

УДК 631.461.51:631.417.2

РАЗЛОЖЕНИЕ ГУМУСОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ АНАЭРОБНЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ РОДА CLOSTRIDIUM

Р. В. РУЧКО, Н. А. ТУЕВ, В. Т. ЕМЦЕВ
(Кафедра микробиологии)

Минерализация всех форм органической материи, в частности гумусовых соединений, является основной биологической функцией хемоорганотрофных микроорганизмов, в том числе и анаэробных. Анаэробов в природе чрезвычайно много, и они весьма разнообразны, но из-за трудностей выделения и культивирования эти микроорганизмы относительно слабо изучены. Недостаточно исследовано и участие их в трансформации гумусовых соединений.

Характерной особенностью гумусовых веществ является их исключительная гетерогенность [3], обусловленная наличием органических соединений, заметно различающихся по химическому составу и строению. В то же время фракции гумуса в неодинаковой степени подвержены микробиологическому разложению. Различают фракции лабильные, со средней и сильной устойчивостью к биодеградации.

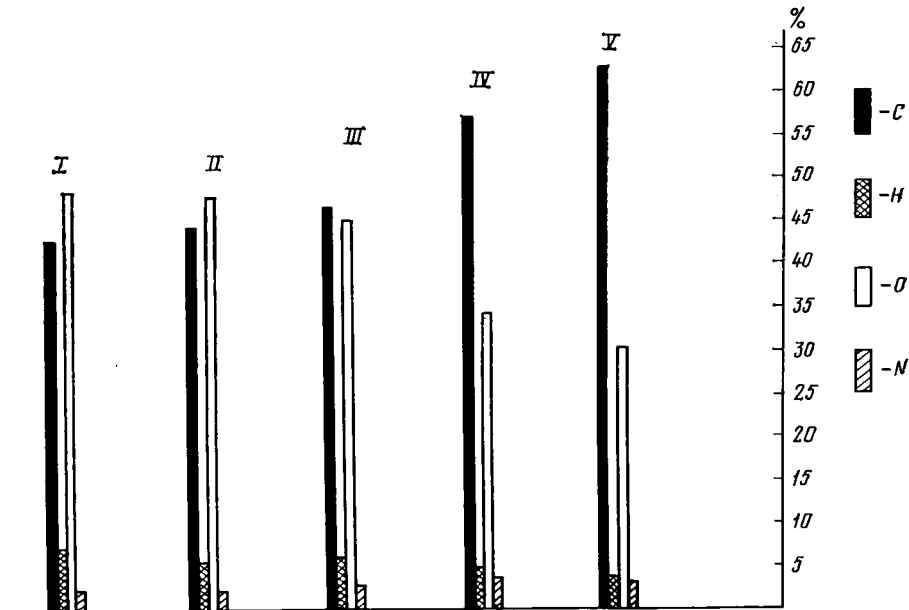
Нами изучалась микробиологическая трансформация различных фракций гумусовых соединений чистыми культурами анаэробов

рода *Clostridium*. Цель исследований — вскрыть механизм разложения гумусовых веществ данными микроорганизмами и количественно охарактеризовать изменения, происходящие в процессе микробиологического разложения их фракций. В состав каждой фракции входит определенный набор органических соединений, более или менее однородных по строению, что позволяет говорить о сходном механизме микробиологического разложения в каждой фракции.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования служили чистые культуры анаэробов рода *Clostridium* (*Cl. sartagoformum* и *Cl. paraputrificum*), выделенные из дерново-подзолистой почвы опытного поля Тимирязевской академии.

Гумусовые вещества извлекали из дерново-подзолистой почвы (Ленинград. обл.) раствором пиррофосфата и фракционировали методом гельфильтрации на молселектах G-10, G-50 и сефадексе G-75 фирмы Upsalla



Элементный состав отдельных фракций гумуса исходной дерново-подзолистой супесчаной почвы (экспликация дана в тексте).

Трансформация гумусовых веществ (ГВ) при их разложении чистой культурой *Cl. parapatriticum*. ГВ — единственный источник углерода

Срок инкубации, дни	Элементный состав, % на сухое беззольное вещество				Н С	С N	О Н	Функциональный анализ, мг экв на 1 г препарата			—ОСН ₂ —, %
	С	Н	N	О				—COOH	—OH	—C=O	
I фракция											
Исходный	42,5	6,3	2,4	48,8	1,8	20,8	0,5	5,5	3,9	3,4	0,31
30	44,9	4,4	1,6	49,1	1,2	34,0	0,7	3,9	3,6	2,2	0,14
90	46,8	3,3	1,3	48,7	0,8	43,3	0,9	3,5	2,8	2,9	0,04
II фракция											
Исходный	44,6	5,5	2,1	47,8	1,5	24,8	0,5	5,1	3,1	3,1	0,67
30	46,7	3,8	1,4	48,3	1,0	38,9	0,8	3,7	2,8	2,3	0,29
90	48,4	3,2	1,2	47,6	0,8	40,3	0,9	3,2	2,1	2,6	0,15
III фракция											
Исходный	46,7	5,2	2,7	45,4	1,3	20,5	0,5	4,2	2,7	2,7	0,54
30	48,4	3,8	1,9	46,0	1,0	28,8	0,8	3,2	2,3	2,5	0,28
90	48,3	3,8	1,5	46,2	0,9	36,5	0,8	2,7	1,8	1,2	0,21
IV фракция											
Исходный	57,2	4,9	3,8	34,1	1,0	17,7	0,4	3,2	3,5	2,9	0,89
30	58,7	3,4	3,0	35,5	0,7	23,3	0,6	2,1	3,2	2,3	0,40
90	58,8	2,8	2,3	35,9	0,6	30,6	0,8	1,9	2,1	1,2	0,32
V фракция											
Исходный	62,6	3,7	3,1	30,5	0,7	23,7	0,5	1,7	2,9	2,1	1,23
30	63,4	2,2	2,4	31,2	0,4	31,1	0,9	1,0	2,3	1,3	0,76
90	63,4	2,4	2,3	31,6	0,5	29,3	0,8	1,0	1,9	1,0	0,79

(Швеция). Очистку гумусовых препаратов производили путем удаления битумной фракции, переходящей в спиртобензольную вытяжку, пропусканием через ионообменные смолы и электродиализом [6].

Гумусовые соединения в опытах использовали в качестве единственного источника углерода или азота для питания микроорганизмов из расчета 50 мг С на 50 мл среды.

В конце опыта гумусовые соединения освобождали от клеток микроорганизмов центрифугированием на лабораторной центрифуге типа VAC-25 при 20000 об/мин в течение 15 мин, а от микробных метаболитов — электродиализом и пропусканием через молселекты и сефадексы.

Об изменении химического состава гумусовых фракций в процессе их микробиологического разложения судили на основании результатов анализа их элементного и функционального составов. Элементный состав гумусовых веществ определяли на автоматическом анализаторе CHN-3 фирмы «Паккард», работающем по принципу газового хроматографа, карбоксильные группы (—COOH) — хемосорбционным методом с ацетатом кальция [5], сумму карбоксильных групп и фенольных гидроксильных (—COOH и —ОН фенол) — хемосорбционным методом с гидроксидом бария [5], карбонильные группы (—C=O) — методом оксимирования [3], метоксильные группы (—ОСН₃) — титриметрическим способом [5].

Молекулярные массы исследуемых фракций были следующие: I фракция — 520, II — 2100, III — 4900, IV — 9200, V — 27000.

Результаты и их обсуждение

Фракции гумусовых веществ заметно различались по элементному и функциональному составу (рисунок). Так, содержание углерода постепенно возрастало от I фракции к III, наиболее резко оно повышалось в IV и V фракциях. Содержание водорода, наоборот, было наименьшим в более углеродистых и наибольшим во фракциях с более низким содержанием углерода. Указанная закономерность в определенной мере свидетельствует о нарастании конденсированности молекул гумусовых соединений от I фракции к V. Исходя из элементного состава, первые три фракции можно отнести к фульвокислотам, а IV и V — к гуминовым.

Гумусовые фракции заметно различались по отношению Н:С, которое свидетельствует о степени ароматичности и конденсированности (сложности) фракций гумусовых веществ с разной молекулярной массой. Отношение С:N при переходе к высокомолекулярной фракции возрастает, что указывает на наличие в составе фульвокислотных фракций циклоалканов и разветвленных алканов, на их алифатический характер и наименьшую степень конденсированности.

Следовательно, степень ароматичности исследуемых гумусовых соединений возрастает от низкомолекулярных фракций к высокомолекулярным. Это также подтверждается данными об уменьшении количества водорода и увеличении содержания углерода в более тяжелых фракциях гумуса, отличаю-

Трансформация гумусовых веществ (ГВ) при их разложении чистой культурой *Cl. ragarutrificum*. Срок инкубирования — 30 дней.
ГВ — единственный источник азота

Вариант	Элементный состав, % на сухое беззольное вещество				Н С	С N	О H	Функциональный анализ, мг-экв на 1 г препарата			—OCH ₃ , %
	С	Н	N	О				—COOH	—OH	—C=O	
I фракция											
К	42,5	6,3	2,4	48,8	1,8	20,8	0,5	5,5	3,9	3,4	0,31
О	43,3	5,2	1,9	49,5	1,4	25,8	0,6	4,5	4,6	2,1	0,25
II фракция											
К	44,6	5,5	2,1	47,8	1,5	24,8	0,5	5,1	3,1	3,1	0,67
О	45,4	4,4	1,8	48,6	1,2	29,1	0,7	4,7	3,6	2,0	0,42
III фракция											
К	46,7	5,2	2,7	45,4	1,3	20,5	0,5	4,3	2,7	2,7	0,54
О	47,9	4,4	2,2	46,5	1,1	24,9	0,6	3,3	2,3	2,6	0,32
IV фракция											
К	57,2	4,9	3,8	34,1	1,0	17,7	0,4	3,2	3,5	2,9	0,89
О	57,9	4,1	3,3	35,7	0,8	20,1	0,5	2,7	4,1	1,8	0,63
V фракция											
К	62,6	3,7	3,1	30,5	0,7	23,7	0,5	1,8	2,9	2,1	1,23
О	62,9	2,8	2,8	31,7	0,5	26,2	0,7	1,5	3,2	1,6	1,06

Примечание. К — контроль; О — опыт.

щихся меньшим количеством алифатических цепочек, содержащих водород.

О степени окисленности исследуемых соединений можно судить по отношению О : Н. Окисленность фракций по мере увеличения молекулярной массы снижается, причем в первых трех фракциях она выше, чем в IV и V.

Функциональный анализ показал, что количество карбоксильных групп от I к V фракции заметно сократилось, особенно большие различия наблюдались между IV (3,18 мг-экв на 1 г препарата) и V (1,75 мг-экв) фракциями. Данные о количестве кислых групп свидетельствуют о более сильной выраженности кислотных свойств фульватных фракций гумуса, чем гуминовых кислот. От I фракции к V также уменьшалось количество гидроксильных и карбонильных групп. Содержание метоксильных групп в гумусовых фракциях было незначительным, в IV и V фракциях их содержалось несколько больше, чем в первых трех.

Таким образом, на основании данных о функциональном и элементном составе гумусовых фракций можно заключить, что при повышении молекулярной массы увеличивается доля конденсированной части молекулы — возрастает содержание углерода и азота, а водорода — снижается в связи с уменьшением количества алифатических цепей.

Наблюдались изменения элементного и функционального составов исследуемых фракций гумусовых веществ при разложении их чистой культурой *Cl. ragarutrificum* в том случае, когда гумусовые вещества яв-

лялись единственным источником углерода (табл. 1).

В процессе микробиологической трансформации элементный состав гумусовых фракций значительно изменялся. Прежде всего следует отметить некоторое увеличение содержания углерода (табл. 1). Процесс частичного обуглероживания наиболее четко прослеживается в ряду фульвокислотных фракций, менее выражен он у гуминовых кислот. Это, вероятно, свидетельствует о более интенсивном разложении фульвокислот, богатых периферическими цепочками, чем гуминовых кислот. Содержание водорода уменьшилось во всех фракциях, причем наиболее заметно оно снизилось в I фракции (на 48,0 % по сравнению с контролем во 2-й срок наблюдения), наименее — в III и V фракциях гумусовых соединений (соответственно на 26,7 и 34,1 %).

Содержание углерода в ядре гумусовых веществ больше, чем в среднем в молекуле [4]. Периферические, легко отщепляемые при гидролизе линейно полимеризованные цепочки углерода представлены в основном аминокислотами и углеводными остатками, а также различными реакционноспособными группами: карбоксильными, карбонильными, гидроксильными, метоксильными, аминогруппами и др. Они характеризуются относительно неустойчивыми химическими связями с ядерной частью гумусовых молекул и являются наиболее доступным энергетическим материалом для почвенных микроорганизмов.

На основании этого можно предположить, что в процессе разложения гумусовых веществ особенно быстро минерализуются бо-

ковые цепочки их молекул, отличающиеся от ядерных ароматических фрагментов более низким содержанием углерода.

Неодинаковая биохимическая устойчивость полученных фракций гумуса соответствует особенностям их молекулярной структуры.

Сужение отношения N : C в процессе минерализации гумусовых фракций указывает на частичное возрастание конденсированной ядерной части, а также на интенсивное разложение их периферических цепочек. Наиболее значительное изменение ароматичности после 60-дневного инкубирования с *Cl. paragartrificum* (от 6,7 до 14,2 % соответственно) отмечено у I фракции, где, по-видимому, идет очень интенсивная минерализация всех алифатических цепей. Следует отметить, что ароматичность I фракции после инкубирования с микроорганизмами даже превышает ароматичность исходной IV фракции.

В процессе минерализации микроорганизмами рода *Clostridium* особенно сильно изменилась азотистая часть гумусовых молекул. Как известно, формы азота в гумусовых кислотах весьма неоднородны. Они представлены аминными, аминокислотными и азотсодержащими гетероциклическими группировками.

Микроорганизмы рода *Clostridium* наиболее активно используют азот I и III фракций (на 45,8 и 44,4 % больше по сравнению с контролем во 2-й срок наблюдения). Об этом же свидетельствуют данные об изменении отношения C : N, которое в процессе минерализации гумусовых фракций значительно расширяется.

О динамике содержания азота в составе отдельных фракций гумусовых соединений в процессе их разложения при введении гумусовых веществ в качестве единственного источника азота можно судить из данных табл. 2. Азот гумусовых кислот легче усваивается при наличии в среде легкодоступного источника углерода и энергии, таким источником была глюкоза.

Во всех фракциях гумусовых соединений азот наиболее активно минерализуется в 1-й срок инкубирования (30 дней), ко 2-му сроку количество минерализуемого азота заметно снижается. Интенсивность минерализации азота в различных фракциях гумусовых соединений неодинаковая. Наименее значительно содержание азота снизилось в V фракции гумусовых соединений.

В 1-й срок инкубирования гумусовые соединения разлагаются более интенсивно, чем в последующие. Так, после 30-дневного инкубирования состав исследуемых гумусовых соединений изменился сильнее, чем через 60 дней. При разложении гумусовых соединений азот используется микроорганизмами в первую очередь и особенно активно на первых стадиях разложения гумуса (30 дней). В последующие сроки наблюдений его содержание в составе гумусовых молекул изменяется незначительно. Это, вероятно, связано с тем, что на первых стадиях разложения гумуса микроорганизмами используется азот боковых аминокислотных цепочек. По мере его исчезновения интенсивность разложения гумусовых соединений значительно снижается, что указывает на меньшую доступность микроорганизмам гетероциклического азота.

Из табл. 1 и 2 видно, что содержание функциональных групп в составе гумусовых молекул в процессе разложения снижается. Заметно сильнее уменьшается число карбоксильных групп в более высокомолекулярных фракциях — IV и V (соответственно на 41,3 и 41,1 % по сравнению с контролем ко 2-му сроку наблюдения). Причем наибольшая убыль кислотных групп ($-\text{COOH}$) отмечается к 1-му сроку наблюдения. Это свидетельствует о том, что микроорганизмы рода *Clostridium* прежде всего используют боковые цепочки и функциональные группы гумусовых молекул.

Процессы декарбоксилирования, по-видимому, осуществляются частично за счет алифатических кислот, входящих в состав функционально замещенных неароматических мостиков, при одновременной дегидратации и образовании циклических кетонов, а также за счет ди- и монокарбоновых кислот.

Наблюдаемые нами интенсивные процессы дегидратации и декарбоксилирования согласуются с имеющимися в литературе данными о значительном количестве окси- и карбоксигрупп, выполняющих роль функциональных заместителей [3].

В лабораторных условиях может происходить энзиматическое восстановление ароматических карбоксильных групп до альдегидов и затем алкоholes [9].

Количество карбонильных групп ($-\text{C}=\text{O}$) в разных фракциях гумусовых соединений в процессе их разложения микроорганизмами уменьшается с неодинаковой интенсивностью, причем наиболее значительно их численность снижается в высокомолекулярных фракциях. Карбонильные группы в гумусовых соединениях представлены как свободными алифатическими, так и хинонными группировками. В связи с этим заметное снижение количества карбонильных групп может свидетельствовать об интенсивной минерализации хинонных группировок и о трансформации свободных $-\text{C}=\text{O}$ групп в спиртовые гидроксилы, имеющей место при ферментных реакциях синтеза первичных и вторичных спиртов.

Содержание метоксильных групп ($-\text{OCH}_3$) в исследуемых нами гумусовых соединениях было незначительным. Эти группы являются важнейшими компонентами остаточного лигнина, их количество зависит от степени гумификации. Экспериментальные данные показали, что в процессе разложения микроорганизмами рода *Clostridium* гумусовых фракций прослеживается четкая убыль метоксильных групп. Отсюда следует, что деметоксилирование представляет собой одну из составных реакций сложных минерализационных процессов трансформации гумуса.

Метоксильная группа может отщепляться в виде формальдегида [5], а иногда и в форме метанола в результате гидролиза [7].

Содержание фенольных и спиртовых гидроксильных групп ($-\text{OH}$) в исследуемых фракциях гумусовых соединений, когда гумус является единственным источником азота, на первой стадии их разложения заметно возрастало (кроме III фракции). Относительное увеличение $-\text{OH}$ групп является закономерным циклом подготовительной стадии в механизме расщепления ароматических группировок ядерной части гумусовых молекул. При ферментативном катализе

Трансформация гумусовых веществ (ГВ) при их разложении чистой культурой *Cl. sartagofortum*. Срок инкубирования — 30 дней

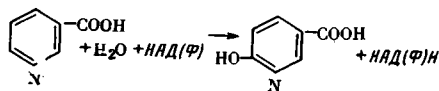
Вариант	Элементный состав, % на сухое беззольное вещество				Н/С	С/Н	О/Н	Функциональный анализ, мг. экв на 1 г препарата			—OCH ₃ , %
	С	Н	N	О				—COOH	—OH	—C=O	
I фракция											
1	42,5	6,3	2,4	48,8	1,8	20,8	0,5	5,5	3,9	3,4	0,31
2	43,7	5,0	1,9	49,1	1,4	26,0	0,6	4,2	3,5	2,0	0,24
3	44,3	4,8	1,8	49,1	1,3	28,4	0,6	4,1	5,4	1,7	0,21
II фракция											
1	44,6	5,5	2,1	47,8	1,5	24,8	0,5	5,1	3,1	3,1	0,67
2	45,7	4,2	1,8	48,1	1,1	29,3	0,7	4,5	2,7	2,8	0,38
3	45,9	4,1	1,7	49,1	1,1	31,8	0,7	4,4	3,5	1,9	0,33
III фракция											
1	46,7	5,2	2,7	45,4	1,3	20,5	0,5	4,2	2,7	2,7	0,54
2	47,5	4,4	2,2	45,7	1,1	24,7	0,7	3,7	2,3	2,4	0,29
3	47,8	4,2	2,1	45,8	1,1	26,5	0,7	3,6	3,0	1,6	0,44
IV фракция											
1	57,2	4,9	3,8	34,1	1,0	17,7	0,2	3,2	3,5	2,9	0,89
2	57,9	4,1	3,3	35,1	0,8	20,1	0,5	2,6	2,2	2,6	0,59
3	58,1	3,9	3,2	34,8	0,8	21,0	0,5	2,5	4,2	1,8	0,63
V фракция											
1	62,6	3,7	3,1	30,5	0,7	23,7	0,5	1,7	2,9	2,1	1,23
2	63,0	2,9	2,8	31,0	0,6	26,3	0,7	1,4	2,3	1,7	0,83
3	63,1	2,9	2,7	31,0	0,6	27,6	0,7	1,3	3,1	1,4	1,00

Примечание. 1 — контроль; 2 — ГВ — источник углерода; 3 — ГВ — источник азота.

кольцевые структуры, содержащие гидроксильные группы в ортоположении, достаточно легко акцентируют кислород с образованием циклической перекиси, в результате происходят внутримолекулярная перегруппировка, ослабление химических связей и их разрыв, что свойственно индивидуальным ароматическим соединениям негумусовой природы [8].

В анаэробных условиях связанный кислород не включается в молекулу ароматических соединений, оксигеназы не функционируют, а гидроксирование субстратов осуществляется за счет кислорода воды. Катализирует эту реакцию определенная группа ферментов, акцептором электронов при этом является НАД (Ф), а источником кислорода — вода.

Реакция идет по типу [6]



Гидролитическому расщеплению подвергаются различные химические связи в гумусовых молекулах. Чаще всего встречаются реакции гидролиза амидной и эфирной связей, которые имеют наибольшее значение. Гидролитические процессы приводят к отщеплению и деструкции алифатических боко-

вых цепей, а также к относительному увеличению доли ароматического ядра.

При гидроксировании нарушается ароматичность молекулы, обуславливающая устойчивость вещества к реакциям окисления. Ароматическое кольцо становится чрезвычайно легко атакуемым микроорганизмами.

В том случае, когда фракции гумусовых веществ являлись единственным источником азота, содержание гидроксильных групп (—ОН) в составе гумусовых молекул уменьшалось (табл. 2 и 3), что по времени совпадало с началом их глубокой деструкции, затрагивающей ядерные фрагменты. К этому периоду заметно снижались молекулярные массы исследуемых фракций и их оптическая плотность.

Многие анаэробные микроорганизмы рода *Clostridium* развиваясь на средах, в которых содержатся гидролизаты белков или смесь аминокислот, получают большую часть энергии в результате сопряженного окисления и восстановления двух соответствующих аминокислот или аминокислот и безазотистых соединений. Такое сопряженное расщепление аминокислот носит название реакции Стикланда [1]. Таким образом, для окислительно-восстановительной реакции нужны два органических соединения, что позволяет получать энергию, необходимую для жизнедеятельности. Для восстановительной реакции требуется дополнительный донор элект-

ронов. Им служат тиосульфат, ацетат или дрожжевой экстракт [11].

Длительное изучение минерализации гумусовых веществ в лабораторных условиях затруднено из-за неизбежного затухания этого процесса при образовании токсических для микрофлоры продуктов и уменьшения коэффициента использования энергии с возрастом культуры.

Несомненно, что в природе разложение гумуса происходит вследствие жизнедеятельности целого комплекса микроорганизмов и этот процесс идет значительно интенсивнее, чем в лабораторных опытах с чистыми культурами. Гумусовые вещества разлагаются в результате совместного действия многих микроорганизмов, осуществляющих последовательные этапы деградации гумуса. Поэтому изучение метаболических путей разложения гумусовых соединений приобретает особое значение.

Выводы

1. Выделенные с помощью метода гель-фильтрации фракции гумусовых соединений значительно различаются по элементному и функциональному составу: первые три фракции можно отнести к фульвокислотам, а IV и V — к гуминовым кислотам.

2. Микроорганизмы рода *Clostridium* принимают активное участие в разложении всех выделенных фракций гумусовых соединений, причем интенсивность разложения последних различная.

3. В процессе разложения гумусовых соединений наиболее сильно изменяется содержание азота в составе гумусовых фракций. Это говорит о том, что азот в первую очередь используется микроорганизмами как источник питания.

4. Исследуемые фракции наиболее сильно разлагаются в первые 30 дней, затем интенсивность разложения снижается.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баркер Х. — Метаболизм бактерий. М.: ИЛ, 1963. — 2. Дэггли С., Никольсон Д. Метаболические пути. М.: Мир, 1973. — 3. Климова В. А. Основные микрометоды анализа органических соединений. М.: Химия, 1975. — 4. Орлов Д. С. Гумусовые кислоты почв. М.: Изд-во МГУ, 1974. — 5. Черонис Н. Д., Матис Т. С. Микро- и полумикрометоды органического функционального анализа. М.: Химия, 1973. — 6. Практикум по почвоведению/Под ред. И. С. Кауричева. М.: Колос, 1980. —

7. Broadbent D. A., Cartwright N. J. — *Microbios*, 1972, vol. 4, N 13, p. 7—12. — 8. Hirschberg R., Ensign J. C. — *J. Bacteriol.*, 1971, vol. 108, N 2, p. 757—759. — 9. Lee J. — L. F., Sparnins V. L., Dagle S. — *Appl. Environ. Microbiol.*, 1978, vol. 35, N 4, p. 817—819. — 10. Guyer M., Hegeman G. — *J. Bacteriol.*, 1969, vol. 99, N 3, p. 906—907. — 11. *Soil Components. vol. 1. Organic components.* Heidelberg. New York, 1975, p. 315.

Статья поступила 5 января 1984 г.

SUMMARY

Active participation of *Clostridium* microorganisms is shown in decomposition of 5 extracted fractions of humic substances of soddy podzolic soil. Changes in composition and content of humic acids fraction due to microbiological transformation occur according to oxidation-hydrolyzation type, resulting in smaller peripheral part of macromolecules, higher carbon content, oxidation and aromaticity of humic acids.