

УДК 574.5; 579.26; 543.424

С. А. Доленко¹, А. М. Кравченко¹, В. В. Вембер²,
В. В. Абрамов², В. В. Таранов²

**ВЛИЯНИЕ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ НА
ВЫЖИВАЕМОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ
РАЗНЫХ ГРУПП В ВОДНОЙ СРЕДЕ**

На примере культур бактерий *Pseudomonas* sp. и *Bacillus* sp., относящихся к различным систематическим и физиологическим группам, было исследовано влияние гуминовых кислот в концентрационном интервале, характерном для природных вод (0—15 мг/дм³), на жизнеспособность данных бактерий. Обнаружено разнонаправленное действие гуминовых кислот на микроорганизмы, а именно: при концентрациях 1 и 5 мг/дм³ они снижают, а при 15 мг/дм³ — не влияют на выживаемость исследованных культур бактерий. Выдвинуто предположение о его природе.

Ключевые слова: гуминовые кислоты, микроорганизмы, бактерицидное действие, размер оптических неоднородностей, метод малоуглового преломления, потенциометрическое титрование.

Гумусовые вещества (ГВ) — необходимая и обязательная составная часть всех процессов в биосфере. Они выполняют ряд важнейших функций: аккумулятивную, транспортную, регуляторную, протекторную и физиологическую [7]. Взаимодействуя с живыми организмами, ГВ в малых количествах влияют на рост, подавляя [16, 24] или стимулируя [2, 15, 26] его. Механизм такого двойного действия непонятен. Установление этого механизма особенно важно по отношению к микроорганизмам, которые, как и гуминовые кислоты, ответственны за саморегенерацию природных водоемов. Рассмотрение культур бактерий с разными жизненными стратегиями, вероятно, позволит системно подойти к изучаемой проблеме. В природных водных объектах ГВ, помимо своей общеизвестной способности связывать как неорганические, так и органические токсиканты, могут активно участвовать в окислительно-восстановительных процессах, выступая как источником активных форм кислорода, так и их поглотителем. Во многих случаях ГВ инициируют образование активных форм, таких как гидроксильные радикалы, атомарный кислород, пероксидные радикалы и возбужденные триплетные состояния гумусовых кислот. Таким образом, ГВ играют значительную роль в деструкции органических веществ [14, 17]. С другой стороны, ГВ известны как природные антиоксиданты. Фенольные гидроксильные группы ГВ являются хорошими донорами водорода: они могут вступать в реакции с актив-

© С. А. Доленко, А. М. Кравченко, В. В. Вембер, В. В. Абрамов,
В. В. Таранов, 2019

ным кислородом и активными формами азота [25], останавливая таким образом цикл генерации новых радикалов. Радикальные формы антиоксидантов, образованные в результате взаимодействия с первичными активными формами, гораздо более химически стабильны, чем первичные радикалы, и способны влиять на процессы окисления, основанные на радикальных реакциях [18]. Способность ГВ выступать как в роли анти-, так и прооксидантов, так же как и двоякое физиологическое действия на живые организмы, недостаточно изучена. Ранее нами показано, что ряд физико-химических свойств водных растворов гуминовых кислот (ГК), одной из наиболее распространенных фракций природных гумусовых веществ, существенно зависит от их концентрации [3]. Мы предполагаем, что физиологическое действие ГК на микроорганизмы также может зависеть от их концентрации в растворе.

В связи с этим, цель данной работы состояла в исследовании влияния концентраций ГК в интервале, характерном для природных вод, на жизнеспособность бактерий, реализующих различные типы жизненных стратегий.

Материал и методика исследований. В работе использован препарат натриевой соли гуминовой кислоты (фирмы Aldrich) без дополнительной очистки, водные растворы которого готовили на дистиллированной воде. Дистиллированная вода была использована в качестве контрольного образца.

При изучении действия ГК на микроорганизмы были использованы культуры бактерий *Pseudomonas* sp. и *Bacillus* sp., не только относящиеся к разным систематическим и физиологическим группам, но и реализующие различные типы жизненных стратегий, что существенно отличает их по возможности выживания, метаболическому потенциалу и индексу олиготрофности [1]. Культуры бактерий *Pseudomonas* sp. 125 и *Bacillus* sp. 124 были получены из коллекции микроорганизмов кафедры Экологии и технологии растительных полимеров Национального технического университета Украины «Киевский политехнический институт». Все использованные в работе микроорганизмы культивировали на общепринятых агаризованных средах, после чего готовили клеточную суспензию. Стандартизацию клеточной суспензии и определение степени выживаемости бактерий проводили турбидиметрическим методом [8], доводя дозу засеваемого материала в дистиллированной воде до $A_{540} = 0,100$ на спектрофотометре СФ-26. При этом мы не проводили прямого подсчета клеток бактерий, но принимали, что зависимость оптической плотности суспензии клеток от их концентрации прямо пропорциональна их выживаемости. При проведении экспериментов микроорганизмы без среды обитания переносили в дистиллированную воду с различным содержанием ГК. Контроль выживаемости микроорганизмов во всех образцах проводили ежедневно на протяжении 6 сут.

Количество функциональных групп в молекуле ГК определяли потенциометрическим титрованием [10]. Определение эффективного диаметра оптических неоднородностей в водных растворах ГК проводили методом малоуглового преломления на лабораторной установке Кластер-1, разработанной в

Институте коллоидной химии и химии воды НАН Украины. Для контроля повторяемости результатов на каждом образце измерение повторяли не менее пяти раз, полученные данные усредняли для дальнейшего анализа. Относительная ошибка не превышала 10%.

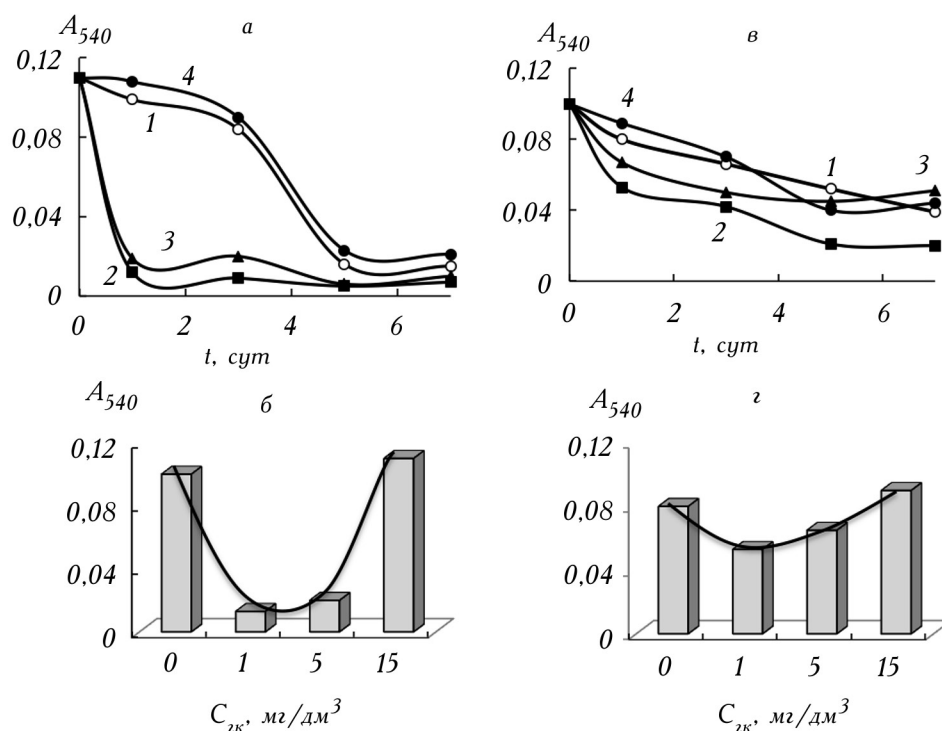
Результаты исследований и их обсуждение

На примере культур бактерий *Pseudomonas sp.* и *Bacillus sp.* была исследована зависимость выживаемости микроорганизмов от концентрации в растворе гуминовых кислот. Для исследований был выбран интервал концентраций 0—15 мг/дм³, соответствующий их содержанию в природных пресных поверхностных водах [5]. Результаты исследования влияния ГК на рост микроорганизмов представлены на рисунке 1. Выживаемость микроорганизмов *Pseudomonas sp.* в отсутствие добавок ГК сохраняется до 3 суток. Аналогичный эффект наблюдается при добавлении 15 мг/дм³ ГК. Однако при добавках ГК 1 и 5 мг/дм³ выживаемость данных микроорганизмов резко падает и приближается к нулю уже в течение первых суток. Для микроорганизмов *Bacillus sp.* наблюдаются похожие зависимости, однако они выражены слабее. Выживаемость микроорганизмов была минимальной при концентрации 1 мг/дм³.

Таким образом, добавки ГК в исследованном концентрационном интервале снижают (при 1 и 5 мг/дм³) или не влияют (при 15 мг/дм³) на выживаемость исследованных культур бактерий. Обнаруженное разнонаправленное действие ГК на микроорганизмы хорошо коррелирует с известными литературными данными по влиянию невысоких концентраций ГК на живые организмы [2, 15, 16, 24, 26]. Данный эффект может быть обусловлен сложным строением ГК. Согласно существующим представлениям [9], ГК рассматривают как соединения переменного состава, состоящие из отдельных структурных фрагментов, и содержащие около 15 различных видов функциональных групп, среди которых аминогруппы, амидные, спиртовые, альдегидные, карбоксильные, карбонильные, кетонные, метоксильные, фенольные, хинонные. В связи с этим они, с одной стороны, являясь источником углерода и азота, могут служить дополнительным источником питания для микроорганизмов [4, 13], а с другой — гумусовые вещества, как известно [22, 23], обогащены стабильными свободными радикалами. Концентрация свободных радикалов в ГК может достигать от $1,4 \cdot 10^{17}$ до $37,4 \cdot 10^{17}$ спин/г вещества [21]. Они запускают цепные радикальные реакции и, таким образом, вызывая окисление органического материала, приводят к ускорению деградации различных клеточных структур. Этим, возможно, и объясняется падение выживаемости исследованных культур бактерий (см. рис. 1).

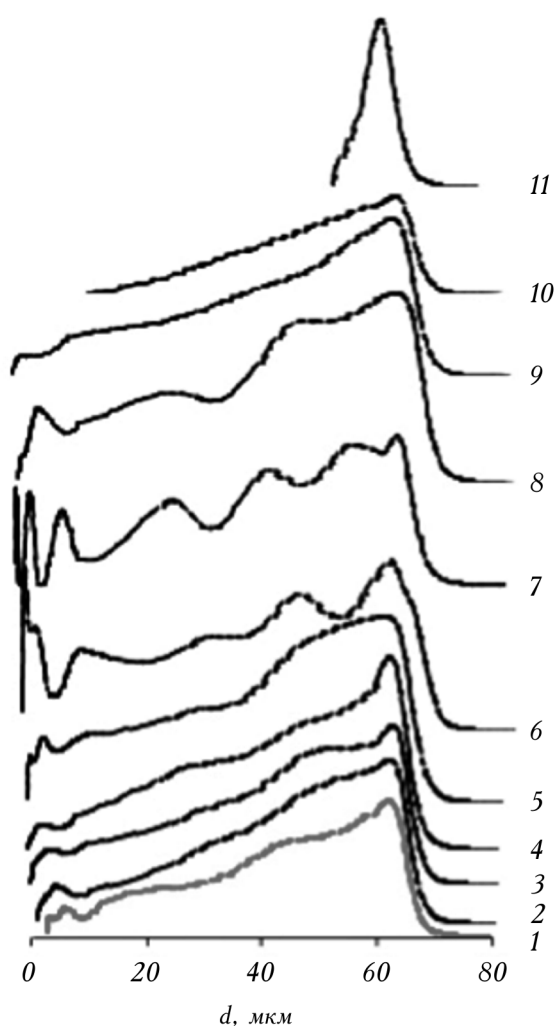
При этом выявленные различия в биологической активности ГК по отношению к бактериям разных групп можно объяснить строением их клеточных стенок [6]. Так, бактерии *Bacillus sp.*, имеющие более плотную клеточную стенку, за счет более высокого содержания муреина способны дольше противостоять негативному воздействию свободных радикалов ГК.

При объяснении ослабления негативного влияния ГК с увеличением их концентраций выше 5 мг/дм³ на выживаемость микроорганизмов следует



1. Зависимость выживаемости микроорганизмов *Pseudomonas* sp. (а, б) и *Bacillus* sp. (в, з) от продолжительности эксперимента (а, в) и концентрации ГК в растворе (б, з). $C_{ГК}$, мг/дм³: 1—0; 2—1; 3—5; 4—15; длительность эксперимента — 1 сут (б, з).

учесть произошедшие за последнее время изменения во взглядах на молекулярную организацию ГВ. Долгое время ГВ рассматривали, в соответствии с концепцией Д. С. Орлова [7], как сложную смесь специфических более или менее темноокрашенных азотсодержащих высокомолекулярных гетерополимеров. Сравнительно недавно А. Пикколо [19, 20] выдвинул теорию о доминирующем вкладе низкомолекулярных компонентов в составе ГВ, которые существуют в растворе в виде мицелл, а затем — новую концепцию молекулярной организации ГВ [11], основанную на базовых представлениях супрамолекулярной химии, в соответствии с которыми ГВ представляют собой ансамбли органических молекул относительно небольших размеров, построенные по принципу «гость-хозяин», соединённых между собой в основном слабыми, а не ковалентными связями в стабильный устойчивый к деградации комплекс. Таким образом, ГК можно рассматривать как открытые неравновесные системы со сложной многоуровневой пространственно-временной самоорганизацией [3]. При этом концентрация ГК является управляющим параметром этой системы. При преодолении некоторого критического значения данного параметра система спонтанно переходит в новое упорядоченное состояние, что сопровождается резким изменением её свойств. По-видимому, концентрация 5 мг/дм³ является точкой перехода системы с участием ГК из низкомолекулярного «доступного» состояния в супрамолекулярное «закрытое».



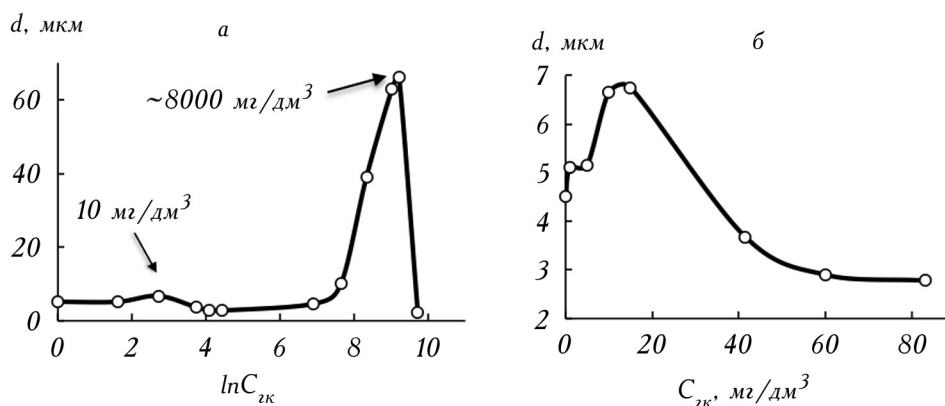
2. Размерные спектры оптических неоднородностей, наблюдаемых в водных растворах ГК. $C_{ГК}$, мг/дм³: 1 — 0; 2 — 1; 3 — 5; 4 — 15; 5 — 41; 6 — 60; 7 — 83; 8 — 1000; 9 — 2080; 10 — 14150; 11 — 8300.

являются критическими для изменения оптических, связующих и адсорбционных свойств ГК в водном растворе. При этом (5—10) мг/дм³ рассматривается как критическая концентрация образования супрамолекулярных ассоциатов ГК, а ~ 8000 мг/дм³ — как критическая концентрация мицеллообразования ГК [12].

Так как измерения проводились в широком концентрационном диапазоне, то отдельно представлен начальный участок (рис. 3, б), позволяющий подробно исследовать малые концентрации, при которых были проведены

Для подтверждения данного предположения в качестве дополнительной переменной, которая отражает структурные изменения в системе, в микронной области были исследованы размерные спектры оптических неоднородностей, наблюдаемые в водных растворах ГК в широком диапазоне их концентраций (рис. 2). Как видно на рисунке, до 60 мг/дм³ характер спектров оптических неоднородностей подобен спектру для дистиллированной воды. Можно также выделить концентрацию ~ 8000 мг/дм³, при которой наблюдается один четкий пик при 60 мкм. Полученные спектры позволяют только визуально оценить характер концентрационных зависимостей.

Для количественной оценки состояния системы с участием ГК была выбрана величина d (мкм), отражающая средний диаметр оптических неоднородностей данной системы (рис. 3). Анализ полученных зависимостей позволяет более корректно выделить две критические точки: 10 и ~ 8000 мг/дм³. Ранее нами было показано [3], что данные концентрации также

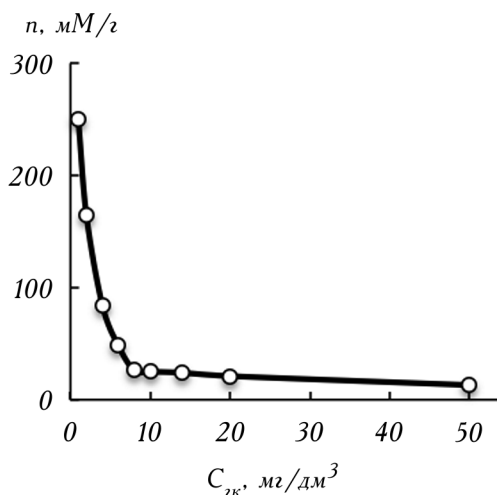


3. Зависимость среднего размера оптических неоднородностей, наблюдаемых в водных растворах ГК, от их концентрации в растворе: *a* — весь диапазон концентраций; *б* — начальный участок.

микробиологические исследования. В интервале концентраций 0—15 mg/dm^3 зависимость среднего диаметра оптических неоднородностей в водных растворах ГК имеет ступенчатый характер (наблюдаются две ступени — 1–5 mg/dm^3 и 10—15 mg/dm^3). Таким образом, размерные спектры подтверждают, что интервал 5—10 mg/dm^3 является критическим.

Параллельно методом потенциометрического титрования были проведены исследования по установлению количества доступных кислотных групп в молекуле ГК в зависимости от их концентрации в растворе (рис. 4). При увеличении концентрации ГК до $\sim 10 \text{ mg}/\text{dm}^3$ происходит резкое падение количества доступных кислотных групп в молекуле ГК с $\sim 250 \text{ mM}/\text{г}$ (при 1 mg/dm^3) до 25 $\text{mM}/\text{г}$ (при 10 mg/dm^3 ГК). Данный метод также подтверждает критичность интервала концентраций 5—10 mg/dm^3 .

Полученные результаты хорошо отражают структурные изменения, происходящие в водных растворах ГК при повышении их концентрации. За счёт ассоциации (самоорганизации) молекул ГК в водном растворе происходит изменение пространственного расположения атомов и группировок, то есть меняется конформация молекул, происходит их укрупнение и деформация структуры. В результате часть активных групп становится заключен-



4. Зависимость количества карбоксильных групп в молекуле ГК от их концентрации в растворе.

ными внутри ассоциата, экранированными фрагментами других молекул и практически недоступными для химического взаимодействия. Кроме того, при увеличении концентрации ГК сокращается расстояние между молекулами, и функциональные группы могут вступать в межмолекулярные взаимодействия, образовывать внутримолекулярные и межмолекулярные водородные связи, что может приводить к экранированию не только кислотных групп, но и фенольных, которые ответственны за радикальные процессы.

Таким образом, в концентрационном интервале 5—10 мг/дм³, который можно рассматривать как критический, в водном растворе происходит переход ГК в новое состояние, характеризующееся иными свойствами. При этом существенно уменьшается не только их комплексообразующая способность по отношению к катионам металлов, что является известным фактом, но и радикально-окислительная активность, что мы и наблюдаем в нашем исследовании по отношению к микроорганизмам.

Заключение

Обнаружено разнонаправленное действие ГК на микроорганизмы, а именно: при концентрациях 1 и 5 мг/дм³ они снижают, а при 15 мг/дм³ — не влияют на выживаемость исследованных культур бактерий.

Выдвинуто предположение о том, что угнетающее действие гуминовых кислот по отношению к микроорганизмам проявляется в том, что ГК, обогащенные свободными радикалами, вызывая окисление органического материала, приводят к ускорению деградации различных клеточных структур. При этом культуры бактерий с разными типами жизненной стратегии по-разному противостоят данному воздействию, что объясняется отличиями в строении их клеточных стенок.

На основании изменения размерных характеристик и уменьшения количества доступных кислотных групп в молекуле ГК при увеличении их концентрации в водном растворе установлен критический концентрационный интервал (5—10 мг/дм³), отражающий переход системы из одного состояния в другое с новыми свойствами. При этом при преодолении критической концентрации существенно уменьшается не только их комплексообразующая способность, но и радикально-окислительная активность по отношению к микроорганизмам.

**

На прикладі культур бактерій Pseudomonas sp. і Bacillus sp., які належать до різних систематичних і фізіологічних груп, було досліджено вплив гумінових кислот в концентраційному інтервалі (0—15 мг/дм³), характерному для природних вод, на життєздатність цих бактерій. Виявлено різноспрямовану дію гумінових кислот на мікроорганізми, а саме, при концентраціях 1 і 5 мг/дм³ вони знижують, а при 15 мг/дм³ — не впливають на виживаність досліджених культур бактерій. Висунуто припущення щодо її природи.

**

On the example of cultures of bacteria Pseudomonas sp. and Bacillus sp., belonging to different systematic and physiological groups, the effect of humic acids in the concentration

range (0–15 mg/dm³), characteristic for natural waters, on the viability of these bacteria was investigated. Multidirectional action of humic acids on microorganisms was discovered, namely, at concentrations of 1 and 5 mg/dm³, they reduce, and at 15 mg/dm³, they do not affect the survival of the studied cultures of bacteria. An assumption about its nature was put forward.

**

1. Антупчук А.Ф., Кірсева І.Ю. Водна мікробіологія: Навчальний посібник. — К.: Кондор, 2005. — 254 с.
2. Бирюков М.В. Биологическое действие гуминовых кислот и его пространственная локализация в почве: Автореф. дис... канд. биол. наук. — М., 2006. — 24 с.
3. Доленко С.А., Трифонова М.Ю., Тарасевич Ю.И. Гуминовые кислоты — самоорганизующиеся диссипативные системы // Химия и технология воды. — 2017. — Т. 39, № 6. — С. 651—665.
4. Кугрина 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. — 1951. — Т. 38. — С. 185—254.
5. Линник П.Н., Иванченко Я.С., Линник Р.П., Жежеря В.А. Гумусовые вещества поверхностных вод и особенности их распределения среди различных фракций // Гидробиол. журн. — 2013. — Т. 49, № 3. — С. 99—120.
6. Лысак В.В. Микробиология: Учеб. пособие. — Минск: Изд-во Белорус. ун-та, 2007. — 426 с.
7. Орлов Д.С. Свойства и функции гуминовых веществ. Гуминовые вещества в биосфере. — М.: Наука, 1993. — 238 с.
8. Перт Дж.С. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. — М.: Мир, 1978. — 331 с.
9. Попов А.И. Гуминовые вещества: свойства, строение, образование / Под ред. Е. И. Ермакова. — СПб.: Изд-во С. Петербург. ун-та, 2004. — 248 с.
10. Сигга С., Ханна Дж. Г. Количественный органический анализ по функциональным группам. — М.: Химия, 1983. — С. 132—135.
11. Стюг Дж.В., Этвуд Дж.Л. Супрамолекулярная химия. Т. 1. — М.: Академкнига, 2007. — 480 с.
12. Тарасевич Ю.И., Доленко С.А., Трифонова М.Ю., Алексеенко Е.Ю. Ассоциация и коллоидно-химические свойства гуминовых кислот в водных растворах // Коллоид. журн. — 2013. — Т. 75, № 2. — С. 230—236.
13. Теплер Е.З. Микроорганизмы рода *Nocardia* и разложение гумуса. — М.: Наука, 1976. — 199 с.
14. Boreen A.L., Edhlund B.L., Cotner J.B. Indirect photodegradation of dissolved free amino acids: The contribution of singlet oxygen and the differential reactivity of DOM from various sources // Environ. Sci. and Technol. — 2008. — Vol. 42, N 15. — P. 5492—5498.
15. Gryndler M., Sudova R., Gryndlerova H. Hyphal growth and mycorrhiza formation by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus claroideum* BEG 23 is stimulated by humic substances // Mycorrhiza. — 2005. — Vol. 15, N 7. — P. 483—488.

16. *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. — Vol. 43. — P. 759—769.
17. *Miller P.L., Chin Y.P.* Indirect photolysis promoted by natural and engineered wetlandwater constituents: Processes leading to alachlor degradation // *Environ. Sci. and Tech.* — 2005. — Vol. 39, N 12. — P. 4454—4462.
18. *Parr A.J., Bolwell J.P.* Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile // *J. Sci. Food Agric.* — 2002. — Vol. 80. — P. 985—1012.
19. *Piccolo A.* The supramolecular structure of humic substances // *Soil Sci.* — 2001. — Vol. 166, N 11. — P. 810—832.
20. *Piccolo A.* The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science // *Adv. Agron.* — 2002. — Vol. 75. — P. 57—134.
21. *Senesi N., Schnitzer M.* Effects of pH, reaction time, chemical reduction and irradiation on ESR spectra of fulvic acid // *Soil Sci.* — 1977. — Vol. 123, N 4. — P. 224—234.
22. *Senesi N., Schnitzer M.* Free radicals in humic substances // *Environ. Biogeochem. and Geomicrobiol.* — 1978. — Vol. 2. — P. 467—481.
23. *Steelink C., Tollin G.* Stable free radicals in soil humic acid // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1962. — Vol. 59. — P. 25—33.
24. *Steinberg C., Kamara S., Prokhotskaya V.Y. et al.* Dissolved humic substances — ecological driving forces from the individual to the ecosystem level // *Freshwater Biology.* — 2006. — Vol. 51, N 7. — P. 1189—1210.
25. *Valentao P., Fernandes E., Carvalho F.* Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid // *J. Agric. Food Chem.* — 2002. — Vol. 50. — P. 4989—4993.
26. *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. — Vol. 24, N 3. — P. 243—248.

¹ Институт коллоидной химии и химии воды НАН Украины, Киев

² Киевский политехнический институт

Поступила 12.12.18