

ДЕЙСТВИЕ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ НА РОСТ БАКТЕРИЙ*

© 2010 г. В. В. Тихонов¹, А. В. Якушев¹, Ю. А. Завгородняя¹, Б. А. Бызов¹, В. В. Демин²¹Факультет почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы
e-mail: vvt1985@gmail.com²Институт экологического почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы
e-mail: vvd@ps.msu.ru

Поступила в редакцию 22.04.2009 г.

Исследовали влияние гуминовых кислот разного происхождения на рост широкого круга культур бактерий из разных таксонов, выделенных из контрастных по условиям местообитаний: почвы и пищеварительных трактов дождевых червей *Aporrectodea caliginosa*. Более половины почвенных и кишечных изолятов из 170 протестированных штаммов росли на гуминовой кислоте из бурого угля как на единственном источнике углерода. Бактерии, выделенные из кишечника червей, росли с большей максимальной удельной скоростью на гуминовой кислоте, чем почвенные. Использование кишечными бактериями гуминовых кислот подтверждает возможность симбиотического пищеварения у дождевых червей с участием бактериальных симбионтов. Гуминовая кислота в концентрации 0.1 г/л стимулировала рост 66 из 161 штамма как почвенных, так и кишечных бактерий, на среде Чапека с глюкозой (1 г/л), вероятно, выступая в качестве регуляторов клеточного метаболизма. Бактерии из кишечника росли с большей максимальной удельной скоростью на среде с добавкой гуминовой кислоты, чем почвенные изоляты. Наиболее активный рост среди кишечных изолятов наблюдался у *Paenibacillus* sp., *Pseudomonas putida*, *Delftia acidovorans*, *Microbacterium terregens*, *Aeromonas* sp., а среди почвенных — у представителей рода *Pseudomonas*. На примере бактерии рода *Pseudomonas* показано, что реакция бактерий на действие гуминовых кислот проявлялась на штаммовом уровне. Гуминовый препарат “Флексом” стимулировал рост углеводород-окисляющей бактерии *Acinetobacter* sp. Этот эффект может быть использован для создания нового препарата с повышенной активностью бактерий-деструкторов нефти и нефтепродуктов.

ВВЕДЕНИЕ

Гуминовые вещества (ГВ) являются необходимым звеном в эволюции биосферы, важнейшим фактором устойчивости жизненных процессов. Они выполняют аккумулятивную, транспортную, регуляторную, протекторную и физиологическую функции [11]. Взаимодействуя с живыми организмами, ГВ в малых количествах влияют на рост, подавляя [22, 28, 29, 31] или стимулируя [2, 27, 34] его. Они способны защищать живые клетки от токсического воздействия природных и антропогенных соединений [2, 24, 33]. ГВ не только регулируют процессы питания и развития растений [15, 20, 21], но и сами могут служить источником питания для микроорганизмов [10, 17] и трансформируются естественными микробными сообществами [25, 26].

В большинстве своем физиологические эффекты ГВ продемонстрированы на эукариотических организмах, в основном — на растениях. Реакции прокариотических организмов (бактерий) на присутствие ГВ в среде исследованы значительно слабее [17, 26]. Поэтому в настоящем ис-

следовании мы сосредоточились на получении новой информации об особенностях роста бактерий на ГВ, а также на физиологическом действии малых концентраций ГВ на рост бактерий.

Цель работы — охарактеризовать особенности роста бактерий на гуминовых кислотах (ГК) как единственном источнике углерода и энергии, а также биологическую активность гуминовых кислот на примере широкого круга бактерий разных таксонов, выделенных из почвы и пищеварительных трактов дождевых червей.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали дерново-подзолистую почву (Лесная опытная дача МСХА им. К. А. Тимирязева, из-под смешанного леса) и чернозем выщелоченный (Каменная степь, 200-летняя залежь). Образцы отобраны с глубины 0–20 см.

В экспериментах использовали следующие гуминовые кислоты: 1) гуминовая кислота из бурого угля (ГКу), выделенная из коммерческого образца гумата (ГУ 211-06-18-94, сырье — сильно выветрелый бурый уголь Канско-Ачинского угольного бассейна) и очищенная от органико-минеральных примесей [12]; 2) гуминовая кислота из выщелоченного чернозема (ГКч);

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 08-04-00786-а) и гранта Президента РФ поддержки ведущих научных школ (НШ-2227.2008.4.).

3) гумат калия, выделенный из низинного торфа (коммерческий препарат фирмы “Флексом”). Перед экспериментами все гуминовые препараты стерилизовались фильтрацией через мембранный фильтр 0.22 мкм (Millipore).

При изучении действия ГКу на рост микроорганизмов были использованы чистые культуры бактерий, любезно предоставленные Т.Ю. Нечитайло (Department of Environmental Microbiology, HZI – Helmholtz Centre for Infection Research, 38124 Braunschweig, Germany). Они были ранее выделены из дерново-подзолистой почвы и очищенных от пищевого субстрата пищеварительных трактов дождевого червя *Aporrectodea caliginosa* (Подмосковье). Идентификацию бактерий производили с помощью ПЦР-амплификации генов 16S рРНК с последующим секвенированием ампликонов и анализом данных [19]. Всего исследовали 170 штаммов бактерий (81 штамм из почвы и 89 – из пищеварительных трактов червей).

При изучении действия ГКч на рост микроорганизмов были использованы штаммы бактерий, выделенные из выщелоченного чернозема. Бактерии выделялись на средах для олиго- и копитрофных микроорганизмов. Среда для копитрофов: 2.5 мг/мл глюкозы; 0.2 мг/мл гидролизата казеина, 0.5 мг/мл $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.5 мг/мл KH_2PO_4 ; 0.06 мг/мл $Ca(NO_3)_2$; циклогексимид 0.1 мг/мл (для подавления роста грибов). В среде для олиготрофов концентрации глюкозы и гидролизата казеина были в 100 раз меньшими, чем в среде для копитрофов [30]. Выделено по 3 штамма из каждой группы (штаммы не идентифицированы). Кроме этого, действие ГКч тестировали на широком круге грамотрицательных бактерий, выделенных из дерново-подзолистой почвы, а также на грамположительных бактериях *Bacillus cereus* и *Bacillus lentus-firmus*, любезно предоставленных Т.Г. Добровольской (кафедра биологии почв, факультет почвоведения, МГУ им. М.В. Ломоносова).

Проверяли действие коммерческого препарата гумата калия фирмы “Флексом” на рост углеводородоксилирующей грамотрицательной бактерии *Acinetobacter* sp., выделенной из коммерческого препарата “Дестройл”.

Рост микроорганизмов на средах с ГКу в качестве единственного источника углерода. Раствор стерилизованной (121°C, 1.1 атм., 20 мин) минеральной основы среды Чапека [26] двойной концентрации без глюкозы объемом 80 мкл вносили в ячейки 96-луночного плоскодонного иммунологического планшета. Затем в каждую ячейку добавляли по 80 мкл стерильного раствора ГКу (0.2 мг/мл) в 0.1 М Na-фосфатном буфере (рН 7.0). В лунки планшета вносили по 2 мкл инокулята бактерий. Бактерии для инокулята выращивали в жидкой среде Чапека в течение 18–20 ч. Контролями служили:

1) 80 мкл среды Чапека без глюкозы двойной концентрации плюс 80 мкл 0.1 М Na-фосфатного буфера; 2) 80 мкл среды Чапека без глюкозы двойной концентрации плюс 80 мкл раствора ГКу (0.2 мг/мл), растворенной в 0.1 М Na-фосфатном буфере без инокуляции бактериями.

Действие добавок ГКу на рост бактерий на среде Чапека. Среда Чапека двойной концентрации с глюкозой (2 мг/мл) автоклавились (110.8°C, 0.5 атм., 30 мин) и разливали в 96-луночный планшет по 80 мкл. Затем в каждую ячейку вносили 80 мкл раствора ГКу (0.2 мг/мл). В ячейки вносили по 2 мкл инокулята бактерий. Контролями служили: 1) 80 мкл среды Чапека двойной концентрации с глюкозой (2 мг/мл) плюс 80 мкл 0.1 М Na-фосфатного буфера; 2) 80 мкл среды Чапека двойной концентрации с глюкозой плюс 80 мкл ГКу (0.2 мг/мл) без инокуляции бактерий.

Планшеты закрывали крышкой и герметизировали пленкой Parafilm, чтобы избежать испарения. Планшеты культивировали при 25°C в течение 320 ч. Измерение проводили на микропланшетном спектрофотометре (Tecan Sunrise), шаг измерения 2–10 ч, перед измерением планшеты встряхивали в течение 3 мин при 300 об/мин на микропланшетном шейкере (Heidolph, Titramax). Динамику роста микроорганизмов регистрировали по изменению оптической плотности при 492 или 620 нм с коррекцией оптической плотности по контролю 2).

Обработка результатов. Измерения производили для каждой культуры в 2-кратной повторности для исследования роста на ГКу и в 3-кратной – для роста на ГКч и коммерческом препарате гумат калия. Статистическую обработку проводили в программе Statistica 7.

Для описания роста микроорганизмов (оптической плотности) используются параметры логистического уравнения вида:

$$D = \frac{D_{\max}}{1 + \frac{D_{\max} - D_0}{D_0} e^{-R_{\max} t}},$$

где t – время, час, D – оптическая плотность в данный момент времени, D_0 – оптическая плотность в начальный момент, $R_{\max}$ – максимальная удельная скорость роста, час⁻¹, $D_{\max}$ – максимальная оптическая плотность в ячейке. В ряде случаев рассчитывали среднюю оптическую плотность за весь период измерения. Мы не проводили прямого подсчета клеток бактерий, но принимали, что зависимость оптической плотности суспензии клеток от их концентрации прямая [14].

Молекулярно-массовые распределение гумусовых веществ. После 120 ч выращивания бактерий отбирали жидкую среду с ГКч (0.1 и 1 мг/мл), фильтровали

Таблица 1. Бактерии, способные (+) и неспособные (–) к росту на гуминовой кислоте как единственном источнике углерода. Приведено количество протестированных штаммов

Почвенные бактерии	+	–	Бактерии, ассоциированные с пищеварительными трактами червей	+	–
<i>Aminobacter aminovorans</i>	3	0	<i>Acinetobacter</i> spp.	4	0
<i>Agromyces</i> spp.	2	0	<i>Aeromonas</i> spp.	12	4
<i>Arthrobacter</i> spp.	2	2	<i>Bacillus</i> spp.	2	0
<i>Bacillus</i> spp.	16	8	<i>Buttiauxella</i> spp.	3	2
<i>Kocuria palustris</i>	3	5	<i>Chryseobacterium</i> spp.	2	0
<i>Nocardioides</i> spp.	2	3	<i>Delftia acidovorans</i>	1	4
<i>Pseudomonas</i> spp.	9	1	<i>Microbacterium</i> sp.	3	2
<i>Rhodococcus</i> spp.	1	0	<i>Ochrobactrum grignonense</i>	1	0
<i>Sphingopyxis</i> spp.	1	1	<i>Paenibacillus</i> sp.	1	0
<i>Streptomyces</i> spp.	1	3	<i>Pseudomonas</i> spp.	9	3
<i>Microbacterium</i> sp.	0	1	<i>Shewanella</i> sp.	0	1
<i>Oxalobacter</i> sp.	0	1	<i>Rhodococcus</i> sp.	0	1
Неопределенные штаммы	16	8	Неопределенные штаммы	21	5

(0.22 мкм) и анализировали молекулярно-массовые распределения методом эксклюзионной хроматографии высокого давления на жидкостном хроматографе Agilent 1100 с диодно-матричным детектором (AGILENT TECHNOLOGIES) и системой обработки данных ChemStation, LCChem. Параметры хроматографического процесса: колонка TSK–2000SW 7.5 × 60 (TOSOH BIOSCIENCE), объем пробы 100 мкл, скорость потока элюента 0.75 мл/мин, элюент 0.1 М Na-фосфатный буфер (рН 7.0) + 1 г/л додецилсульфата натрия, длина волны сканирования 280 нм. Калибровку колонки проводили с использованием смеси глобулярных белков с молекулярными массами 12500–65000 Да. Молекулярные массы ГКч рассчитывали по формуле Детермана [8].

Средневесовые молекулярные массы рассчитывались стандартным методом [16]. Расчет производился в программе Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Рост бактерий из почвы и пищеварительных трактов червей *Aporrectodea caliginosa* на среде с ГКу в качестве единственного источника углерода. Из 81 штамма, выделенного из почвы, дали рост 56 (63%), а из 89 штаммов из кишечника – 59 (73%). Остальные бактерии на ГКу не росли (табл.1). Кишечные изоляты бактерий на ГКу росли с большей скоростью, чем почвенные (рис. 1). Так, коэффициент $r_{\max}$, характеризующий максимальную удельную скорость роста в экспоненциальной фазе роста, для кишечных бактерий равен 0.033 ± 0.003 , а для почвенных 0.021 ± 0.002 .

Рост бактерий из почвы и пищеварительных трактов червей *A. caliginosa* на среде Чапека с глюкозой с добавкой ГКу. Обнаружен стимулирующий эффект ГКу для 30 из 82 кишечных (37%) и для 36 из 79 (46%) почвенных штаммов (табл. 2). На рис. 2 показана динамика изменения средней оптической плотности для всех протестированных штаммов бактерий. На среде с ГКу максимальная оптическая плотность $D_{\max}$ суспензии бактерий была в 2 раза (рис. 2), а максимальная удельная скорость роста $r_{\max}$ в 1.5 раза (табл. 3)

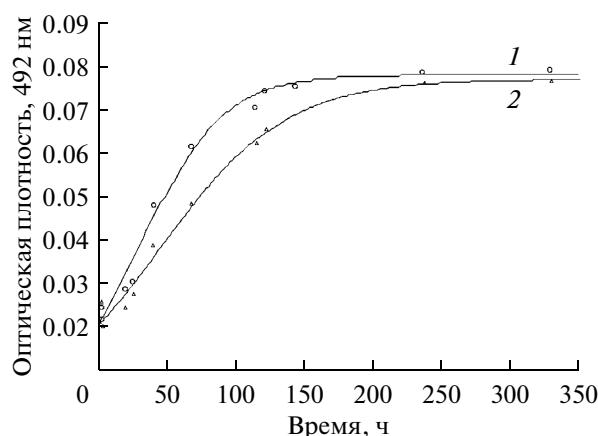


Рис. 1. Рост бактерий, выделенных из очищенных пищеварительных трактов дождевых червей *Aporrectodea caliginosa* (81 штамм, 1) и из дерново-подзолистой почвы (89 штамм, 2), на гуминовой кислоте из бурого угля (ГКу) как на единственном источнике углерода (0.1 мг/мл). Здесь и на рис. 2, 3 даны средние значения оптической плотности при 492 нм для всех протестированных бактерий ($n = 2$).

Таблица 2. Рост бактерий, выделенных из почвы и пищеварительных трактов червей *Aporrectodea caliginosa* на среде Чапека с добавкой гуминовой кислоты (ГКу, 0.1 мг/мл). Приведено количество штаммов — представителей отдельных родов, испытывающих стимулирующее действие (+) или не испытывающих действия (0)

Почвенные бактерии	+	0	Бактерии, ассоциированные с пищеварительными трактами червей	+	0
<i>Agromyces</i> spp.	1	1	<i>Acinetobacter</i> spp.	0	4
<i>Aminobacter vorans</i>	3	0	<i>Aeromonas</i> spp.	6	10
<i>Arthrobacter</i> spp.	0	3	<i>Bacillus</i> spp.	0	2
<i>Bacillus</i> spp.	8	8	<i>Buttiauxella</i> spp.	1	4
<i>Kocuria palustris</i>	4	1	<i>Chryseobacterium</i> spp.	2	0
<i>Microbacterium</i> sp.	0	1	<i>Delftia acidovorans</i>	3	1
<i>Nocardioides</i> spp.	1	4	<i>Microbacterium</i> spp.	1	3
<i>Oxalobacter</i> sp.	1	0	<i>Ochrobactrum grignonense</i>	0	1
<i>Pseudomonas</i> spp.	5	5	<i>Paenibacillus</i> sp.	0	1
<i>Rhodococcus</i> sp.	0	1	<i>Pseudomonas</i> spp.	9	3
<i>Sphingopyxis</i> spp.	1	1	<i>Rhodococcus</i> sp.	0	1
<i>Streptomyces</i> spp.	2	2	<i>Shewanella</i> sp.	0	1
Не идентифицированные	10	16	<i>Sphingobacterium</i> spp.	1	1
			<i>Streptomyces</i> sp.	0	1
			Не идентифицированные	7	19

больше как для почвенных, так и для кишечных штаммов по сравнению с контролем. Бактерии из кишечника росли с большей максимальной удельной скоростью при росте на среде с добавкой гуминовой кислоты, чем почвенные изоляты. Не выявлено штаммов бактерий, рост которых достоверно подавлялся ГКу. Наиболее активный рост среди кишечных изолятов наблюдался у *Paenibacillus* sp., *Pseudomonas putida*, *Delftia acidovorans*, *Microbacterium terregens*, *Aeromonas* sp., а среди почвенных — у представителей рода *Pseudomonas*.

Таким образом, гуминовая кислота, добавленная в питательную среду Чапека, одинаково уве-

личивает скорость роста кишечных и почвенных бактерий, но бактерии, ассоциированные с пищеварительным трактом червей, растут с большей скоростью, чем почвенные.

Таксономические различия в реакции бактерий на действие гуминовой кислоты. Реакция бактерий на действие гуминовых кислот существенно различалась внутри одного таксона. Так, рост некоторых штаммов бактерии рода *Pseudomonas* на ГКу (0.1 мг/мл) в качестве добавки к среде Чапека стимулировался (8 штаммов), а других — нет (14 штаммов) (рис. 3). Отметим, что псевдомонады, выделенные из пищеварительных трактов червей *A. caliginosa* (рис. 3А), достигали большего обилия, оцениваемого по оптической плотности, чем псевдомонады, выделенные из почвы, в которой обитают эти черви (рис. 3Б).

Оптимальные концентрации гуминовой кислоты, стимулирующие рост бактерий. Действие гуминовой кислоты из чернозема (ГКч) тестировали по отношению к бактериям, выделенным из дерново-подзолистой почвы и чернозема. Для копитотрофных бактерий регистрировались максимумы параметров $r_{\max}$ и $D_{\max}$ при росте на среде Чапека с глюкозой и с ГКч в диапазоне концентраций 0.1–1 мг/мл. При увеличении концентрации ГКч в среде более 1 мг/мл максимальная удельная скорость роста и максимальная оптическая плотность культур уменьшалась (рис. 4). Для олиготрофных бактерий отмечено возрастание максимальной оптической плотно-

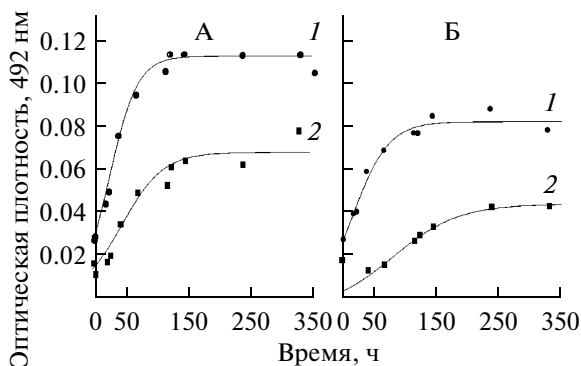


Рис. 2. Рост бактерий, выделенных из пищеварительных трактов червей *Aporrectodea caliginosa* (А) и из почвы (Б), на питательной среде с добавкой 0.1 мг/мл ГКу (1) и без ГКу (2).

сти ($D_{\max}$) с увеличением концентрации ГКч до 1 мг/мл, но максимальная удельная скорость роста ($r_{\max}$) при этом была меньше, чем на контроле без ГКч (рис. 5).

Для пяти штаммов грамотрицательных бактерий, а также двух штаммов бацилл оптимальные концентрации ГКч, при которых достигалась максимальная оптическая плотность, лежали в пределах 0.05–1 мг/мл и более (рис. 6А, Г, Д). Олиготрофные и копиотрофные бактерии имели оптимум роста при концентрации ГКч 1 мг/мл. Копиотрофы более чувствительны к изменению концентрации ГКч, чем олиготрофные бактерии, что выражается в крутизне кривой (рис. 6В).

Изменение молекулярной массы гуминовой кислоты под действием бактерий при их росте на среде Чапека. Обнаружили снижение высоты пиков и общей площади под кривыми элюирования, что свидетельствует об уменьшении концентрации ГКч после инкубирования с бактериями. При росте копиотрофных бактерий концентрация ГКч уменьшалась менее интенсивно, чем при росте олиготрофов как при 0.1, так и при 1 мг/мл ГКч в среде Чапека (рис. 7). Изменений средневзвешенных молекулярных масс ГКч отмечено не было (ошибка метода ± 2000 Да) (табл. 4).

Оценка воздействия препарата “Флексом” на рост углеводородокисляющей бактерии *Acinetobacter* sp. из препарата “Дестройл”. Обнаружено стимулирующее действие препарата на рост *Acinetobacter* sp. при концентрации гумата калия в среде до 0.2 мг/мл. Максимальная удельная скорость роста ($r_{\max}$) увеличилась в 1.4–2 раза в диапазоне концентраций гумата калия 0.05–0.2 мг/мл. Подавляющих рост концентраций гумата калия вплоть до концентрации 0.5 мг/мл не выявлено (рис. 8).

ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что многие бактерии способны расти на гуминовой кислоте из бурого угля как на единственном источнике углерода (в среде присутствовал азот в минеральной форме): 115 из 170 протестированных штаммов разных родов — более половины кишечных и почвенных изолятов (табл. 1; рис. 1). И кишечные, и почвенные изоляты были способны к росту на гуминовой кислоте. Если для почвенных бактерий это было показано ранее [10, 17, 25, 26], то рост бактерий, тесно ассоциированных с пищеварительным трактом дождевых червей, на гуминовой кислоте показан впервые. Этот факт важен с точки зрения питания дождевых червей. Существует гипотеза, что черви способны питаться труднодоступным органическим веществом за счет симбионтного пищеварения [32]. Мы предполагаем, что обитающие в кишечнике

Таблица 3. Величина максимальной удельной скорости роста ($r_{\max}$) при росте почвенных и кишечных бактерий на питательной среде с добавкой гуминовой кислоты (ГКу, 0.1 мг/мл) и без ГКу

Варианты	Максимальная удельная скорость роста, $r_{\max}$	
	кишечные бактерии	почвенные бактерии
С ГКу	0.045 ± 0.003	0.035 ± 0.005
Без ГКу	0.030 ± 0.006	0.019 ± 0.004

бактерии, и те почвенные бактерии, которые выживают и размножаются в кишечнике [18], способны частично утилизировать молекулу гуминовой кислоты и, в первую очередь, периферические фрагменты, представленные олигосахаридами и пептидами [11], тем самым поставляя питательные вещества организму-хозяину.

Обнаружена стимуляция роста бактерий на среде гуминовой кислоты. Кроме непосредственного субстрата для роста гуминовая кислота может выступать как регулятор роста микроорганизмов. Стимуляция роста наблюдается в экспериментах с выращиванием бактерий на среде Чапека с глюкозой в концентрации 1 мг/мл, в 10 раз превышающей концентрацию добавляемой гуминовой кислоты (0.1 мг/мл). Из 161 протестированного штамма рост 66 стимулировался добавкой в среду ГКу — это около половины кишечных и почвенных изолятов. Остальные бактерии не реагировали на добавление ГКу в среду (табл. 2). Мы можем утверждать, что имеем дело именно со стимулирующим действием ГКу, поскольку максимально

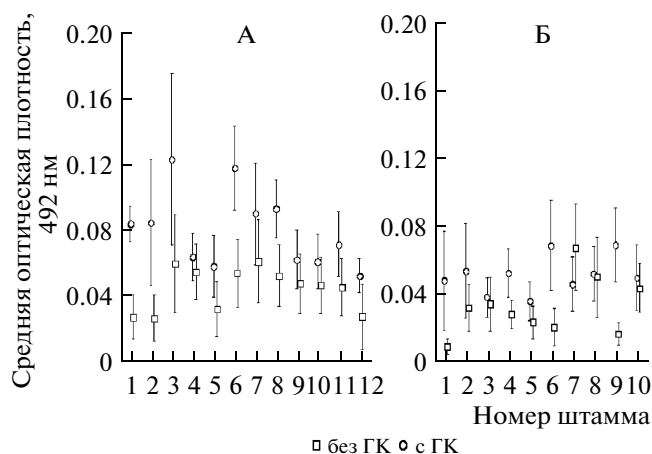


Рис. 3. Рост разных штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из пищеварительных трактов червей *Aporrectodea caliginosa* (А: 1–12 *Pseudomonas* spp.) и из почвы (Б: 5–9 — *Pseudomonas putida*; 3, 10 — *Pseudomonas* spp.; 2, 4 — *Pseudomonas reactans*; 1 — *Pseudomonas migulae*) на среде с добавкой ГКу (0.1 мг/мл). Дана средняя оптическая плотность при 492 нм за 320 ч измерения.

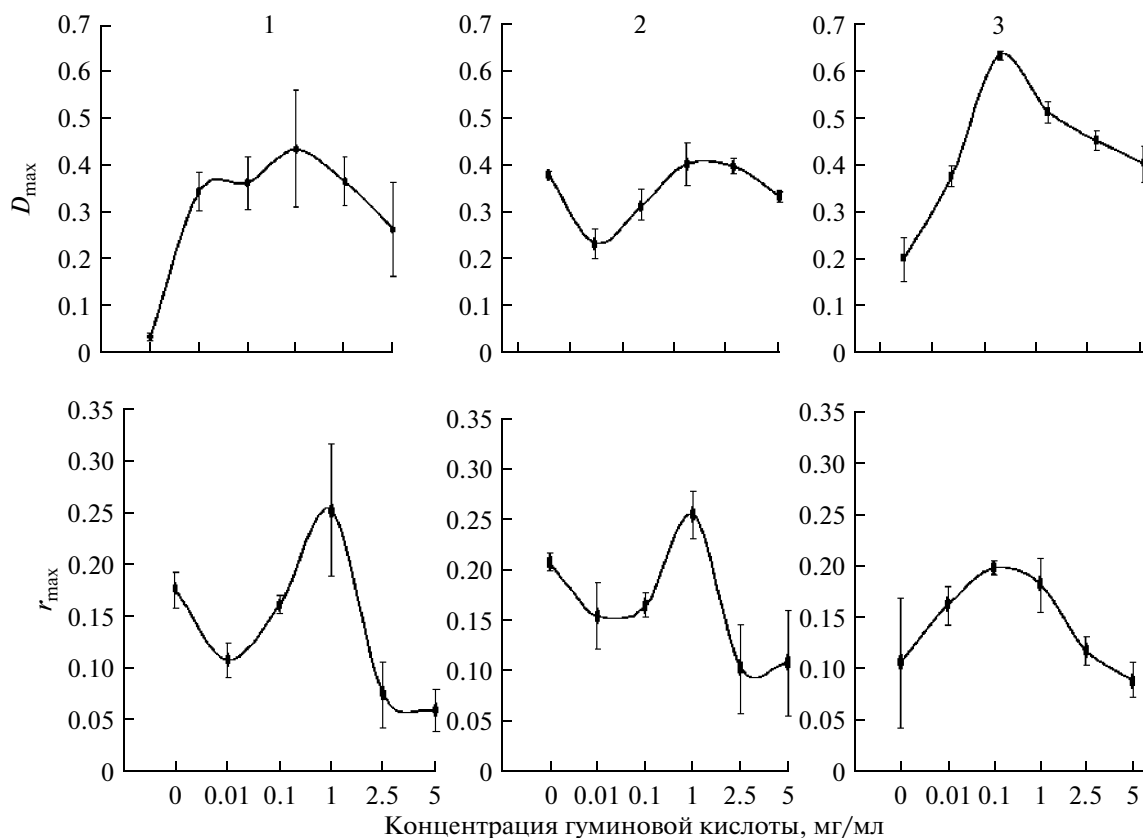


Рис. 4. Рост копиотрофных бактерий из разных таксонов (№ 1–3) на среде Чапека с гуминовой кислотой из чернозема (ГКч) в разных концентрациях. Дана максимальная оптическая плотность ($D_{\max}$) и максимальная удельная скорость роста ($r_{\max}$), 620 нм после 120 ч инкубации, $n = 3$.

достигаемая оптическая плотность на среде Чапека с ГКу в 1.5–2 раза превышает таковую при росте только на ГКу (рис. 1, 2). Можно предположить, что бактерии предпочитают усваивать глюкозу среды Чапека в первую очередь, а наличие ГКу способствует их росту.

Таблица 4. Молекулярные массы ГКч (Да) после инкубации с копиотрофными и олиготрофными бактериями через 120 ч

Штаммы бактерий	Концентрация гуминовой кислоты, мг/мл	
	0.1	1.0
Копиотрофные бактерии		
Штамм 1	29900	33000
Штамм 2	32000	33800
Штамм 3	32000	33000
Олиготрофные бактерии		
Штамм 1	27800	32000
Штамм 2	27000	32100
Штамм 3	25700	32300
Контроль (без бактерий)	29700	33500

Интересно, что бактерии, ассоциированные с пищеварительным трактом червей *A. caliginosa*, обладают большей максимальной удельной скоростью роста на гуминовой кислоте, чем почвенные изоляты (рис. 2, 3). При этом отклик на присутствие гуминовой кислоты в среде очень разнообразен, и различия проявляются даже на штаммовом уровне, что показано на примере бактерий рода *Pseudomonas* (рис. 3). Нами не обнаружено какой-либо связи реакции бактерий на действие гуминовых кислот с их таксономическим положением бактерий. Показанные особенности роста бактерий, выделенных из таких разных по условиям местообитаний, как почва и кишечник, на гуминовых кислотах на функциональном уровне доказывает наличие особой группировки бактерий в пищеварительном тракте дождевых червей. Ранее было показано, что бактерии, ассоциированные с пищеварительным трактом дождевых червей, отличаются по таксономическому составу от почвенных бактерий [4, 18].

В исследуемом диапазоне концентраций гуминовых кислот не обнаружено подавления роста бактерий. Стимуляция роста наблюдается в широком диапазоне концентраций ГК: 0.01–5 мг/мл в зависимости от штамма бакте-

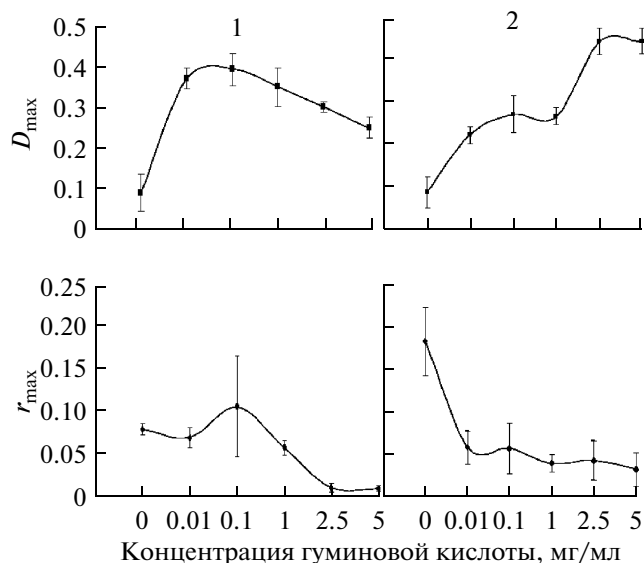


Рис. 5. Рост олиготрофных бактерий из разных таксонов (№ 1, 2) на среде Чапека с ГКч в разных концентрациях. Дана максимальная оптическая плотность ($D_{\max}$) и максимальная удельная скорость роста ($r_{\max}$), 620 нм после 120 ч инкубации, $n = 3$.

рии (рис. 6). Несмотря на то, что у каждой бактерии был свой оптимум, для всех он лежал в пределах 0.01–0.1 мг/мл. В таких концентрациях гуминовые кислоты обнаруживаются в природных объектах, например в почвенных растворах [7, 13].

Изменение молекулярной массы гуминовой кислоты при росте на ней бактерий. При росте олиготрофных бактерий на полноценной питательной жидкой среде с гуминовой кислотой из чернозема концентрация ГКч уменьшалась сильнее, чем при росте копиотрофных бактерий. Изменение молекулярной массы в пределах ошибки метода не произошло. Уменьшение концентрации ГКч можно объяснить сорбцией на клетках или изменением оптических характеристик под действием бактерий, а также потреблением ГКч клетками. За цветность гуминовых кислот ответственны сопряженные двойные связи $C=C$, в том числе и не входящие в ароматические кольца, эти связи могут легко окисляться неспецифическими ферментами микроорганизмов [35].

Таким образом, способность роста на гуминовых кислотах широко распространена среди бактерий. Впервые показано, что бактерии, ассоциированные с пищеварительным трактом дождевых червей *Aporrectodea caliginosa*, способны к росту на гуминовых кислотах, что дополняет доказательную базу участия симбиотического пищеварения в жизни почвенных животных. Можно предположить, что гуминовые кислоты могут выступать в качестве альтернативного источника питания для дождевых червей, наряду с почвенными простей-

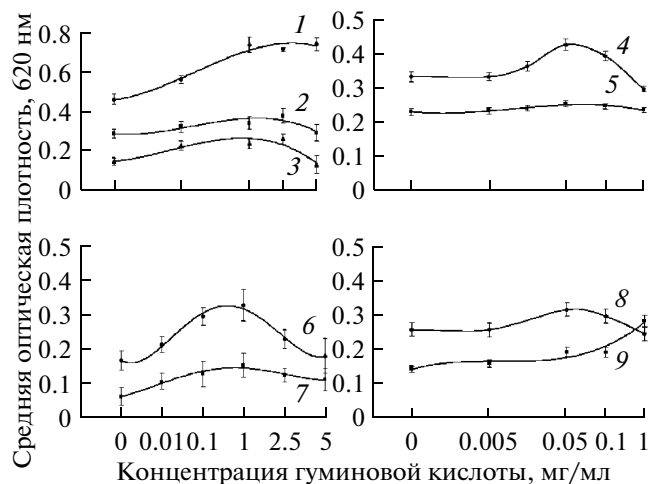


Рис. 6. Рост бактерий в зависимости от концентрации гуминовой кислоты из чернозема на среде Чапека: 1–5 – граммотрицательные штаммы, выделенные из дерново-подзолистого почва; 6 (копио-) и 7 (олиготрофные) бактерии, выделенные из выщелоченного чернозема; 8 – *B. lentus-firmus*; 9 – *B. cereus*, 620 нм, $n = 3$.

шими, грибами и бактериями [23], хотя для доказательства этого требуются расчеты материального баланса поступающих из этих источников элементов питания. Таких данных пока в мире нет.

Действие гумата калия (коммерческий препарат “Флексом”) на рост углеводородокисляющей бактерии *Acinetobacter* sp. из препарата “Дестройл”. Препарат “Дестройл” применяют для очистки почв от нефти и нефтепродуктов. Данные о стимулирующем действии гуминовых кислот на рост бактерий в почве важ-

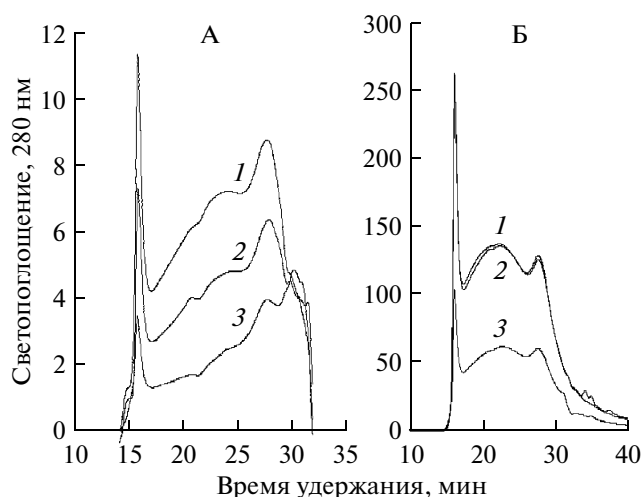


Рис. 7. Уменьшение интенсивности светопоглощения ГКч (контроль—1) после инкубации с копиотрофными (2) и олиготрофными бактериями (3) после 120 ч. Концентрация ГКч: А – 0.1 мг/мл; Б – 1 мг/мл.

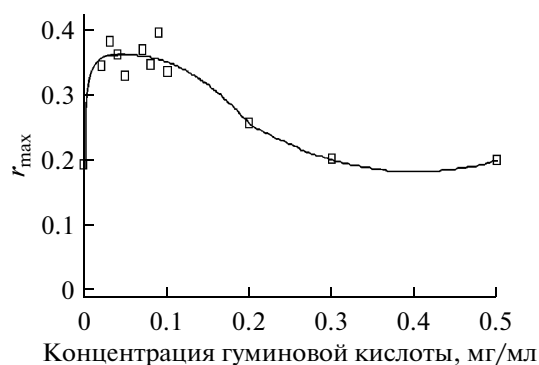


Рис. 8. Влияние различных концентраций гумата калия коммерческого препарата “Флексом” на максимальную удельную скорость роста ($r_{\max}$) углеводородокисляющей бактерии *Acinetobacter* sp., выделенной из препарата “Дестройл”, 620 нм.

ны для разработки биологически активных препаратов с новыми свойствами. Гумат калия в составе препарата “Флексом” стимулировал рост *Acinetobacter* sp. в чистой культуре (рис. 8). Данный стимулирующий эффект гумата калия может быть использован для эффективной интродукции полезных бактерии в почву.

Возможные механизмы действия ГВ на клетки. Христева [20] предположила, что физиологические эффекты ГВ обусловлены их влиянием на энергетический метаболизм клетки, заключающийся в активации процессов окислительного и фотосинтетического фосфорилирования и усилении белок синтезирующей системы. Стимулирующее действие физиологически активных ГВ может быть обусловлено активацией процессов синтеза ДНК, РНК и белка, улучшением функционального состояния клеточных органелл и повышением митотической и пролиферативной активности в меристематических тканях [6]. Другие исследователи связывают физиологическую активность ГВ с парамагнитными [9, 21], электроно-донорно-акцепторными [3] или мембранотропными [1, 5] свойствами этих веществ. Наблюдаемые в результате контакта ГВ с живыми организмами биологические эффекты связаны, на наш взгляд, с возникающей у клеток возможностью более эффективного использования генерируемой ими энергии, запасаемой в виде АТФ, которая расходуется на регенерацию компонентов клетки, рост и размножение. Если будут сокращены ее затраты, например, на обновление липидов в клеточных мембранах в результате подавления их перекисного окисления (по некоторым оценкам на это расходуется до 30% энергии), то высвобожденная энергия может быть направлена клеткой на ускорение роста и деления.

Приведенные данные лабораторных модельных экспериментов свидетельствуют о том, что

обладая биологической активностью, ГВ способны регулировать рост микроорганизмов. Однако установление их реальной роли в почве требует дальнейших исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баталкин Г.А., Коганов М.М., Махно Л.Ю. Проницаемость мембран для некоторых веществ гумусовой природы и их вклад в физиологическую активность препарата гуматов натрия // Теория действия физиологически активных веществ. Тр. Днепропетровского с.-х. ин-та. Днепропетровск, 1983. Т. 8. С. 117–121.
2. Бирюков М.В. Биологическое действие гуминовых кислот и его пространственная локализация в почве. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. 2006. 24 с.
3. Бобырь Л.Ф. Влияние физиологически активных гумусовых веществ на фотосинтетические процессы у растений. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Кишинев, 1984. 24 с.
4. Бызов Б.А., Нечитайло Т.Ю., Бумажкин Б.К., Кураков А.В., Голышин П.Н., Звягинцев Д.Г. Культивируемые микроорганизмы из пищеварительного тракта дождевых червей // Микробиология. 2009. Т. 78. № 2. С. 1–10.
5. Вахмистров Д.Б., Зверкова О.А., Дебеч Е.Ю., Мишустина Н.Е. Гуминовые кислоты: связь между поверхностной активностью и стимуляцией роста растений // Докл. АН СССР. 1987. Т. 293. № 5. С. 1277–1280.
6. Горювая А.И., Кулик А.Ф., Огинова И.А. Роль физиологически активных гумусовых препаратов в регуляции процессов клеточного цикла // Регуляция клеточного цикла / Отв. ред. И.Н. Гудков. Киев, 1985. С. 101–109.
7. Демин В.В., Терентьев В.А., Завгородняя Ю.А. Вероятный механизм действия гуминовых веществ на живые клетки // Гуминовые вещества в биосфере: Тр. II Межд. конф. М.: Изд-во Моск. ун-та, 2004. С. 37–41.
8. Детерман Г. Гель-хроматография. М.: Мир, 1970. 252 с.
9. Комиссаров И.Д., Логинов Л.Ф. Химическая природа и молекулярное строение гуминовых кислот. Химия гумусовых кислот: их роль в природе и перспективы использования в народном хозяйстве. Тюмень, 1981. С. 4.
10. Кудрина Е.С. Влияние гуминовой кислоты на некоторые группы почвенных микроорганизмов и ее значение для этих микроорганизмов как источника питательных веществ // Тр. Почв. ин-та им. В.В. Докучаева. М., 1951. Т. 38. С. 185–254.
11. Орлов Д.С. Свойства и функции гуминовых веществ. Гуминовые вещества в биосфере. М.: Наука, 1993. С. 16–27.
12. Орлов Д.С., Гришина Л.А. Практикум по химии гумуса. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1981. 272 с.
13. Перминова И.В. Гуминовые вещества — вызов химикам XXI века // Химия и жизнь. 2008. № 1. С. 50–56.

14. Перт Дж. С. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир, 1978. 331 с.
15. Попов А.И. Гуминовые вещества: свойства, строение, образование. СПб.: Изд-во СПб. ун-та, 2004. 248 с.
16. Рабек Я. Экспериментальные методы в химии полимеров. М.: Мир, 1983. 480 с.
17. Теннер Е.З. Микроорганизмы рода *Nocardia* и разложение гумуса. М.: Наука, 1976. 199 с.
18. Третьякова Е.Б., Добровольская Т.Г., Бызов Б.А., Звягинцев Д.Г. Сообщества бактерий, ассоциированные с почвенными беспозвоночными // Микробиология. 1996. Т. 65. № 1. С. 102–110.
19. Хомяков Н.В., Харин С.А., Нечитайло Т.Ю., Голышин П.Н., Кураков А.В., Бызов Б.А., Звягинцев Д.Г. Реакция микроорганизмов на воздействие пищеварительной жидкости дождевых червей // Микробиология. 2007. № 76. С. 45–54.
20. Христева Л.А. Роль гуминовой кислоты в питании высших растений и гуминовые удобрения // Тр. Почв. ин-та им. В.В. Докучаева. М., 1951. Т. 38. С. 108–184.
21. Чуков С.Н. Структурно-функциональные параметры органического вещества почв в условиях антропогенного воздействия. СПб.: Изд-во СПб. ун-та, 2001. 216 с.
22. Ansorg R., Rochus W. Studies on the antimicrobial effect of natural and synthetic humic acids // *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*. 1978. V. 28 (12) P. 2195–2199.
23. Edwards C.A., Fletcher K.E. Interactions between earthworms and microorganisms in organic matter breakdown // *Agriculture, Ecosystem and Environment*. 1988. V. 24. № 1–3. P. 235–247.
24. Fafa F., Piccolo A. Effects of humic substances on the bioavailability and aerobic biodegradation of polychlorinated biphenyls in a model soil // *Biotechnology and Bioengineering*. 2002. V. 77(2). P. 204–211.
25. Filip Z., Berthelin J. Analytical determination of the microbial utilization and transformation of humic acids extracted from municipal refuse // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2001. V. 371 (5). P. 675–681.
26. Filip Z., Kubat J. Microbial utilization and transformation of humic substances extracted from soils of long-term field experiments // *European J. of Soil Biology*. 2001. V. 37. P. 167–174.
27. Gryndler M., Hřšelová H., Sudová R., Gryndlerová H., Řezáčová V., Merhautová V. Hyphal growth and mycorrhiza formation by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus claroideum* BEG 23 is stimulated by humic substances // *Mycorrhiza*. 2005. V. 15 (7). P. 483–488.
28. Loffredo E., Berloco M., Casulli F., Senesi N. In vitro assessment of the inhibition of humic substances on the growth of two strains of *Fusarium oxysporum* // *Biology and Fertility of Soils*. 2007. V. 43. P. 759–769.
29. Pascual J., Garcia C., Hernandez T., Lerma S., Lynch J. Effectiveness of municipal waste compost and its humic fraction in suppressing *Pythium ultimum* // *Microbial Ecology*. 2002. V. 44 (1). P. 59–68.
30. Semenov A.M. Physiological bases of oligotrophy of microorganisms and concept of microbial community // *Microbial Ecology*. 1991. V. 22. P. 239–247.
31. Steinberg C., Kamara S., Prokhotskaya V.Y., Manusadzianas L., Karasyova T.A., Timofeyev M.A., Jie Z., Menzel R. Dissolved humic substances – ecological driving forces from the individual to the ecosystem level // *Freshwater Biology*. 2006. V. 51 (7). P. 1189–1210.
32. Trigo D., Lavelle P. Changes in respiration rate and some physicochemical properties of soil during gut transit through *Allolobophora molleri* (Lumbricidae, Oligochaeta) // *Biology and Fertility of Soils*. 1993. V. 15. № 3. P. 185–188.
33. Vacca D., Bleam W., Hikey W. Isolation of soil bacteria adapted to degrade humic acid-sorbed phenanthrene // *Applied and Environmental Microbiology*. 2005. V. 71 (7). P. 3797–3805.
34. Vallini G., Pera A., Agnolucci M., Valdrighi M. Humic acids stimulate growth and activity of in vitro tested axenic cultures of soil autotrophic nitrifying bacteria // *Biology and Fertility of Soils*. 1997. V. 24 (3). P. 243–248.
35. Zavgorodnyaya Yu.A., Demin V.V., Kurakov A.V. Biochemical degradation of soil humic acids and fungal melanins // *Organic Geochemistry*. 2002. V. 33. P. 347–355.