>	29	60			

В лабораторных опытах на модифицированных индукционных средах изучалась активность марганецредуктазы как в присутствии кислорода, так и глюкозы и дрожжевого автолизата, который является единственным органическим субстратом в этой среде. Результаты исследований показали, что оптимальное восстановление MnO_2 происходит при одновременном присутствии глюкозы и дрожжевого автолизата. Был уточнен также срок инкубации и влияние pH. Бактерии активно восстанавливают марганец при pH 7,0, грибы—при pH 5,5.

В лабораторных опытах особое внимание уделялось условиям определения MnO_2 -редуктазной активности микроорганизмов и почвы. Процесс восстановления двуокиси марганца более интенсивно протекает в факультативно анаэробных условиях (в пробирках), чем в сугубо анаэробных (в вакуумных колбах), тогда как восстановление Fe_2O_3

почвенными микроорганизмами активнее протекает в сугубо анаэробных условиях. Способность микроорганизмов восстанавливать марганец в присутствии или в отсутствие кислорода показывает, что O_2 и MnO_2 не являются конкурентами в качестве конечных акцепторов электронов в их дыхательной системе. При свободном доступе кислорода бактерии растут и восстанавливают марганец обязательно при наличии в субстрате источника углерода в виде глюкозы, вследствие их факультативно-анаэробной природы. Аналогичные данные получены и при взаимодействии микроорганизмов с почвой.

Опыты с использованием бактериальных клеток *Bac. cereus* и их индуцированного экстракта показали, что в факультативно анаэробных условиях бактерии активнее восстанавливают марганец, чем их индуцированный экстракт (табл. 3). По-видимому, бактериальные клетки выделяют в культуральную жидкость меньше редуцирующих веществ, чем в период их усиленного размножения. Наши наблюдения показали также, что при пересеве микроорганизмов их способность к редукции марганца слабеет.

Таблица 3
Восстановление MnO_2 индуцированными клетками и их экстрактом

Варианты опыта	Условия определения	
	факультативно анаэробные	анаэробные
Среда + <i>Bac. cereus</i> -а (клетки) + MnO_2	120	20
Среда + <i>Bac. cereus</i> -а (клетки) + MnO_2 + почва	150	36
Среда + <i>Bac. cereus</i> -а (экстракт) + MnO_2	70	27
Среда + <i>Bac. cereus</i> -а (экстракт) + MnO_2 + почва	77	56
Среда + MnO_2 + почва	32	27
Среда + MnO_2	12	5

Таким образом, многие почвенные микроорганизмы обладают марганцевосстанавливающей способностью. Среди них споровые бактерии и *Pseudomonas* обладают особенно высокой активностью и широко распространены в различных типах почв. Этот процесс активно протекает в факультативно анаэробных условиях.

Итак, проведенные исследования показали, что восстановление двуокиси марганца почвенными микроорганизмами осуществляется редуктазной системой ферментов, где действует MnO_2 -редуктаза (восстановленный НАД (Ф) — MnO_2 -оксидоредуктаза). Следовательно, для микроорганизмов MnO_2 может служить акцептором водорода и электронов, способствующих трансформации и миграции марганца в почве для питания растений.

ՄԱՆԳԱՆԻ ԵՐԿՕՔՍԻԴԻ ՎԵՐԱԿԱՆԳՆՈՒՄԸ ՀՈՂԻ ՄԱՆՐԷՆԵՐԻ ԿՈՂՄԻՑ

Ա մ փ ո փ ու մ

Հայաստանի տարբեր հողատիպերից անջատված մանրէների մոտ հայտնաբերվել է մանգան երկօքսիդի վերականգնման ռեակցիան: Ապացուցվել է, որ սպորավոր բակտերիաները, *Pseudomonas* ցեղի ներկայացուցիչները և սնկերից *Asp. niger*-ը ունեն մանգանեբկօքսիդոնեղուկտազայի բարձր ակտիվություն: Մանգան երկօքսիդի վերականգնման պրոցեսն ավելի ակտիվ է ընթանում ֆակուլտատիվ անաերոբ պայմաններում:

Մանգան երկօքսիդի վերականգնման ռեակցիան մանրէների կողմից իրականանում է օքսիդանեղուկտազային դասի ֆերմենտների օգնությամբ, որտեղ գործում է MnO_2 -նեղուկտազան: Հետևաբար, հողային մանրէների համար մանգան երկօքսիդը կարող է ծառայել, որպես ջրածնի ակցեպտորօքսիդավերականգնվող պրոցեսներում:

Սույն հետազոտությունների հիման վրա մոդիֆիկացված է մանրէների մանգանեբկօքսիդոնեղուկազա ֆերմենտի ակտիվության որոշման մեթոդ, որի կիրառումը պրակտիկայում կօգնի բացահայտելու մանգանի ձևափոխությունները և տեղաշարժը հողում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Գալսթյան Ա. Մ., Օգանեսյան Կ. Ա. ДАН АрмССР, 55, 5, 1972.
2. Գալսթյան Ա. Մ. ДАН АрмССР, 56, 2, 1972.
3. Գալսթյան Ա. Մ., Խաչիկյան Լ. Ա., Օգանեսյան Կ. Ա. Биологический журнал Армении, 26, 12, 1973.
4. Գալսթյան Ա. Մ., Ավսյան Զ. Ս. Тр. X междунар. конгр. почвоведов, 3, 1974.
5. Гроздинская К. А. Микроэлементы в жизни растений, животных и человека. Киев, 1964.
6. Красильников Н. А. Определитель бактерии и актиномицетов. М.—Л., 1949.
7. Перфильев Б. В., Габе Д. Р. Роль микроорганизмов в образовании железо-марганцевых озерных руд. М.—Л., 1964.
8. Трошанов Э. П. Микробиология, 37, 634, 1968.
9. Barea J. M., Olivaris J., Aguilar A., Callao V. Agrochimica, 15, 4—5, 1971.
10. Bromfield S. M. Plant soil, 16, 147, 1955.
11. Dommerges J., Mangenot F. Ekologie microbienna du sol, Paris, 1970.
12. Gilman J. G. A manual of soil fungi. The Lowe state College. Press Amer., Lowe, 1945.
13. Ehrlich H. L. Biochemistry, 2, 1971.
14. Mann P. J. G., Quastel J. H. Nature, 158, 4005, 1946.
15. Mulder E. G., Gerretsten F. C. Advances in Agron, 4, 221, 1952.
16. Pandeca N. K. Chem. Abstract., 73, 550, 698, 1970.
17. Trimble R. B., Ehrlich H. L. Appl. Microbiology, 16, 695, 1958.
18. Trimble R. B., Ehrlich H. L. Appl. Microbiology, 19, 966, 1970.
19. Sherman G. D., Harmer P. M. Soil sci soc., Amer. Press, 7, 398, 1943.