

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 57.04:579

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ
С ПОМОЩЬЮ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО ТЕСТА

М.В. Бирюков, О.Н. Бирюкова

(кафедра микробиологии; e-mail: biryukov@maik.bio.msu.ru)

С помощью бактериального люминесцентного теста было исследовано воздействие образцов промышленных гуматов и препаратов гуминовых кислот, выделенных из разных источников, на микробные клетки. Насыщенные растворы гуминовых веществ подавляли свечение тест-объектов, в то же время препараты уменьшали негативное воздействие ионов Cu^{2+} на живые клетки.

Ключевые слова: гуминовые кислоты, бактериальный люминесцентный тест, токсический эффект, ионы Cu^{2+} .

Гуминовые кислоты (ГК) являются неотъемлемой составной частью природных экосистем и, по мнению многих авторов, именно гумус обуславливает почвенное плодородие, стабильность функционирования, а также устойчивость экосистем по отношению к неблагоприятным факторам и токсичным веществам [1–3]. Согласно господствующим на данный момент представлениям, ГК являются продуктом отбора наиболее устойчивых форм органического вещества в процессе трансформации мортмассы растений микроорганизмами, в результате они формируют пул стабильного органического вещества в почвах и сопредельных экосистемах, в частности — поверхностных водах. Эту группу веществ объединяет способ их выделения из исходного образца (щелочная экстракция и последующее осаждение при $\text{pH} < 2,5$), а также ряд прочих характеризующих признаков: элементный состав, ИК-спектры, оптическая плотность при 465 нм и пр.

Одним из важнейших свойств ГК является способность связывать токсичные агенты, в частности ионы тяжелых металлов (ТМ). Препараты ГК и соли ГК (гуматы) показали свою эффективность при рекультивации и ремедиации техногенно нарушенных земель и городских ландшафтов [4, 5]. Прямое влияние ГК на почвенное плодородие в значительной степени увязывается с формированием агрономически ценной почвенной структуры, однако часто им приписывается прямое воздействие на функционирование живых организмов [6]. В настоящее время гуматы под различными торговыми марками активно предлагаются на рынке в качестве “биологических удобрений для органического земледелия”, как альтернативы минеральным удобрениям, поэтому становится актуальной разработка комплексных методов оценки “биологической активности” ГК по отношению к клеткам живых организмов.

Целью нашей работы было сравнить свойства ГК, выделенных из естественных почв, с препаратами ГК, выделенными из углей и торфов и предлагаемыми на рынке в качестве удобрений и биологически активных субстанций. Препараты оценивались по способности влиять на эффект бактериальной люминесценции, а также по их “детоксицирующему эффекту” (ДЭ), т.е. способности снижать негативное действие ионов меди на живые клетки.

Объекты и методы

Нами были исследованы коммерческие препараты, выделенные из угля различными фирмами-производителями, а так же выделенные коллегами: препараты из выветрелого угля — “гумат натрия” (У) “Гумат 70” (ООО Аграрные технологии, Россия); препарат из сильновыветрелого каменного угля Канско-Ачинского угольного бассейна (ВАТ), любезно предоставленный канд. тех. наук В.А. Терентьевым; препарат из леонардита “POWHUMUS” (ПАУ) (Humintech, Германия). Кроме того, некоторые количества промышленных препаратов были дополнительно очищены от балластных и технологических примесей и исследовались в экспериментах как варианты ГКу, ГКват, ГКпау, ГК70 соответственно. Очистка препаратов включала растворение их в 0,4 М NaCl, что позволило произвести высаливание органо-минеральных примесей, осадок отбрасывался. Полученный раствор трехкратно обрабатывали HCl до pH 2 (супернатант отбрасывался) и растворяли осадок в дистиллированной воде, доводя pH до 12 с помощью NaOH.

Помимо препаратов, выделенных из углей, были также исследованы препараты ГК, выделенные из горизонта A1 чернозема обыкновенного (200-летняя

Таблица 1

Характеристика препаратов ГК

Препарат	Зола, %	Элементный состав, атомные %				Атомные отношения			$E_{4651\text{nm}}^{0,001\%C}$	Общее содержание функциональных групп (моль/100г ГК)
		C	H	N	O	H/C	O/C	C/N		
У	27,2	30,2	32,5	0,7	36,6	1,1	1,2	41,1	0,13	575
ГКу	3,8	43,3	30,6	1,2	24,9	0,7	0,6	37,1	0,13	593
ВАТ	26	31	32,9	0,5	35,6	1,1	1,2	59,7	0,16	753
ГКват	2,5	41,9	33,1	0,8	24,2	0,8	0,6	55,6	0,17	633
ПАУ	26,8	33,1	32,2	0,9	33,9	1,0	1,0	39,2	0,10	495
ГКпау	2,7	38	29,3	0,9	31,8	0,8	0,8	42,6	0,18	673
Гумат70	23,9	35,4	30,7	0,6	33,3	0,9	0,9	55,1	0,12	733
ГК70	5,4	40,4	34,7	0,9	24,1	0,9	0,6	47,4	0,18	717
ГКТ	1,9	35,9	40,7	1,7	21,7	1,1	0,6	21,1	0,05	528
ГКЧ	6,2	41,8	35,3	3,2	19,7	0,8	0,5	13,1	0,12	677

некосимая залежь Каменной степи, Таловский р-н, Воронежская обл. (ГКЧ) и гуминовой кислоты из торфа, выделенной фирмой Merck (ГКТ).

По физико-химическим свойствам данные образцы являются типичными представителями гуминовых веществ [7]. Данные об их элементном составе и физические параметры приведены в табл. 1. Гуминовые кислоты из торфа и угля отличаются от почвенных низким содержанием азота, а ГК угля и высокой степенью окисленности. Малое содержание азота (0,5—3%) является характерной особенностью гуминовых кислот, выделяемых из торфов и углей.

Выбор оптимального и приемлемого для всех препаратов концентрационного диапазона был произведен с помощью предварительного исследования зависимости “доза-эффект” для концентраций всех препаратов в диапазоне от 10 до 200 мг/л. В дальнейшем для экспериментов была использована концентрация препаратов 100 мг/л.

Исследование взаимодействия Cu^{2+} с ГК и возникающего в результате ДЭ мы производили, экспонируя препараты ГК и раствор CuSO_4 в фосфатном буфере в течение 2 ч, а затем измеряли свечение раствора в соответствии с методикой измерения токсичности, приведенной ниже. Растворы препаратов гуматов, ГК и Cu^{2+} готовили в 0,1 М Na-фосфатном буфере pH 7,2.

Определение “биологической активности” (БА) исследуемых образцов проводилось по снижению интенсивности свечения бактериальной люциферазы, при контакте продуцирующих ее бактериальных клеток с химическими агентами [8]. Этот эффект часто именуют “интегральной токсичностью” ввиду отсутствия явно выраженной специфичности наблюдаемого эффекта. Измерения производились с применением биосенсора “Эколюм” (Россия), состоящего из клеток рекомбинантного штамма *Escherichia coli* K12 TG1 (lux+). В аликвоту исследуемой пробы 0,9 мл вносили 0,1 мл биосенсора. Итоговая концентрация клеток биосенсора в образце составляла 3×10^6 клеток

на 1 мл. Концентрация клеток в суспензии контролировалась с помощью проточного цитометра (макс-квант). Измерение интенсивности свечения производилось на люменометре 1251 luminometer (LKB, Швеция). Для экспериментов по определению БА препаратов гуматов и ГК в качестве контрольных образцов мы применяли аликвоты Na-фосфатного буфера, использованного для приготовления растворов. Для экспериментов по исследованию ДЭ препаратов в качестве контроля нами использовались аликвоты 100 мг/л соответствующей ГК без добавления ТМ. Это позволило учитывать эффект от действия самой ГК на клетки биосенсора, а также светопоглощение темноокрашенного раствора.

Оценка БА препаратов производилась по снижению свечения биосенсора в пробе по сравнению с контролем. Для оценки был использован стандартный безразмерный индекс токсичности T , рассчитываемый по формуле

$$T = \frac{I_0 - I}{I_0} \cdot 100,$$

где I_0 — интенсивность свечения в контроле, I — интенсивность свечения в исследуемой пробе.

Результаты и обсуждение

Измерение люминесценции нами проводилось в динамике для определения времени стабилизации сигнала и выбора оптимального, пригодного для сопоставления вариантов времени экспонирования. В первую минуту контакта биосенсора с исследуемыми образцами происходило значительное падение интенсивности свечения биосенсора, к 15 мин это действие ослабевало, а к 30-й мин экспонирования уровень сигнала стабилизировался и в дальнейшем менялся незначительно (менее 5% за 5 мин). Было принято решение использовать 30 мин как стандартное время экспозиции при работе с ГК.

В ходе наших экспериментов было обнаружено, что при низких концентрациях (менее 20 мг/л) ГК вызывают стимуляцию свечения тест-объекта, что затрудняет интерпретацию результатов, так как в бактериальном люминесцентном тесте оценка биологического воздействия ведется по тушению свечения, а его стимуляция не имеет универсальной интерпретации. При концентрации препаратов 200 мг/л и более наблюдалось частичное выпадение их в осадок в условиях использованной нами буферной системы. Использование концентрации 100 мг/л для всех препаратов позволило обеспечить стандартизированные условия, при которых испытуемые субстанции находились в растворенной форме, а также достоверно проявлялась их собственная биологическая активность. Для исследованных препаратов значение Т для концентраций 100 мг/л лежало в диапазоне 20–80. В табл. 2 представлены данные по БА, выраженные в единицах безразмерного индекса Т, для всех исследованных препаратов в концентрации 100 мг/л на 30-й мин экспонирования. Необходимо отметить, что данная концентрация является характерной для почвенных растворов, а также насыщенных органическим веществом поверхностных вод. Наши данные согласуются с результатами, полученными для этих и аналогичных препаратов на иных тест-объектах, таких, как, например, дрожжевые клетки и проростки высших растений, для которых концентрации ГК порядка 100 мг/л оказывали достоверное подавляющее действие [6, 7]. Таким образом, говоря о применении и эксплуатационных характеристиках удобрений на основе гуматов, необходимо принимать во внимание их потенциальные негативные эффекты при использовании высоких концентраций.

Препараты, выделенные из угля, показали большие значения БА по сравнению с препаратами, выделенными из торфа и почвы. Препараты ГК, выделенные из промышленных образцов гуматов и очищен-

ные от технологических примесей по приведенной выше методике, обуславливали либо несколько более высокие значения Т, либо аналогичные исходным препаратам.

Далее нами были исследованы ДЭ препаратов по отношению к ионам ТМ на примере Cu^{2+} . В ходе предварительных экспериментов нами было установлено, что при концентрации Cu^{2+} 50,0 мкМ обуславливает практически полное тушение биолуминесценции ($T = 99$); при уменьшении концентрации Cu^{2+} значения Т закономерно снижаются, достигая значения эффективно действующих концентраций 50 и 20 при 28 и 12 мкМ соответственно. В экспериментах по исследованию ДЭ мы исследовали взаимодействие 50 мМ Cu^{2+} со 100 мг/л препаратов. Выбранный интервал до внесения тест-объектов и измерения Т составлял 2 ч, так как, согласно литературным данным [1, 8, 9], этого времени достаточно для установления равновесия в системе ТМ–ГК. Для описания ДЭ мы использовали параметр “остаточная активность” (ОА), который был определен как токсичность ионов ТМ после взаимодействия с молекулами ГК. Так как токсичность исходной внесенной концентрации Cu^{2+} была 99, то чем ОА ниже, тем, по-нашему мнению, эффективнее ГК производит их детоксикацию и тем выше ДЭ препарата. Результаты данных экспериментов представлены в табл. 2. В результате экспериментов было определено, что ДЭ препаратов ГК из почвы значительно выше, чем у всех остальных. За ним по эффективности следует препарат ГК из торфа, а препараты гуматов из угля по этому параметру значительно менее эффективны. Очистка препаратов гуматов увеличивает их детоксицирующую способность в среднем на 20–30%, что происходит, вероятно, за счет высвобождения и активации связывающих центров молекул ГК.

Таким образом, метод бактериальной люминесценции позволяет оперативно оценивать как токсичность, так и ДЭ широкого спектра препаратов ГК разного происхождения и с разными свойствами. Получаемые данные могут быть использованы для сравнения различных коммерческих препаратов, выбора оптимальных доз для эффективного и экономически рентабельного внесения, стандартизации производственных процессов. Детоксицирующая способность почвенного препарата ГК значительно выше, чем у их синтетических аналогов, выделенных из бурых углей.

Авторы выражают благодарность сотруднику ЦКП факультета почвоведения МГУ В.В. Демину за помощь в проведении работ и интерпретации результатов, а также рецензенту за ценные замечания.

Биологическая активность и ДЭ препаратов ГК, исследованные с помощью бактериального люминесцентного теста

Таблица 2

Препарат	Биологическая активность препарата, индекс Т (стандартное отклонение, n = 3)	Остаточная активность комплекса ГК– Cu^{2+} , индекс Т (стандартное отклонение, n = 3)
У	61 (5)	31 (3)
ГКу	72 (6)	24 (4)
ВАТ	42 (6)	42 (4)
ГКват	51 (5)	35 (3)
ПАУ	55 (6)	40 (5)
ГКпау	52 (4)	32 (4)
Гумат70	60 (4)	33 (3)
ГК70	65 (5)	19 (2)
ГКТ	32 (3)	29 (4)
ГКЧ	20 (2)	16 (3)

* * *

Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Програм-

мы развития Московского университета и гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 12-04-01652_а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Орлов Д.С. Гуминовые кислоты и общая теория гумификации. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1990. 325 с.
2. Stevenson F.J. Humus chemistry: Genesis, composition, reactions. 2nd edition. N.Y.: John Wiley & Sons, 1994. 512 p.
3. Humic Substances in Terrestrial Ecosystems / Ed. by A. Piccolo. Elsevier, 1996. 688 p.
4. Biryukova O.N., Biryukov M.V. The effect of Ca-humate preparation on the aggregate composition of soils // Moscow Univ. Soil Sci. Bull. 2009. Vol. 64. N 3. P. 129—132.
5. Pandey A.K., Pandey, S.D. Misra V. Removal of toxic metals from leachates from hazardous solid wastes and reduction of toxicity to Microtox by the use of calcium alginate beads containing humic acid // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2002. Vol. 52. N 2. P. 92—96.
6. Zakalyukina Yu.V., Golichenkov M.V., Brovkina O.I., Putyatina T.S. Comparative study of actinomycete communities associated with *Lasius niger* and *Formica cunicularia* ants and their nests // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2014. Vol. 69. N 3. P. 118—124.
7. Дёмин В.В., Бирюков М.В., Семенов А.А., Завгородняя Ю.А. Природа биологического действия гуминовых веществ: Локализация биопротекторного действия гуминовых веществ в почвах // Доклады по экологическому почвоведению. 2006. Т. 1. № 1. С. 80—91.
8. Steinberg S.M., Poziomek E.J., Engelmann W.H., Rogers K.R. A review of environmental applications of bioluminescence measurements // Chemosphere. 1995. Vol. 30. N 11. P. 2155—2197.
9. Орлов Д.С., Дёмин В.В., Завгородняя Ю.А. Влияние молекулярных параметров гуминовых кислот на их физиологическую активность // Докл. РАН. 1997. Т. 354. № 6. С. 843.

Поступила в редакцию
14.11.14

ASSESSMENT OF THE ACUTE PHYSIOLOGICAL EFFECTS OF HUMIC ACIDS WITH A BACTERIAL LUMINESCENT TEST

M.V. Biryukov, O.N. Biryukova

By means of a bacterial luminescent test the study investigates physiological activity of industrial humates and humic substances preparations extracted from different sources. Saturated solution of humic substances suppressed luminescence of objects under study. At the same time, the preparation reduced the effect of Cu^{2+} ions on living cells.

Key words: humic acids, bacterial luminescent test, toxic effect, Cu^{2+} ions.

Сведения об авторах

Бирюков Михаил Владимирович — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-59-36; e-mail: biryukov@mail.bio.msu.ru

Бирюкова Ольга Николаевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры химии почв факультета почвоведения МГУ. Тел.: 8-495-939-51-64; e-mail: msu.ecology@gmail.com