

УДК 631.417.2:631.46

ТРАНСФОРМАЦИЯ ГУМУСОВЫХ ВЕЩЕСТВ ПОЧВЕННЫМИ АНАЭРОБНЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Р. В. РУЧКО

(Кафедра микробиологии)

Изучение почвенных анаэробов становится все более актуальным в связи с накопившимися данными о чрезвычайно большой гетерогенности их по физиолого-биохимическим свойствам, о синтезе ими различных групп ферментов — протеаз, липаз, целлюлаз и способности при этом разрушать биополимеры (липиды, углеводы, белки). Показано, что микроорганизмы рода *Clostridium* могут использовать в качестве энергетических субстратов чрезвычайно широкий круг ароматических соединений.

Способность анаэробов рода *Clostridium* использовать гумусовые вещества изучена недостаточно. Установлено [5, 6], что гуминовые кислоты благоприятно воздействуют на их развитие. *Clostridium pasteurianum* качественно изменяют эти кислоты. Благоприятное воздействие гумусовых веществ, находящихся в почвенных средах, можно, по-видимому, связать с тем, что они и входящие в их состав фенольные соединения обладают восстанавливающими антиокислительными свойствами и способностью ингибировать свободно радикальные процессы [2, 7].

Отмечается также [4], что углеводные компоненты, входящие в состав гумусовых веществ, не являются примесью, они представляют собой конституционные фрагменты молекул. В гумусовые вещества, вероятно, могут входить пектиновые вещества, образующиеся в результате «реакции дубления» [2]. По-видимому, как углеводные, так и протеиновые компоненты гумусовых веществ могут использоваться облигатно-анаэробными бактериями.

Нами изучались химические изменения, происходящие в гумусовых соединениях в результате жизнедеятельности чистых культур микроорганизмов рода *Clostridium*.

Объекты и методы исследования

Чистые культуры анаэробов рода *Clostridium* были выделены из дерново-подзолистой почвы (*Clostridium* sp. штамм 4) и краснозема (*Clostridium* sp. штамм 17) по методикам, подробно описанным в работе [3]. Разведения почв готовили на стерильном растворе цистенна (0,05 %). Минеральная основа всех используемых сред: Na_2HPO_4 — 0,1 %; KH_2PO_4 — 0,05; MgSO_4 — 0,05 %; FeSO_4 — следы; смесь микроэлементов по Федорову (1957) — 1 мл; CaCO_3 — 0,5 %; цистенин — 0,05, нейтральрот — 0,004 %.

Полученные чистые культуры *Clostridium* выращивали на 50 % картофельно-морковном агаре с аденозином: картофельно-морковный отвар — 500 мл, МО — 500 мл, глюкоза — 0,5 %, дрожжевой автолизат — 0,002, аденозин — 0,1, агар-агар — 2,0 %.

Культуры *Clostridium* относятся к пуринолитической группе, идентифицированы как *Clostridium* sp. штамм 4 и *Clostridium* sp. штамм 17.

Из дерново-подзолистой супесчаной почвы (Ленинградская область) были выделены препараты гумусовых кислот при помощи 0,2 н. раствора NaOH (1 кг почвы заливали 5 л щелочи). Эти препараты дважды переосаждали и тщательно очищали диализом.

Опыт проводили в жидких культурах. Гумусовые кислоты вносили в качестве единственного источника углерода раздельно из расчета 50 мг последнего на 50 мл среды в пробирке. Использовали синтетическую среду следующего состава: МО — 1000 мл, дрожжевой автолизат — 0,002 %, аденозин — 0,1 %.

В отдельный вариант дополнительно была добавлена глюкоза в качестве ко-субстрата (0,5 %).

Среду с внесенными гуматами заражали суспензией отмытых клеток чистых культур *Clostridium*. Инокулированные пробирки выдерживали при температуре 37° в течение 45 и 75 дней.

После снятия серии опыта среду с гуматами центрифугировали при 20 000 об/мин (после доведения до pH 7,0). Центрифугат тщательно очищали диализом и высушивали до сухого остатка при 60°.

О трансформации гумусовых кислот судили по данным элементного и функционального анализов. Содержание углерода и водорода определяли методом сухого сжигания в быстром токе кислорода по методике, описанной В. А. Климовой [1], азот — методом микроКельдаля, карбоксильную группу (—COOH) — хемосорбционным методом с ацетатом кальция, сумму карбоксильных групп и фенольных гидроксильных (—COOH и —OH фен) — хемосорбционным методом с гидроокисью бария.

Обсуждение полученных результатов

Присутствие в среде гумусовых кислот не только не приводило к угнетению роста *Clostridium*, но и стимулировало накопление биомассы. Четко прослеживалось просветле-

Изменение элементного состава фульвокислот (Φ_R) и гуминовых кислот (Γ_R) при их разложении чистой культурой *Clostridium* sp. штамм 4 (мг-экв на 1 г сухого вещества)

Вариант опыта	Срок инкубирования, сут	C	H	N	O	C:H	C:N	O:H
Φ_R — контроль		43,7	5,38	2,6	48,4	8,1	16,8	9,0
$\Phi_R + Clostridium$ sp. штамм 4	45	46,1	4,54	1,5	47,7	10,2	30,7	10,6
То же	75	46,8	4,17	1,31	47,6	11,2	35,7	11,3
$\Phi_R +$ глюкоза + <i>Clostridium</i> sp. штамм 4	45	47,4	3,91	1,3	47,5	12,1	36,5	12,2
То же	75	36,2	4,63	1,21	57,9	7,8	29,9	12,6
Γ_R — контроль		55,4	4,24	4,6	35,7	13,1	12,0	8,5
$\Gamma_R + Clostridium$ sp. штамм 4	45	57,1	3,52	2,3	37,0	16,1	24,8	10,6
То же	75	57,7	3,42	2,2	36,6	16,9	26,2	10,8
$\Gamma_R +$ глюкоза + <i>Clostridium</i> sp. штамм 4	45	58,3	3,14	2,2	36,3	18,6	26,5	11,7
То же	75	53,4	4,41	2,18	40,0	12,1	24,5	9,1

ние среды с гуматами, инокулированной *Clostridium*.

Фульвокислоты интенсивнее и легче минерализуются анаэробами рода *Clostridium*, чем гуминовые кислоты, строение которых более сложное. Фульвокислоты отличаются от гуминовых кислот меньшим содержанием углерода, более широким отношением Н:С, повышенным содержанием азота и более высокой степенью окисленности. Периферические окончания типа $-\text{CH}_3$, CH_2 у них лучше развиты, в составе молекулы больше полисахаридных компонентов.

В процессе разложения гумусовых соединений под влиянием *Clostridium* наиболее сильно изменяется содержание азота. Это говорит о том, что он активно используется *Clostridium* sp. штамм 4. Так, при разложении фульвокислот *Clostridium* sp. штамм 4 содержание азота снижается до 1,50 и 1,31 мг-экв на 1 г сухого вещества соответственно на 45-е и 75-е сутки инкубирования против 2,6 мг-экв на 1 г сухого вещества в контроле (табл. 1). Причем этот процесс особенно интенсивен на первой стадии трансформации фульвокислот.

В более поздний срок наблюдения (75-е сутки) содержание азота в составе молекул фульвокислот изменяется незначительно. Вероятно, это связано с тем, что на

первых стадиях разложения гумусовых кислот анаэробами используется азот боковых аминокислотных цепочек. По мере его исчезновения интенсивность разложения фульвокислот резко снижается, что свидетельствует о меньшей доступности анаэробам гетероциклического азота.

При увеличении срока инкубирования в составе молекул фульвокислот возрастает содержание углерода (табл. 1). Это свидетельствует о том, что фульвокислоты становятся более конденсированными в связи с увеличением доли циклических группировок при отщеплении некоторой части алифатических цепей.

Наряду с уменьшением количества алифатических цепей в молекулах снижается содержание водорода. В гуминовых кислотах его количество на 75-е сут инкубирования в варианте без ко-субстрата составило 3,42, а в контроле — 4,24 мг-экв на 1 г сухого вещества (табл. 1).

Наиболее окисленными являются исходные гумусовые кислоты. После воздействия микроорганизмов гуминовые и фульвокислоты становятся значительно более восстановленными. Это указывает на то, что к концу процесса инкубирования происходит отщепление кислородсодержащих группировок периферической части.

Таблица 2

Изменение содержания функциональных групп в составе фульвокислот (Φ_R) и гуминовых кислот (Γ_R) при их разложении чистыми культурами *Clostridium* sp. штамм 4 и *Clostridium* sp. штамм 17 (мг-экв на 1 г сухого вещества). Срок инкубации 45 сут

Вариант опыта	—COOH	—OH	Вариант опыта	—COOH	—OH
Φ_R — контроль	4,96	3,20	Γ_R — контроль	2,60	3,17
$\Phi_R + Clostridium$ sp. штамм 4	4,23	3,58	$\Gamma_R + Clostridium$ sp. штамм 4	2,13	3,49
То же + глюкоза	3,77	3,42	То же + глюкоза	1,90	3,88
$\Phi_R + Clostridium$ sp. штамм 17	4,05	3,44	$\Gamma_R + Clostridium$ sp. штамм 17	1,82	3,66
То же + глюкоза	3,20	3,65	То же + глюкоза	1,55	4,26

В гумусовых кислотах постепенно возрастает степень ароматичности (С:Н) вследствие частичной деструкции — отщепления белковых алифатических цепей, а также дезаминирования и внутримолекулярных перегруппировок.

Изменяется и содержание функциональных групп в составе гумусовых молекул. Количество кислых групп ($-\text{COOH}$) в них заметно снижается (табл. 2), поскольку в процессе разложения гумусовых веществ анаэробами в первую очередь используются боковые цепочки и функциональные группы гумусовых молекул.

Содержание фенольных и спиртовых гидроксильных групп ($-\text{OH}$) к первому сроку инкубации увеличивается, что, возможно, связано с восстановлением гумусовых кислот группы $-\text{C}=\text{O}$ до $-\text{OH}$ групп при их разложении.

В процессе гидрогенизации альдегиды и кетоны, как известно, восстанавливаются до первичных и вторичных спиртов. При микробиологическом разложении гумусовых соединений их восстановление может катализироваться дегидрогеназами.

При гидроксировании нарушается ароматичность молекулы, обуславливающая устойчивость вещества к окислению. Часто в дальнейшем происходит быстрое окисление ароматических соединений, в результате ко-

торого раскрывается ароматическое кольцо.

При добавлении глюкозы в качестве ко-субстрата четко прослеживается начальная стадия деградации ароматических ядер. Содержание углерода в фульвокислотах на 75-е сутки инкубации снижается до 36,2, в гуминовых кислотах — до 53,4 мг·экв на 1 г сухого вещества (табл. 1).

Азот гумусовых кислот более доступен при наличии в среде легкодоступного источника углерода и энергии, каким является глюкоза.

Выводы

1. Гумусовые кислоты в результате микробиологической трансформации анаэробами рода *Clostridium* изменяются по окислительно-гидролитическому типу, в результате в макромолекулах снижается доля периферической части, повышаются обуглероженность, окисленность и ароматичность этих кислот.

2. Фульвокислоты интенсивнее и легче минерализуются микроорганизмами рода *Clostridium*, чем гуминовые кислоты.

3. Добавление глюкозы в качестве ко-субстрата ускоряет и усиливает разложение гумусовых соединений, предопределяет начальную стадию деградации ароматических ядер.

ЛИТЕРАТУРА

1. Климова В. А. Основные микрометоды анализа органических соединений. М.: Химия, 1975. — 2. Кононова М. М. Органическое вещество почвы, его природа, свойства и методы изучения. М.: Изд-во АН СССР, 1965. — 3. Мишустин Е. Н., Емцев В. Т. Почвенные азотфиксирующие бактерии рода *Clostridium*. М.: Наука, 1979. — 4. Орлов Д. С., Садовникова Л. К. Содержание и распределение углеводов в главнейших типах почв

СССР. — Почвоведение, 1975, № 8, с. 35. — 5. Рыбалкина А. В. Влияние гуминовой кислоты на развитие *Clostridium pasteurianum*. — Тр. Ин-та микробиологии, 1958, вып. 5, с. 136. — 6. Lantzsch K. — Zbl. Bakt., 1921, 2, 1. — 7. Senezi N., Schnitzer M. — Thierd international symposium on environmental biogeochemistry. Abstract. Univ. of Oldenburg, 1977, N 1, p. 114.

Статья поступила 21 марта 1983 г.