

УДК 631.417.2:631.46

ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА И СВОЙСТВ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ АВТОХТОННОЙ МИКРОФЛОРЫ

О. Д. СИДОРЕНКО, В. А. КОНЧИЦ, В. А. ЧЕРНИКОВ, А. А. ВАНЬКОВА
(Кафедра микробиологии, кафедра физической и коллоидной химии)

На современном этапе развития земледелия количество гумуса и его качественный состав рассматриваются не только как основа потенциального плодородия почвы, но и как необходимый фактор повышения эффективности минеральных удобрений. Это особенно важно в условиях интенсификации сельского хозяйства при использовании высоких доз минеральных удобрений.

Имеющиеся в литературе данные о разложении гумуса микроорганизмами относятся главным образом к разложению гуматов Na и Ca [6, 8, 10, 12]. Они подтверждают существование специфической автохтонной микрофлоры, участвующей в разложении гумусовых соединений, предсказанное С. Н. Виноградским [3]. В этих работах установлены оптимальные условия разложения гумуса почвенными микроорганизмами и показано, что представители автохтонной микрофлоры способны использовать гумус как единственный источник углерода и азота.

Биологической трансформации органо-минеральных комплексов фульвокислот с полуторными окислами посвящены исследования Т. В. Аристовской [1, 2]. Вопросы трансформации гуминовых кислот (ГК) под воздействием различных групп микроорганизмов рассматривались ранее многими авторами. Считалось, что благодаря ароматической природе ядра гумусовых веществ они приобретают устойчивость к действию почвенной микрофлоры.

В дальнейшем было показано, что отдельные представители почвенных бактерий и грибов способны разлагать ГК [9, 13], но данные о возможных изменениях состава и свойств гумусовых веществ при воздействии микроорганизмов в этих работах отсутствуют.

Нами по данным элементного состава и ИК-спектроскопии изучались изменения, происходящие в структуре ГК при воздействии на них микроорганизмов рода *Nocardia*. Установлено, что после 3 мес микроорганизмы расшатывают структуру ГК,

разрывают непрочные связи, потребляя углерод и азот периферической части. Ядерная часть этих кислот становится менее конденсированной, с развитыми боковыми радикалами. После 6-месячного воздействия ГК становятся более конденсированными и восстановленными, что свидетельствует об отщеплении кислородсодержащих группировок периферической части.

Целью настоящей работы является сравнительное исследование изменений состава и свойств ГК под действием различных групп микроорганизмов, способных расщеплять сложные органические соединения типа парафинов и нефтяных продуктов при использовании их в качестве единственного источника углерода и азота [4, 7].

Методика постановки опыта

Для выявления способности микроорганизмов разлагать ГК был поставлен длительный опыт (8 мес) с чистыми культурами родов *Nocardia rubra*, *Micromonospora* sp. и *Agrobacter* *oriza* nov. sp. При закладке опыта во всех трех вариантах использовали минеральную среду Виноградского и гумат Na: 1-й вариант — без инокуляции (контроль); 2-й — KNO_3 (источник азота) с инокуляцией микроорганизмами — вариант условно назван «ГК-С»; 3-й вариант — глюкоза (источник углерода) с инокуляцией микроорганизмами — вариант условно назван «ГК-Н». Используемая в опыте ГК соответствовала техническим условиям ИОП316-69.

Стерилизация гуминовых препаратов проводилась через бактериальный фильтр Зейца. После инокуляции чистыми культурами бактерий колбочки помещали в термостат при 22—25°. В конце опыта клетки микроорганизмов были отделены центрифугированием, а ГК осаждали H_2SO_4 и отделяли центрифугированием. Очищенный осадок ГК высушивали и определяли его массу. Препарат ГК подвергали химическому анализу по методике, описанной в работе [11].

Т а б л и ц а 1

Разложение ГК бактериями
после 8-месячной инкубации

Бактериальная культура	Численность микроорганизмов на 1 мл суспензии, млн.		Содержание ГК после 8 мес., мг	Разложение ГК, %
	исходная	конечная		
Контроль	—	—	37,3	0
ГК-N				
Нокардия	46,2	127,8	9,9	73,2
Микромоноспора	83,1	94,8	32,9	11,7
Артробактер	30,4	73,2	24,8	33,4
ГК-С				
Нокардия	46,2	153,8	5,33	85,7
Микромоноспора	83,1	120,1	30,4	19,4
Артробактер	30,4	102,3	23,3	40,2

Разложение ГК бактериями

В наших опытах ГК служили единственным источником либо углерода (ГК-С), либо азота (ГК-N). За 8 мес инкубации в обоих вариантах культурой нокардий было разложено наибольшее количество ГК, микромоноспорой — наименьшее (табл. 1). В варианте ГК-С процент разложения ГК всеми культурами был заметно выше, чем в варианте ГК-N. Такая же тенденция отмечалась и в изменении численности микроорганизмов после взаимодействия, т. е. в первом случае она возросла более значительно, чем в последнем. При этом относительное увеличение численности клеток микромоноспоры было в 2 с лишним раза меньше, чем нокардии и артробактера.

Элементный состав ГК

В а р и а н т Г К - N. При воздействии на ГК всех микроорганизмов содержание уг-

лерода возросло (табл. 2). Особенно заметно этот показатель увеличился под действием артробактера. Содержание водорода в случае нокардии и микромоноспоры уменьшилось, разница составила соответственно 0,38 и 0,53 %, при воздействии артробактера количество водорода осталось на уровне контроля. Содержание кислорода в случае микромоноспоры и артробактера мало изменилось по сравнению с контролем, при воздействии нокардии уменьшилось — разница 1,5 %.

Содержание азота в случае микромоноспоры и артробактера уменьшилось — разница соответственно 0,70 и 1,51 %, в то время как при воздействии нокардии — увеличилось (1,22 %).

Таким образом, при использовании ГК в качестве источника азота доля углерода в их составе увеличилась, водорода и азота — уменьшилась.

Восстановленность ГК после воздействия всех микроорганизмов заметно уменьшилась, особенно в случае микромоноспоры. Такие культуры, как микромоноспора и прежде всего артробактер, увеличивали отношение С/N, а нокардия — заметно уменьшала.

Для характеристики процессов, приводящих к изменению элементного состава ГК под воздействием микроорганизмов, использовался графо-статистический анализ по Ван-Кревелену [5]. Наибольшее воздействие на элементный состав ГК оказывала микромоноспора, что обусловлено наличием процесса дегидрогенизации (рис. 1). В случае нокардии и артробактера трансформация ГК связана с дегидратацией. Следует отметить, что при использовании ГК в качестве источника азота направленность процессов их трансформации при воздействии различных групп микроорганизмов более однообразная, чем при использовании ГК в качестве источника углерода.

В а р и а н т Г К - С. В этом варианте такие культуры, как нокардия и артробактер, приводили к уменьшению содержания в ГК углерода, водорода и азота, причем наиболее резко уменьшилось количество азота в последнем случае (разница 0,45 % по сравнению с контролем).

Т а б л и ц а 2

Элементный состав ГК при воздействии различных микроорганизмов

Бактериальная культура	Зола	С	Н	N	O*	H/C		C/N по массе	ω	
	мас. % на беззольную основу					атомные				
ГК-N										
Контроль	2,96	55,5	6,68	5,20	32,6	1,43	0,44	10,7	—0,552	
Нокардия	1,84	56,2	6,30	6,42	31,1	1,34	0,42	8,75	—0,485	
Микромоноспора	2,26	56,5	6,15	4,50	32,8	1,30	0,44	12,3	—0,424	
Артробактер	2,22	56,9	6,67	3,69	32,7	1,39	0,43	15,4	—0,533	
ГК-С										
Контроль	2,77	54,5	6,51	4,98	34,0	1,42	0,47	10,9	—0,487	
Нокардия	2,67	53,3	6,41	4,89	35,4	1,43	0,50	10,9	—0,435	
Микромоноспора	1,97	52,6	6,55	6,61	34,3	1,48	0,49	7,95	—0,506	
Артробактер	1,49	53,4	6,18	4,53	35,9	1,38	0,51	11,8	—0,370	

* Вычисляли по разности.

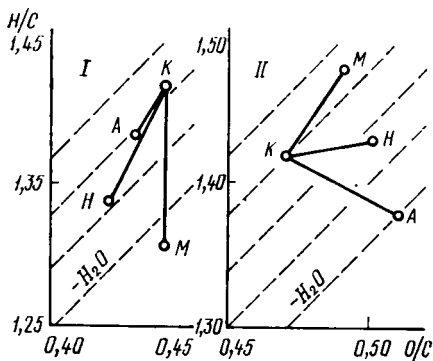


Рис. 1. Диаграмма атомных отношений в вариантах ГК-N (I) и ГК-C (II).

К — контроль; Н — нокардия; М — микромоноспора; А — артробактер.

Микромоноспора вызвала наиболее значительное по сравнению с контролем снижение количества углерода в ГК; содержание остальных элементов и особенно азота увеличивалось (табл. 2).

Таким образом, при использовании ГК в качестве источника углерода доля углерода, водорода и азота в их составе уменьшилась, кислорода — увеличилась. И только в случае микромоноспоры содержание азота возросло — разница с контролем составила 1,63%. Восстановленность ГК в результате воздействия микромоноспоры увеличивалась, в то время как нокардия и артробактер приводили к снижению этого показателя. Артробактер вызывал некоторое увеличение отношения C/N, микромоноспора, наоборот, заметное уменьшение.

При использовании ГК в качестве источника углерода их трансформация связана с влиянием различных процессов (рис. 1). В случае микромоноспоры наблюдается гидратация ГК, нокардии — гидратация и окисление, в случае артробактера — карбоксилирование.

На основании полученных данных можно заключить, что более или менее единого характера воздействия микроорганизмов на ГК при использовании их в качестве источника углерода не прослеживалось. Можно лишь отметить, что все процессы идут с участием кислорода.

ИК-спектроскопия ГК. Вариант ГК-N

Контроль. В области спектра 3800—2600 см^{-1} имеются интенсивные полосы поглощения валентных колебаний CH_3 - и CH_2 -групп при 2935 и 2865 см^{-1} , в области 1900—700 см^{-1} — набор полос различной интенсивности (рис. 2). Наиболее интенсивны полосы поглощения карбонильных группировок при 1720 и 1650 см^{-1} , особенно первая. В области 1500—1300 см^{-1} появляются полосы поглощения при 1465, 1425, 1390 см^{-1} . Первая и последняя обусловлены деформационными колебаниями метильных и метиленовых группировок. В области 1300—1000 см^{-1} имеется ряд слабых полос поглощения (1280, 1240, 1130, 1090 и 1075 см^{-1}), обусловленных наличием кислородсодержащих группировок (эфирных и

спиртовых), а также незначительные по интенсивности полосы поглощения при 840 и 780 см^{-1} .

ГК + нокардия. При использовании ГК в качестве источника азота несколько уменьшается интенсивность полос поглощения валентных колебаний метильных и метиленовых группировок и их деформационных колебаний. Интенсивность полосы поглощения карбонильной группировки при 1720 см^{-1} заметно возрастает, что может быть обусловлено увеличением количества карбоксильных групп в составе ГК. Несколько уменьшается интенсивность полосы поглощения при 1465 см^{-1} , и становится значительно меньше интенсивность полос поглощения кислородсодержащих группировок в области 1200—1000 см^{-1} (спиртовых).

ГК + микромоноспора. Спектр данного варианта по набору полос поглощения очень сходен со спектром контроля. Некоторые изменения отмечаются в области 1300—1200 см^{-1} : полосы поглощения эфирных группировок менее интенсивные, чем в контроле. Практически отсутствует полоса поглощения при 840 см^{-1} , и слабо проявляется полоса поглощения при 780 см^{-1} .

ГК + артробактер. Спектр ГК данного варианта также очень сходен с контролем, лишь интенсивность полосы поглощения карбонильной группировки при 1720 см^{-1} , как и в случае с нокардией, практически равна интенсивности полосы поглощения при 1650 см^{-1} . Это может свидетельствовать об увеличении количества карбоксильных групп в составе ГК после воздействия на их культуры артробактера.

ИК-спектроскопия ГК. Вариант ГК-C

Контроль. В области 3800—2600 см^{-1} имеются интенсивные полосы поглощения валентных колебаний метильных и метиленовых групп при 2935 и 2865 см^{-1} . В об-

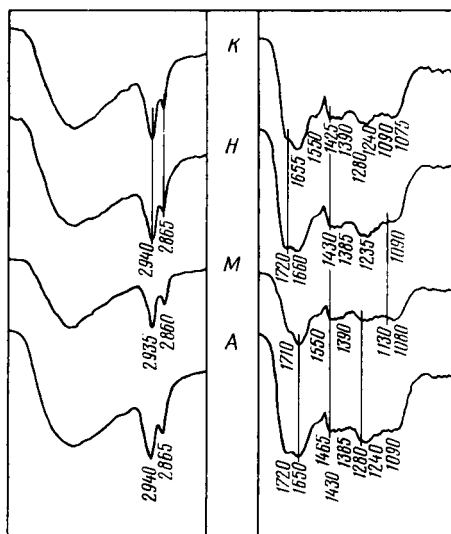


Рис. 2. ИК-спектры ГК в варианте ГК-N

Обозначения те же, что на рис. 1.

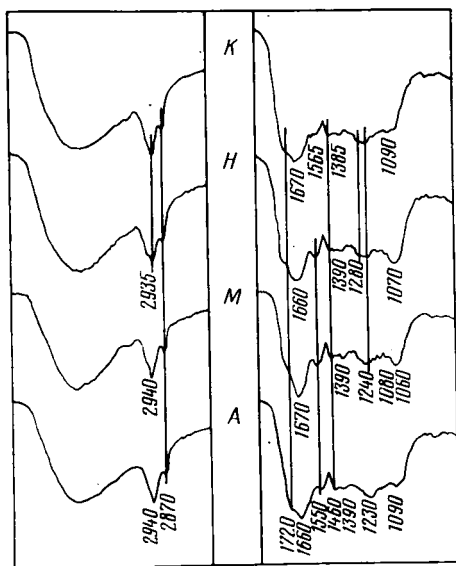


Рис. 3. ИК-спектры ГК в варианте ГК-С. Обозначения те же, что на рис. 1.

ласти 1900—700 см^{-1} есть ряд полос поглощения, из них наиболее интенсивны полосы поглощения карбонильных группировок при 1720 и 1670 см^{-1} , второе место по интенсивности занимают полосы поглощения кислородсодержащих группировок при 1280 и 1235 см^{-1} (рис. 3).

ГК + нокардия. Интенсивность валентных и деформационных колебаний метильных и метиленовых группировок не изменяется, но увеличивается интенсивность карбонильного поглощения при 1665 см^{-1} . Появляется полоса поглощения ионизированной карбоксильной группы при 1550 см^{-1} , заметно увеличивается интенсивность полос поглощения кислородсодержащих группировок в области 1100—1000 см^{-1} .

ГК + микромоноспора. Интенсивность валентных колебаний метильных и метиленовых групп несколько меньше, чем в контроле, но деформационные колебания выражены четче (при 1465 и 1390 см^{-1}). Интенсивность кислородсодержащих группировок в области 1300—1200 см^{-1} меньше, чем в контроле, но в области 1100—1000 см^{-1} , наоборот, больше. Карбонильная группировка при 1720 см^{-1} практически ис-

чезла, но имеется полоса поглощения ионизированного карбоксила при 1550 см^{-1} . В большей мере возросла интенсивность полосы поглощения карбонильной группировки при 1670 см^{-1} .

ГК + артробактер. Спектр мало отличается от спектра контроля по интенсивности полос поглощения и их набору. Лишь интенсивность валентных колебаний метильных и метиленовых групп несколько меньше, а интенсивность полосы поглощения карбонильной группировки при 1665 см^{-1} несколько больше.

Выводы

1. ГК в наибольшем количестве разлагаются в варианте ГК-С, о чем свидетельствуют процент их усвоения и увеличение численности клеток микроорганизмов после взаимодействия. По эффективности воздействия на ГК микроорганизмы в обоих вариантах можно расположить в следующий ряд: нокардия > артробактер > микромоноспора.

2. В варианте ГК-Н в результате воздействия микроорганизмов в ГК увеличилось количество углерода и уменьшились содержание водорода, азота, а также степень восстановленности, т. е. произошло обогащение ГК кислородом. Это подтверждается данными ИК-спектроскопии, в частности увеличением интенсивности поглощения карбонильных группировок. Трансформация ГК связана прежде всего с дегидратацией (нокардия и артробактер) и дегидрогенизацией (микромоноспора).

3. Деградация ГК в варианте ГК-С (судя по численности клеток микроорганизмов, проценту разложения ГК, данным элементного состава и ИК-спектроскопии) более значительная, чем в варианте ГК-Н. Процессы трансформации гуминовых кислот в этом варианте более разнообразны (микромоноспора вызывает гидратацию ГК, нокардия — окисление и гидратацию, артробактер — карбоксилрование). Это подтверждается данными ИК-спектроскопии, поскольку в результате воздействия всех культур в спектрах ГК увеличивается интенсивность либо карбонильного поглощения, либо поглощения кислородсодержащих группировок в области 1100—1000 см^{-1} . Можно утверждать, что все процессы трансформации ГК в данном варианте идут с включением кислорода.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аристовская Т. В. Аккумуляция железа при разложении органо-минеральных комплексов гумусовых веществ микроорганизмами. — Докл. АН СССР, т. 136, № 4, 1961, с. 954. — 2. Аристовская Т. В. О разложении органо-минеральных соединений в подзолистых почвах. — Почвоведение, 1963, № 1, с. 30. — 3. Виноградский С. Н. Микробиология почвы. Проблемы и методы. М.: Изд-во АН СССР, 1952. — 4. Квасников Е. И., Нестеренко О. А., Ключникова Т. М., Павленко Н. И., Писарчук Е. Н. Олигонитрофильные коринеподобные бактерии и нокардии, усваивающие углеводороды. — Изв. АН СССР, сер. биол., 1971, № 4, с. 551. — 5. Кревелен Ван. Нау-

ка об угле. М.: ИЛ, 1960. — 6. Лазарев Н. М. Типы биоорганоминеральных систем различных почв. — Тр. ВНИИ с.-х. микробиол. за 1941—1945 гг., 1949, вып. 1, с. 23. — 7. Лысак Л. В. Биология почвенных психрофильных коринеподобных бактерий. — Автореф. канд. дис., МГУ, 1978. — 8. Мишустин Е. Н., Никитин Д. И. Атактуемость гуминовых кислот почвенной микрофлорой. — Микробиология, 1961, т. 30, вып. 5, с. 841. — 9. Мурзаков Б. Г., Васильева Л. В. Разложение фракций фульвокислот под действием почвенной микрофлоры. — Изв. АН СССР, сер. биол., 1970, № 6, с. 906. — 10. Никитин Д. И. Условия, определяющие активность разложения гуминовой кислоты бактерия-

ми. — Тр. Ин-та микробиол. АН СССР, 1961, вып. 11, с. 41. — 11. Сидоренко О. Д., Аристархова В. И., Черников В. А. Изменения состава и свойств гуминовых кислот под воздействием микроорганизмов рода *Nocardia*. — Изв. АН СССР, сер. биол., 1978, № 2, с. 195. — 12. Теп-

пер Е. З. О бактериях автохтонной микрофлоры почвы, разлагающих гумусовые вещества. — Микробиология, 1963, т. 32, вып. 4, с. 655.— 13. Теппер Е. З. Микроорганизмы рода *Nocardia* и разложение гумуса. М.: Наука, 1976.

Статья поступила 25 ноября 1982 г.

SUMMARY

The work investigated the ability of some representative of autochthonous microflora (*Nocardia rubra*, *Micromonospora* sp., *Artrobacter oriza* nov. sp.) to assimilate humic acids. The largest amount of humic acids is assimilated by microorganisms of the given group in the case when these acids are the only source of carbon in the nutritive mixture.