

УДК 631.417→576.8

Я. ЛАСИК, С. А. ГОРДИЕНКО

**КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ ПОЧВЕННЫХ
БАКТЕРИЙ С МЕТАЛЛАМИ**

Показана роль комплексов, образованных полисахаридами с металлами, в росте и развитии сельскохозяйственных растений и их продуктивности.

Ряд исследований в современной микробиологии посвящен полисахаридам, синтезированным чистыми культурами микроорганизмов в связи с тем, что они находят применение в различных областях деятельности человека [15]. Однако все еще редко исследуются эти вещества в почве и очень мало работ, посвященных вопросам синтеза, разложения и экологической функции в ризосфере растений. Между тем образование вещества типа полимерных глицинов является одним из важных проявлений жизненной активности микроорганизмов [9]. Кроме того, эти вещества играют в почве и на корнях растений значительную биохимическую роль [1]. Полисахариды представляют собой важную часть органического вещества почвы — от 5 до 25% от общего количества органической массы [10]. До настоящего времени неизвестно, существует ли зависимость между типом образованного полисахарида и морфологией клеток, их образующих [14]. Установлено [13], что полисахаридная фракция почвенного гумуса очень стабильна, одной из причин этого явления, по мнению Мартина [7, 8], может быть химическая структура. В противоположность этому взгляду Чешир [12] считает устойчивость полисахаридов в почве функцией их растворимости и комплексообразования. Микроорганизмы разлагают в почве растительные полисахариды лучше, чем полисахариды бактериального происхождения. Скорость же разложения бактериальных полисахаридов также различна. Так, нами установлено, что полисахарид *Xanthomonas fuscans* разложился после 35-дневной культивации только на 20%. При исследовании заселенности ризосферы почвенными бактериями установлен положительный эффект у бактерий, синтезирующих полисахариды [17]. Резистентность бактериальных полисахаридов может обуславливаться присутствием катионов металлов либо глинистых минералов в почвенном растворе, подобно тому как это происходит с гуминовыми кислотами [2]. Ионы металлов могут изменить способность полисахаридов взаимодействовать с частицами глинистых минералов и, таким образом, снизить их структурообразующую активность [7]. Можно предположить, что способность полисахаридов взаимодействовать с ионами металлов оказывает влияние и на активность почвенных ферментов, которые инактивируются ионами тяжелых металлов. Полисахариды входят в состав гумуса почв, продукты частичной деградации которого образуют комплексы с ионами металлов и, по всей вероятности, становятся более резистентными против разложения микроорганизмами [4]. Изучение факторов этой резистентности важно для установления экологической роли полисахаридов.

Нами проведены исследования влияния катионов некоторых металлов на разложение полисахаридов культур *Achromobacter delicatulus*,

Xanthomonas fuscans. Среда для выращивания культур была следующего состава: K_2HPO_4 —0,05, KNO_3 —0,02, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ —0,001, $NaCl$ —0,005, дрожжевой автолизат—0,02, глюкоза и сахароза—1,5%; Са и Fe в форме хлоридов. Мы избрали полисахариды типа глюканов, выделенные из сапрофитов ризосферы пшеницы и глюкомоннана, продуцируемого фитопатогенным микроорганизмом, выделенным из ризосферы фасоли. Микроорганизмы культивировали на жидкой среде в течение 72 час. при 28°. Выделяли полисахариды модифицированным методом Sevag-Lackman Smolens (1938). Осаждали полисахарид ацетоном после отделения протеннов хлороформом и центрифугирования клеток.

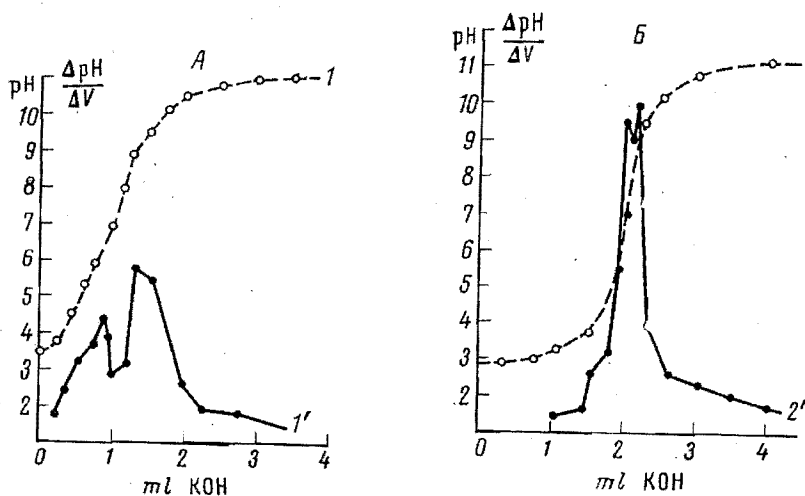


Рис. 1. Кривые потенциметрического титрования полисахаридов *Xanthomonas fuscans* (А) и *Achromobacter delicatulus* (Б)

Препараты диализовали в течение 48 час. против водопроводной воды от глюкозы и неорганических веществ. Осаждали полисахариды 4-кратным объемом ацетона, центрифугировали, промывали и подсушивали эфиром или лиофилизировали. Гидролиз проводили в ампулах 1— $NHCl$ в течение 5 час. при температуре 105°. Газовохроматографическим методом определяли моносахаридный состав гидролизатов полисахаридов (рис. 1). Исследование взаимодействия полисахаридов с ионами металлов проводили методами потенциметрического титрования и ИК-спектроскопии.

Значение pH исходных растворов полисахаридов составляло 6,72—7,12. Растворы в концентрации 1 мг/1 мл подкисляли до pH 3,5 азотной кислотой и в атмосфере азота проводили обратное титрование 0,0134 n раствором KOH. Кривые титрования полиэлектролитов отличаются от кривых титрования электролитов тем, что при ионизации каждой группы молекулы полиэлектролита совершается дополнительная работа за счет сил электростатического взаимодействия с другими ионизированными группами молекулы, и поэтому форма кривой более пологая и сдвинута вправо от оси ординат. При титровании полисахаридов наблюдали постепенное изменение потенциала, кривые титрования были пологими. В точке, называемой концом титрования, происходил резкий скачок потенциала, который хорошо виден на кривых зависимости потенциал — концентрация или на дифференциальных кривых, где четкие максимумы отвечали точкам эквивалентности. Кривые титрования полисахаридов бактерий *Xanthomonas fuscans*, *Achromobacter delicatulus* различались (рис. 1) тем, что кривая титрования полисахарида *Xanthomonas fuscans*

имела 2 пика в кислой области: один — в области pH 4,5, другой — в области pH 5,8, что свидетельствует о наличии слабокислых функциональных групп. Полисахарид *Xanthomonas fuscans* имел два близких пика в щелочной области при pH 9, что свидетельствовало о наличии сильной кислой группы. Эти полисахариды действительно существенно различались и по моносахаридному составу (табл. 1). Преобладающее содержание манноз и уроновых кислот в полисахариде *Xanthomonas fuscans* делало его более реакционноспособным.

Таблица 1
Моносахаридный состав полисахаридов почвенных бактерий *Xanthomonas fuscans*, *Achromobacter delicatulus*

Моносахар. %	<i>Xanthomonas fuscans</i>	<i>Achromobacter delicatulus</i>
6-Диокси-1-манноза (рамноза)	1,78	1,0
α -Манноза	40,80	11,44
α -Галактоза	—	0,60
α -Глюкоза	34,97	45,76
d - β -Глюкоза	18,32	38,84
β -Глюкуроновая кислота	0,35	0,10

Возможность взаимодействия полисахаридов с металлами изучали в разбавленных растворах прямым методом. Для этого проводили титрование полисахаридов в присутствии азотнокислых солей металлов при соблюдении постоянства ионной силы добавлением 1 мл/—1—NKNO₃.

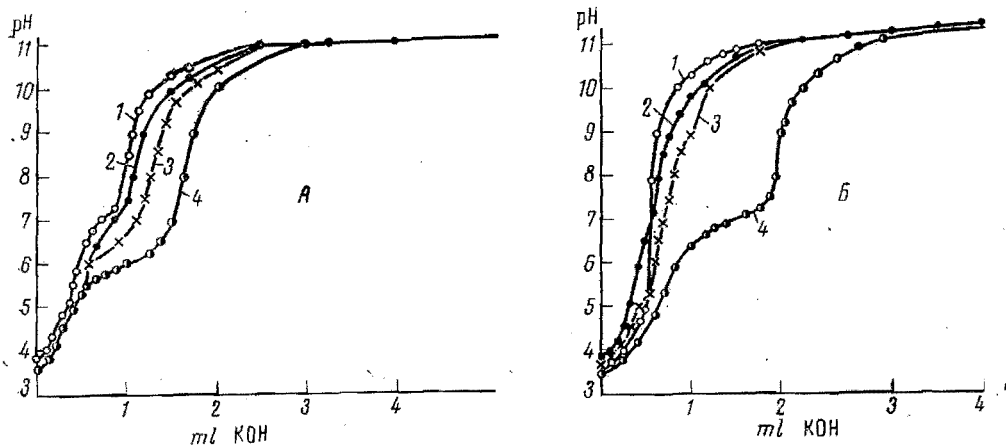
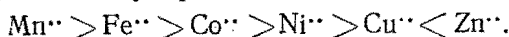


Рис. 2. Кривые потенциметрического титрования полисахаридов *Achromobacter delicatulus* (А) и *Xanthomonas fuscans* (Б) в присутствии Cu^{2+}
1 — полисахарид, 2 — то же + 0,2 мл 0,01 М $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, 3 — то же + 0,4 мл, 4 — то же + 1,0 мл

Установлено, что при совместном титровании полисахаридов с ионами металлов кривая титрования проходила ниже кривой титрования одного полисахарида, что объясняется необратимым вытеснением водорода из полисахаридов ионами металлов, pH-эффект увеличивался при увеличении концентрации металла в растворе (рис. 2). Избыток ионов металлов оттитровывали с образованием гидроокисей соответствующих металлов. Наблюдали торможение процесса образования гидроокисей при совместном титровании полисахаридов с металлами, что является доказательством образования внутриккомплексной связи.

Способность ионов металлов занимать адсорбционные участки полисахаридов соответствовала ряду устойчивости внутрикомплексных соединений, предложенному Ирвингом и Вильямсом:



Демонстрацию ряда устойчивости для соединений типа биополимеров и переходных металлов можно принимать как доказательство существования комплексов металлов.

Таблица 2

Потенциометрическое титрование полисахарида *Achromobacter delicatulus* в присутствии $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$

Полисахарид			Полисахарид + 0,2 мл 0,01 н $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$			Полисахарид + 0,4 мл 0,01 н $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$		
КОН	pH	$\frac{\Delta \text{pH}}{\Delta V}$ *	КОН	pH	$\frac{\Delta \text{pH}}{\Delta V}$	КОН	pH	$\frac{\Delta \text{pH}}{\Delta V}$
0	3,78		0	3,66		0	3,68	
0,1	4,00	2,2	0,1	3,86	2,0	0,1	3,88	2,0
0,2	4,34	3,4	0,2	4,12	2,6	0,2	4,10	2,2
0,3	4,86	5,2	0,3	4,50	3,8	0,3	4,44	3,4
0,4	5,52	6,6	0,4	4,98	4,8	0,4	4,90	4,6
0,5	6,14	6,2	0,5	5,58	6,0	0,5	5,60	7,0
0,6	6,58	4,4	0,6	6,20	6,2	0,6	5,98	3,8
0,7	6,68	2,8	0,7	6,46	2,6	0,7	6,10	1,20
0,8	7,10	2,4	0,8	6,70	2,4	0,8	6,26	1,6
0,9	7,36	2,6	0,9	7,00	3,0	0,9	6,48	2,2
1,1	8,42	3,8	1,0	7,50	5,0	1,0	6,70	2,2
1,15	8,76	6,8	1,06	7,92	7,0	1,2	7,64	5,2
1,20	8,98	6,8	1,10	8,56	16,0	1,3	8,80	11,6
1,30	9,30	4,4	1,20	9,36	8,0	1,4	9,50	7,0
1,50	9,62	3,2	1,40	9,96	3,0	1,60	10,08	2,9
2,00	10,00	1,6	2,0	10,64	1,13	2,00	10,54	1,15
2,50	10,20	0,76	2,5	10,92	0,56	2,50	10,90	0,72
3,00	10,32	0,40	3,0	11,10	0,36	3,00	11,10	0,40
4,00	10,58	0,24	4,0	11,30	0,20	4,00	11,32	0,22

* Здесь и в табл. 3: отношение $\frac{\Delta \text{pH}}{\Delta V}$ используется для построения дифференциальных кривых потенциометрического титрования (изменение pH при изменении V добавляемого титранта).

По данным табл. 2 и 3 можно произвести простой расчет соотношения компонентов в комплексе, например Cu -полисахарид.

1. Пример расчета соотношения компонентов в комплексе полисахарид *Xanthomonas fuscans* (по данным табл. 3). В кювету для титрования помещали 0,2 мл 0,01 М Cu^{2+} , полисахарида—8 мл, KNO_3 —1 мл, HNO_3 —0,17 мл, H_2O —0,6 мл.

Нормальность полисахарида ($N_{\text{п}}$) в точке — максимуме титрования можно рассчитать по щелочи, израсходованной на титрование полисахаридов до точки эквивалентности:

$$N_{\text{п}} = \frac{0,4 \cdot 1,34 \cdot 10^{-2}}{10} = 0,536 \cdot 10^{-3}.$$

При условии внесения в раствор 0,2 мл 0,01 М Cu^{2+} точка эквивалентности смещалась, наблюдался pH-эффект и щелочи шло на титрование больше:

$$N_{\text{п}+\text{Cu}} = \frac{0,7 \cdot 1,34 \cdot 10^{-2}}{10} = 0,931 \cdot 10^{-3}.$$

Таким образом,

$$N_{\text{п}+\text{Cu}} - N_{\text{п}} = 0,931 \cdot 10^{-3} - 0,536 \cdot 10^{-3} = 0,395 \cdot 10^{-3}.$$

Таблица 3

Потенциометрическое титрование полисахарида *Xanthomonas fuscans*
в присутствии ионов меди

Полисахарид			Полисахарид + 0,2 мл 0,01 М Cu(NO ₃) ₂			Полисахарид + 0,4 мл 0,01 М Cu(NO ₃) ₂		
мл	pH	$\frac{\Delta pH}{\Delta V}$	мл	pH	$\frac{\Delta pH}{\Delta V}$	мл	pH	$\frac{\Delta pH}{\Delta V}$
0	3,64		0	3,86		0	3,74	
0,1	3,78	1,4	0,1	4,08	2,2	0,1	3,88	1,4
0,3	4,40	3,1	0,2	4,40	3,2	0,2	4,20	3,2
0,4	5,4	10,0	0,25	4,80	8,0	0,3	4,68	4,8
0,45	6,72	26,4	0,30	5,44	12,8	0,4	5,20	5,2
0,50	8,16	28,8	0,35	6,10	11,0	0,5	6,50	13,0
0,60	9,42	13,6	0,40	6,60	12,5	0,6	6,90	4,0
0,80	10,20	3,9	0,50	7,10	5,0	0,7	7,36	4,6
1,00	10,50	1,5	0,60	8,40	3,0	0,76	7,82	7,66
1,40	10,86	0,9	0,70	9,40	10,0	0,80	8,66	21,0
2,00	11,16	0,5	0,80	9,72	3,2	1,00	9,76	5,5
3,00	11,40	0,24	1,00	10,12	2,00	1,20	10,32	2,8
4,00	11,54	0,14	1,40	10,64	1,3	1,50	10,56	0,8

Так как в условиях титрования кислота оттитровывается щелочью в эквивалентных отношениях ($N_{OH'} = N_H$), то нормальность оттитрованной кислоты равна:

$$N_H = N_{OH'} = \frac{0,3 \cdot 1,34 \cdot 10^{-2}}{10} = 0,402 \cdot 10^{-3}$$

Отсюда

$$\frac{Cu^{2+}}{(H)} = \frac{0,395 \cdot 10^{-3}}{0,402 \cdot 10^{-3}} = 1:1,$$

т. е. при соблюденных условиях титрования в растворе образуются комплексы Cu-полисахаридов в отношении 1:1.

2. При увеличении ионов меди в растворе до 0,4 мл наблюдается следующее (по данным табл. 3):

$$N_{II} = 0,536 \cdot 10^{-3}$$

$$N_{II+Cu} = 1,072 \cdot 10^{-3}$$

$$N_{II+Cu} - N_{II} = 0,536 \cdot 10^{-3}$$

$$N_{OH'} = \frac{0,4 \cdot 1,34 \cdot 10^{-2}}{10} = 0,536 \cdot 10^{-3}$$

$$\frac{Cu^{2+}}{(H)} = \frac{0,536 \cdot 10^{-3}}{0,536 \cdot 10^{-3}} = 1:1.$$

Всего в раствор внесено ионов меди $\frac{0,4 \cdot 0,02}{10} = 0,8 \cdot 10^{-3}$.

Таким образом, не прореагировало

$$0,8 \cdot 10^{-3} - 0,536 \cdot 10^{-3} = 0,264 \cdot 10^{-3} N_{Cu^{2+}}$$

при условии образования растворимого комплекса 1:1.

Методом ИК-спектроскопии установлено химическое взаимодействие ионов металлов с полисахаридами. Метод ИК-спектроскопии [11], примененный для исследования препаратов полисахаридов с металлами, состоял в прессовании таблеток размельченного исследуемого вещества с КВг (1,5 мг : 120 мг). Взвешенный образец полисахарида в количестве 1,5 мг с точностью до 0,01 мг тщательно перемешивали с КВг при

помощи механического гомогенизатора. Прессование проводили под вакуумом в течение 3—5 мин., спектры снимали на Unicam SP-200.

Для исследованных полисахаридов характерен размытый вид спектра по всей анализируемой области, вследствие чего менее отчетливо проявляются их различия.

Нами выявлено [17], что фитопатогенные бактерии *Xanthomonas fuscans* вызывающие некрозы типа пятнистостей листьев фасоли, населяют ризосферу всходов растений и образуют полисахариды, ингибирующие уже в низких концентрациях рост фасоли и прирост зеленой массы и листьев.

Мы приводили опыты в 7-дневных условиях стерильного выращивания растений фасоли с добавлением раствора полисахарида в концентрации 0,05% и комплексов полисахарида с некоторыми металлами в концентрации 0,0004, 0,0008, 0,002 М. Учитывали вес зеленых надземных органов и корней и их сухой вес.

Полисахарид в растворе отчетливо тормозил рост молодых растений. Из исследуемых металлов медь в указанных концентрациях ингибировала длину стеблей проростков и продукцию сухого вещества. Биоконплексы с металлами снимали ингибирующее действие полисахарида на растение (рис. 3).

Таким образом, установлено, что бактериальные полисахариды глюкоанового и глюкомоннанового типа благодаря наличию функциональных групп отличаются реакционной способностью. В разбавленных растворах, взаимодействуя с металлами, они образуют растворимые в воде внутриконтплексные соединения и соли с металлами, и это свойство способствует ингибирующему действию против микроорганизмов. С другой стороны, взаимодействие с металлами способствовало тому, что полисахариды фитопатогенных микроорганизмов становились менее фитопатогенными.

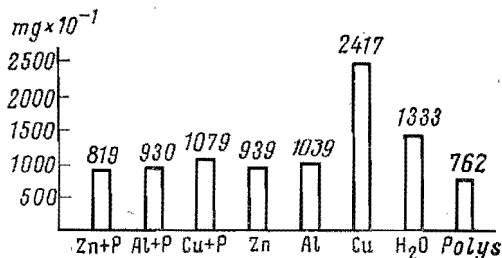


Рис. 3. Суммарный сухой вес растений фасоли при добавлении биоконплексов полисахарида *Xanthomonas fuscans*

Литература

1. Красильников Н. А., Звягинцев Д. Г., Асеева И. В. и др. Экологическое значение микробных метаболитов в почве. Transactions of the 10th Intern. Congr. of Soil Science, VIII, 1974.
2. Bratashevskij A. Ju., Gajdarov O. I., Gordienko S. A., Ovcsarenko F. D. Study of complex-formation processes of humic acids extracted from brown coals. Agrokhemia es Talajtan, v. 20, № 1—2, 1971.
3. De Daffe S. K., Franklin R. E., Himes F. K. Partial characterization of soil polysaccharide-strontium 20, itrium 90 complexes. Soil Sci., v. 103, № 1.
4. Gordienko S., Glushchenko T., Ivahno L. Decomposition of metal-humic acid complexes by microorganisms. Symp. Biol. Hung., v. 11, 1972.
5. Zhdanov Yu. A. et al. Metal complexes of carbohydrates: chelate complexes of some nitrogen heterocycle-monosaccharide derivatives. Carbohydrate Res., v. 38, 1974.
6. Lasik J., Kalachova L. Výskyt a funkce polysacharidu v rhizosfere. Sbornik «Vzajemné vztahy mikroorganismu a rostlin v rhizosfere. Praha, Dúm techniky, ČVTS, MBU CSAV, 1972.
7. Martin J. P. Influence of metal ions on decomposition and binding action of polysaccharides in soil. Humus et Planta V, Prague, Trans. Internat. Symp., 1971.
8. Martin J. P., Richards S. J. Influence of the copper, zinc, iron, and Aluminum salts of some microbial and plant polysaccharides on aggregation and hydraulic conductivity of Ramona sandy loams. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., v. 33, № 3, 1969.
9. McNeely W. H. Biosynthetic Polysaccharides. V Microbial Technology. N. Y., Reinhold Publ. Corp., 1967.
10. Oades J. M., Wagner G. H. Incorporation of ¹⁴C into sugars in a soil incubated with ¹⁴C glucose. Geoderma, v. 4, № 4, 1970.

11. *Vinkler P., Lakatos B., Meisel T.* Biopolymer-metal complex systems. III. Infrared spectroscopic analysis of humus compounds and their metal complexes. *Agrókémia es Talajtan*, v. 24, № 1—2, 1975.
12. *Cheshire M. V., Mundie C. M., Shepherd H.* The origin of soil polysaccharide transformation of sugars during the decomposition in soil of plant material labelled with ^{14}C . *Soil Sci.*, v. 24, 1973.
13. *Tan K. H., Clark F. E.* Polysaccharide constituents in fluvic and humic acids extracted from soil. *Geoderma*, v. 2, № 3, 1969.
14. *Forsyth W. G. C., Webley D. M.* The synthesis of polysaccharides by bacteria isolated from soil. *J. Gen. Microbiol.*, 1949.
15. *Katona J.* Použití komplexů polysaccharid-chrom při přípravě moderních vrtných vyplachů. VIII. Mezinárodní ved. konference o geochemických a fyzikálně chemických problémech při průzkumu a těžbě ložisek živič. *Geochem.*, 1976.
16. *Sevag M. G., Lackman David B., Smolens J.* The isolation of the components of Streptococcal nucleoproteins in aerologically active form. *Biol. Chem.*, 1938.
17. *Lasik J., Stanek M.* *Tanthomonas fuscans* (Burkholder) Burk. v rhizoafere fazok. *Rostlinna vyroba*, 9, 1963.

Микробиологический институт
АН ЧССР
Прага

Дата поступления
17.II.1976 г.

Ya. LASIK, S. A. GORDIENKO

BIOCOMPLEXES OF SOIL AND RHIZOSPHERE BACTERIA

The ability of polysaccharides to bind the metal ions affects the activity of soil microorganisms. In order to know the reasons of polysaccharide high resistance to bacterial decomposition the exocellular polysaccharides isolated from the soil bacteria have been tested. The initial pH value of the polysaccharides was between 6,7—7,2. The higher concentration of metal ions caused an increase in the «pH-effect» and in the complexing ability. Simultaneously with the formation of metal hydroxides the biocomplexes were formed. Metal ions bound in the complex reduced the degradation rate and the utilization of biocomplexes by bacterial culture in vitro.