

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МИКРОБНЫХ КОМПЛЕКСОВ ВЕРХОВЫХ ТОРФЯНИКОВ — АНАЛИЗ ПРИЧИН МЕДЛЕННОЙ ДЕСТРУКЦИИ ТОРФА

Товарищество научных изданий КМК

Москва ❖ 2013

УДК 574.4: [631.46:552.577.086](470+571)

ББК 28.080.3+26.343.4+40.3

Ф94

Функционирование микробных комплексов в верховых торфяниках — анализ причин медленной деструкции торфа. Москва: Товарищество научных изданий КМК. 2013. 128 с., ил.

В монографии приводятся и обсуждаются результаты многолетних исследований авторов в области изучения физико-химических и микробиологических свойств торфяных почв Европейской и Азиатской (Западная Сибирь) частей России. Основное внимание при этом акцентируется на проблеме медленной деструкции торфа в верховых торфяниках. Установлено, что в верховых торфяниках содержится огромная грибная биомасса, в её структуре доминирует активный компонент — мицелий. Однако его жизнеспособность, как и прорастание спор грибов, падает с глубиной. Низкое разнообразие и низкая доля бактерий гидролитического блока в этих почвах связаны, возможно, с ингибирующим действием сфагнолов. Кислая реакция среды, низкие температуры и недостаток питательных элементов не являются главными факторами, ограничивающими деструкцию торфа. Наиболее значимым фактором, обеспечивающим замедленную деструкцию сфагнома на первых этапах сукцессии, является сложный полисахаридный состав стеблей сфагнома, который с трудом используется в качестве источника углерода даже грибами. В толще торфяников в качестве факторов, ограничивающих деструкцию торфа, наиболее значимыми представляются обилие фенольных соединений и анаэробные условия, в которых эти вещества обладают особой токсичностью и не дают работать гидролитическим ферментам.

Ключевые слова: верховые торфяники, деструкция торфа, микробные комплексы, экологические факторы, структура бактериальных и грибных сообществ, жизнеспособность микроорганизмов, механическая и химическая устойчивость сфагнома, сфагнаны, сфагнолы, экологические функции

Авторы:

Т.Г. Добровольская, А.В. Головченко, Д.Г. Звягинцев, Л.И. Инишева, А.В. Кураков, А.В. Смагин, Г.М. Зенова, Л.В. Лысак, Т.А. Семёнова, А.Л. Степанов, А.М. Глушакова, Т.Н. Початкова, О.С. Кухаренко, А.В. Качалкин, А.В., Л.А. Поздняков, О.Ю. Богданова

Ответственный редактор:

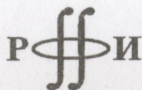
член-корреспондент РАН И.Ю. Чернов

Рецензенты:

доктор биологических наук А.И. Поздняков

доктор географических наук Л.Ф. Литвин

Издание осуществлено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований по проекту № 12-04-07129



Издание РФФИ не подлежит продаже

© Коллектив авторов, текст, иллюстрации, 2013

© Товарищество научных изданий КМК, издание, 2013

ISBN 978-5-87317-892-6

Оглавление

1. Торфяные болота. <i>Инишева Л.И.</i>	5
1.1. Введение	5
1.2. Химический состав растений-торфообразователей	5
1.3. Степень разложения торфа	9
2. Сфагновые мхи — основные торфообразователи верховых торфяников. <i>Глушакова А.М.</i>	12
2.1. Особенности строения и размножения	13
2.2. Разнообразие сфагновых мхов и образование ими фитогенного рельефа.....	16
3. Генезис торфяных почв и определение понятия «торфяная почва». <i>Добровольская Т.Г., Головченко А.В., Инишева Л.И.</i>	18
4. Физико-химическая характеристика верховых и низинных торфяников. <i>Кухаренко О. С., Початкова Т.Н., Поздняков Л.А.</i>	20
5. Водно-физические свойства, состав почвенного воздуха и кинетика биодеструкции в верховых торфяниках. <i>Смагин А.В.</i>	27
6. Микробные сообщества торфяных почв	39
6.1. Численность и структура грибных сообществ. <i>Головченко А.В.</i>	39
6.2. Жизнеспособность грибов в торфяниках. <i>Головченко А.В., Кураков А.В.</i>	41
6.3. Таксономический состав грибных сообществ. <i>Головченко А.В., Кураков А.В., Семёнова Т.А.</i>	42
6.4. Функции грибов, связанные с деструкцией торфа. <i>Головченко А.В., Кураков А.В., Качалкин А.В.</i>	45
6.5. Численность и таксономическая структура бактериальных комплексов. <i>Добровольская Т.Г., Головченко А.В., Кухаренко О.С.</i>	47
6.6. Физиологическое состояние и жизнеспособность бактерий	49
6.6.1. Кинетический метод определения физиологического состояния бактерий <i>in situ</i> . <i>Якушев А.В., Кухаренко О.С.</i>	49
6.6.2. Окрашивание флуоресцентным красителем live-dead, наноформы бактерий в верховых торфяниках. <i>Лысак Л.В.</i>	55
6.7. Бактерии — антагонисты фитопатогенных грибов в сфагновых мхах. <i>Добровольская Т.Г.</i>	61
6.8. Антагонистические взаимоотношения бактерий и грибов, выделенных из торфяных почв. <i>Добровольская Т.Г., Кураков А.В.</i>	61
7. Анализ экологических факторов, ограничивающих функционирование микробных сообществ и деструкцию верхового торфа	65
7.1. Низкая концентрация кислорода	65
7.1.1. Численность, биомасса и разнообразие грибов и дрожжей. <i>Кураков А.В., Головченко А.В., Качалкин А.В.</i>	66

7.1.2. Численность и разнообразие бактерий и актиномицетов. <i>Добровольская Т.Г., Зенова Г.М.</i>	70
7.1.3. Активность ферментов. <i>Добровольская Т.Г.</i>	72
7.1.4. Структура и функционирование микробных сообществ в торфяных почвах верхового типа — модельный эксперимент. <i>Головченко А.В., Добровольская Т.Г., Кухаренко О.С., Семёнова Т.А., Богданова О.Ю., Степанов А.Л.</i>	73
7.1.5. Активность микробных сообществ и деструкция торфа в мелиорируемых торфяниках. <i>Добровольская Т.Г., Головченко А.В.</i>	80
7.2. Низкие температуры	81
7.2.1. Грибы и дрожжи. <i>Головченко А.В., Семёнова Т.А., Богданова О.Ю., Качалкин А.В.</i>	81
7.2.2. Бактерии и актиномицеты. <i>Добровольская Т.Г., Головченко А.В., Кухаренко О.С., Зенова Г.М.</i>	84
7.2.3. Активность ферментов. <i>Добровольская Т.Г.</i>	88
7.3. Кислая реакции среды. <i>Добровольская Т.Г.</i>	89
7.4. Недостаток питательных элементов. <i>Добровольская Т.Г., Качалкин А.В.</i> ..	92
7.5. Химическая и механическая устойчивость сфагнома. <i>Добровольская Т.Г., Головченко А.В.</i>	96
7.6. Антимикробная активность сфагнома	100
7.6.1. Сфагнаны. <i>Добровольская Т.Г.</i>	100
7.6.2. Сфагнолы. <i>Добровольская Т.Г., Якушев А.В., Кухаренко О.С.</i>	101
8. Заключение. <i>Добровольская Т.Г., Головченко А.В., Звягинцев Д.Г.</i>	107
8.1. Почему медленно разлагается верховой торф?	107
8.2. О прогнозах ускорения деструкции торфа в связи с глобальным изменением климата	109
8.3. Экологические функции микробных комплексов торфяников	110
9. Литература	114

Погодные условия оказывали значительное влияние на структуру бактериальных сообществ торфяников. Так, если в жаркий и сухой период в низинном торфянике доминировали целлюлозоразрушающие бактерии (*Cytophaga*, *Mucosoccales*, *Streptomyces*), то после длительных дождей — типичные гидробионты, представленные бактериями родов *Aquaspirillum*, *Comamonas* и *Alcaligenes*. Миксобактерии и цитофаги выделялись в качестве минорных компонентов или субдоминантов (Добровольская и др., 2012).

Влияние длительной жары (лето 2010 г.) на таксономическую структуру исследуемого сапротрофного блока бактерий проявилось как в общем снижении бактериального разнообразия, так и в смене доминантов. Доминировавшие прежде аэробные протеобактерии были замещены энтеробактериями, предпочитающими рост при более высоких температурах. В низинном торфянике их доля составила в разных слоях от 55 до 100%. При посеве из верхового торфяника после жаркого лета чашки оказались стерильными. Бактерии удалось выделить лишь после запуска сукцессии с увлажнением почвы. При этом вначале на чашках выросли только энтеробактерии, представленные видом *Rahnella aquatilis* (видовая принадлежность бактерий была определена на основе секвенирования рДНК). Их доля на протяжении сукцессии (30 суток) не опускалась ниже 20% (Кухаренко и др., 2011). Представители вида *Rahnella aquatilis* — типичные для водных сред энтеробактерии. Следует отметить, что выявление именно этих энтеробактерий из верхового торфяника не является случайным, представители рода *Rahnella* выделялись из сфагновых мхов и другими исследователями. Было показано, что разные виды бактерий рода *Rahnella*, в том числе и *Rahnella aquatilis*, ассоциированы со мхами *Sphagnum fallax* и *Sphagnum magellanicum* (Opelt et al., 2007).

Результаты экспериментов показали, что как дождливая погода, так и сильная засуха и жара оказывают значительное влияние на состояние бактерий в обоих типах торфяников. При повышенной влажности стираются те контрастные различия в таксономической структуре прокариот, которые характерны для верховых и низинных торфяников (Добровольская и др., 2005). Высокие температуры и недостаточное увлажнение в результате засухи и жары оказывают стресс на бактерии торфяников, приводя к серьезной перестройке в таксономической структуре прокариотных комплексов. На основе полученных данных можно сделать вывод о меньшей устойчивости бактериального сообщества верховых торфов, чем низинных, к экстремальной засухе и жаре, что нужно учитывать в дальнейших расчетах последствий глобального изменения климата.

6.6. Физиологическое состояние и жизнеспособность бактерий

6.6.1. Кинетический метод определения физиологического состояния бактерий *in situ*

Высокая численность бактерий, зарегистрированная нами в исследуемых торфяниках, не позволяет судить о том, в каком физиологическом состоянии находятся там бактерии. Для ответа на этот важнейший вопрос мы провели определение метаболической активности новым кинетическим методом определения физиологического состояния бактерий *in situ* (в торфах) (Якушев, 2012).

Используемый в методе подход основан на представлении о физиологическом состоянии как о кинетической величине, определяемой из данных по начальному периоду роста бактерий на питательных средах (лаг-фаза и фаза экспоненциального роста). Суть метода заключается в математической обработке кривых роста смешанных самопроизвольных бактериальных культур, внесённых в виде водной суспензии торфа в жидкие питательные среды. Рост на питательных средах определяется в режиме реального времени по изменению оптической плотности (при 620 нм) на имунноферментном анализаторе Sunrise фирмы Tecan, помещенном для стандартизации температуры (25 °C) в климатическую камеру Binder. В качестве питательных сред могут быть применены самые различные жидкие микробиологические среды. В работе использовались среды: жидкая глюкозо-пептонно-дрожжевая среда; среда с биополимерами животного и растительного происхождения: пектином, хитином, карбоксиметилцеллюлозой, крахмалом, ксиланом, казеином; мономерами, входящими в полимеры: глюкоза, ксилоза; ароматические соединения: фенилаланин, коричная кислота; поверхностноактивные вещества: твин-20; среда без азота с маннитом (Среда Эшби) для оценки способности к азотфиксации; продукты брожения: ацетат. Среды раскапываются по 200 мкл в специальные 96-луночные культуральные планшеты. Для смешанных бактериальных популяций, по кривым роста на питательных средах рассчитывается параметр r_0 — начальное значение переменной физиологического состояния, т.е. активность бактерий в торфах. Одновременно определяли μ_m — максимальную удельную скорость роста бактерий на той или иной питательной среде (зависит от качественного состава бактериального комплекса и условий культивирования). Эти параметры связаны со временем лаг-фазы ($t_{\text{лаг}}$) уравнением вида:

$$t_{\text{лаг}} = \frac{\ln\left(\frac{1}{r_0}\right)}{\mu_m} = -\frac{\ln(r_0)}{\mu_m}$$

Поскольку $-\ln(r_0)$ прямопорционально связано со временем лаг-фазы, то целесообразно для дальнейшей работы использовать это выражение, а не r_0 . Чем больше $-\ln(r_0)$, тем дольше лаг-фаза и меньше активность исследуемых бактерий в торфах. Использование $-\ln(r_0)$ предпочтительнее чем $t_{\text{лаг}}$, так как следует из уравнения, что бактериальные популяции, имеющие одинаковое физиологическое состояние r_0 могут иметь различную лаг-фазу из-за различных значений μ_m , поэтому применение $t_{\text{лаг}}$ для характеристики активности микроорганизмов недопустимо.

Объектами исследования служили образцы горизонтов верхового и низинного торфяников, отобранные в Западной Сибири (Томская обл.) и европейской части России (Тверская обл.).

Впервые с помощью нового метода продемонстрировано разное физиологическое состояние бактерий (метаболическая готовность микробов усваивать разные субстраты) в верховых и низинных торфяниках. На большинстве использованных субстратов параметр $-\ln(r_0)$ в верховых торфяниках оказался больше, чем в торфяниках низинных (рис. 10).

Параметр $-\ln(r_0)$ характеризует готовность метаболической системы бактерий к потреблению того или иного субстрата. Меньшая метаболическая актив-

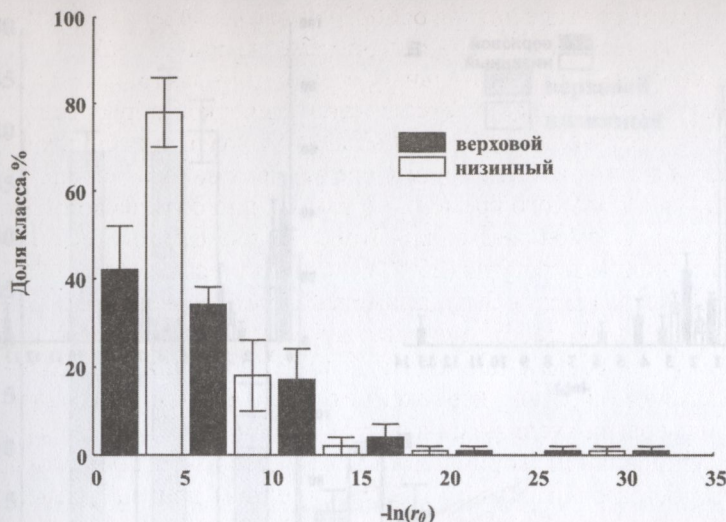


Рис. 10. Ранговое распределение значений отрицательного логарифма начального значения переменной физиологического состояния r_0 в торфяниках разного генезиса (получено из 349 кривых роста на 14 питательных средах для 48 навесок, 8 горизонтов торфов).

ность бактерий объясняет, почему происходит большая консервация органического вещества в верховом торфе, по сравнению с торфом низинным.

Анализ кривых роста, полученных при выращивании бактерий на питательных средах, показал, что значения параметра $-\ln(r_0)$ для прокариотных сообществ олиготрофных и эвтрофных торфяных почв различны. Бактерии низинных торфяников оказываются более готовыми потреблять такие полисахариды, как крахмал и ксилан (рис. 11). Вероятно, эти соединения в большей степени поступают из отмирающих растительных остатков сосудистых растений, чем из сфагнумов.

В свою очередь пектин содержится в большем количестве в верховом торфе. Это приводит к трофической подготовленности бактерий верхового торфяника потреблять пектин, выражающееся в меньшем значении $-\ln(r_0)$. Известно, что в олиготрофных торфяниках наблюдается дефицит азота. В нашем эксперименте сообщества верховых торфяников оказались более активными при росте на среде Эшби. Это не случайно, так как анализ разнообразия азотфиксирующих бактерий в кислой торфяной почве с помощью анализа генов *nifH* показал их высокое разнообразие (Слободова, 2006; Задорина и др., 2009). Ацетат является продуктом брожения и встречается во всех торфяных почвах. Он активно потреблялся в торфяниках обоих типов.

Следует отметить, что для верховых и низинных торфяников Томской и Тверской областей наблюдались одинаковые закономерности. В частности, при сравнении ранговых распределений параметров роста (суммарно для всех питательных сред), значения максимальной удельной скорости роста (μ_m) были выше в эвтрофных торфяных почвах по сравнению с олиготрофными (рис. 12). В верховых торфах доминируют медленно растущие бактерии, не способные к быстрому

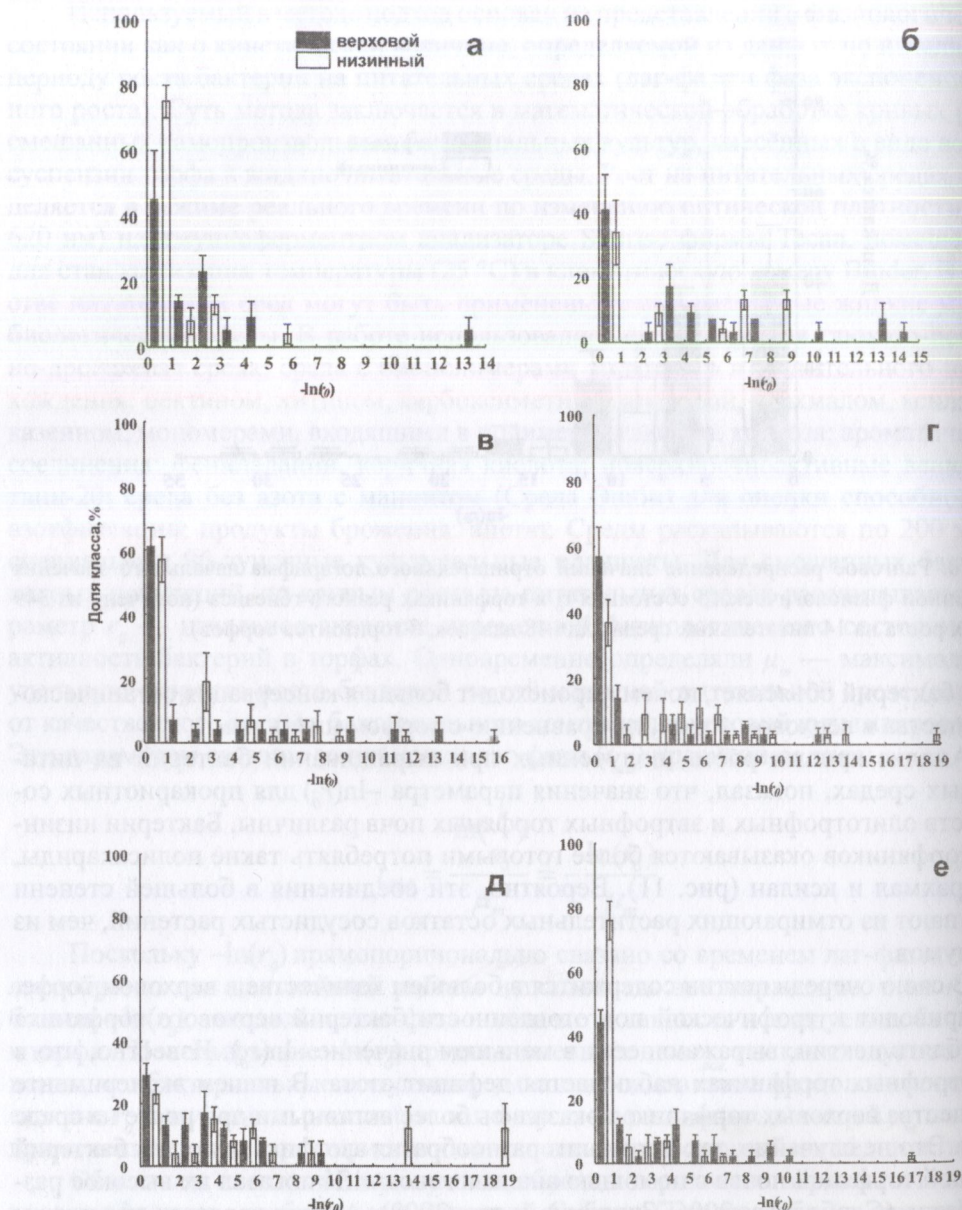


Рис. 11. Отрицательный логарифм начального значения переменной физиологического состояния бактерий в торфяниках разного генезиса для бактериальных популяций, развивающихся на средах: а — крахмалом; б — ксиланом; в — ацетатом; г — среда с маннитом без азота; д — пектином; е — глюкозой.

росту на свежих органических остатках, поступающих при отмирании растений. Следствием этого может являться чисто кинетическая неспособность бактерий к быстрой деструкции отмершей биомассы.

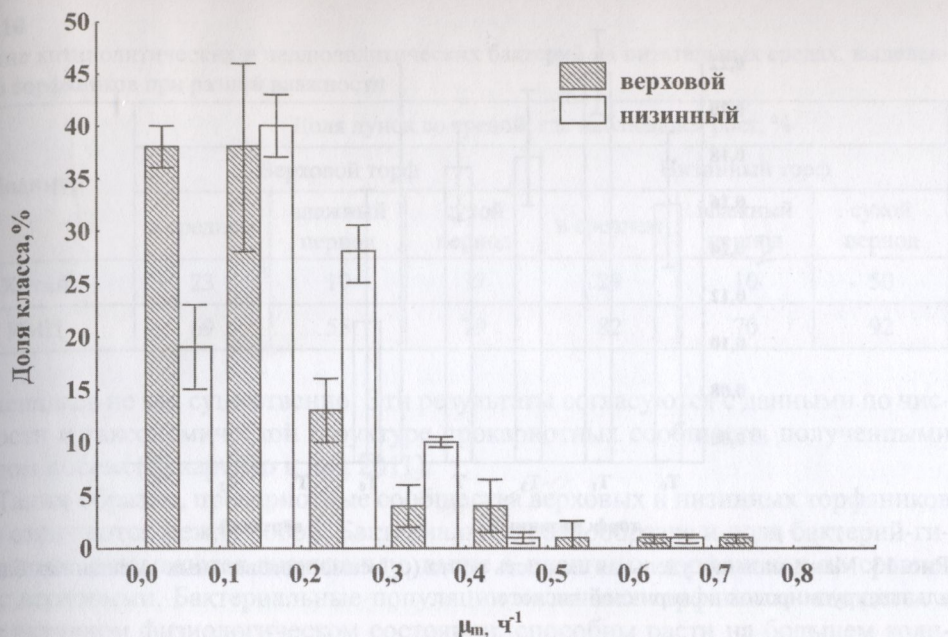


Рис. 12. Ранговое распределение значений максимальной удельной скорости роста в торфяниках разного генезиса (получено из 349 кривых роста для 48 навесок, 8 горизонтов торфов).

Помимо определения физиологического состояния (активности), максимальной удельной скорости роста (преобладающая экологическая стратегия роста в бактериальном комплексе) кинетический метод определения физиологического состояния может, хотя и приблизительно, указать на относительное обилие исследуемых групп бактерий. Это происходит в том случае, когда при выбранном разведении почвенной суспензии (в рассматриваемой работе 1:10) рост наблюдается не во всех лунках с той или иной средой, и по доле лунок, где наблюдался рост, можно судить об обилии бактерий. В этом случае метод представляет собой вариант метода предельных разведений.

В проведенных экспериментах на большинстве органических соединений рост наблюдался всегда. Исключением являлись три субстрата, обилие бактерий способных на них расти, было столь низко в торфах, что даже при разведении 1:10 рост был не во всех лунках. Первое из этой группы соединений — коричная кислота, представляет особый интерес. Эта кислота — ближайший аналог сфагновой кислоты, доминирующей в сфагновых торфах. Будучи бензол-карбоновой кислотой, она является ингибитором прорастания грибных спор, и её накопление может привести к ингибированию грибов — главных деструкторов биополимеров в болотных экосистемах (Breeuwer et al., 1997).

Из 40 образцов различных горизонтов верхового торфяника рост был зафиксирован только в трех образцах (на глубине 0–15 см), что свидетельствует о низкой численности бактерий, способных расти на коричной кислоте, как единственном источнике углерода. Отсутствие бактерий-деструкторов объясняет — почему в верховых торфах происходит накопление бензолкарбоновых кислот. Однако, по-

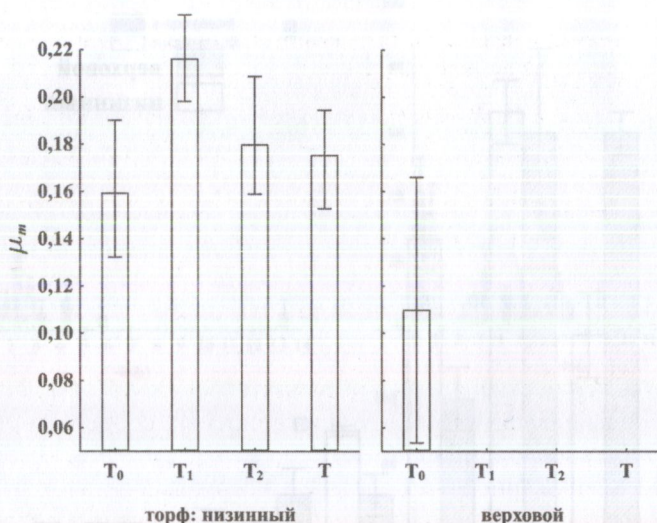


Рис. 13. Максимальная удельная скорость роста (μ_m) самопроизвольных смешанных бактериальных группировок на коричной кислоте.

тенциальная метаболическая активность ($-\ln(r_0)$) потребления коричной кислоты оказалась высокой.

В низинном торфе ситуация противоположная — рост зарегистрирован в 36 образцах из 40. Это свидетельствует о большем обилии бактерий, способных расти на коричной кислоте в низинных торфяниках, чем в верховых. Максимальная удельная скорость роста бактерий на коричной кислоте так же выше в низинных торфах, однако, потенциальная метаболическая активность потреблять коричную кислоту меньше, по сравнению с бактериями верховых торфяников (рис. 13).

Следующие значимые субстраты — это труднодоступные для микробного разложения биополимеры: хитин и целлюлоза (КМЦ-карбоксиметилцеллюлоза). Всего было исследовано 44 образца. Доля лунок с жидкой питательной средой, в которых наблюдался рост хитинолитиков, была в среднем примерно одинаковой для обоих типов исследуемых торфяников (табл. 10). Четкой приуроченности бактерий-хитинолитиков к какому-то горизонту выявить не удалось. Процент лунок, в которых наблюдался рост на среде, содержавшей КМЦ, был значительно выше в низинных торфяных почвах. Это свидетельствует о большем обилии бактерий-целлюлозолитиков в низинных торфах. Падение влажности и повышение температуры воздуха, наблюдавшееся в августе, по сравнению с июлем, привело к значительному увеличению обилия как хитинолитических, так и целлюлозолитических бактерий в исследуемых торфяниках и, как следствие, повысило долю лунок с хитином и КМЦ, на которых наблюдался рост (табл. 10). Активизация деятельности бактерий гидролитического комплекса при уменьшении влажности торфов представляется закономерным явлением, учитывая, что при этом улучшается аэрация.

Было также установлено, что после аномальной жары (лето 2010 г.) в слоях верхового торфяника произошли резкие изменения характера роста и снижение активности бактериальных популяций. В низинном торфянике активность бакте-

Табл. 10

Развитие хитинолитических и целлюлолитических бактерий на питательных средах, выделенных из торфяников при разной влажности

Полимер	Доля лунок со средой, где наблюдался рост, %					
	Верховой торф			Низинный торф		
	в среднем	влажный период	сухой период	в среднем	влажный период	сухой период
Хитин	23	10	37	29	10	50
КМЦ	69	55	79	82	70	92

рий менялась не так существенно. Эти результаты согласуются с данными по численности и таксономической структуре прокариотных сообществ, полученными методом посева (Кухаренко и др., 2011).

Таким образом, прокариотные сообщества верховых и низинных торфяников четко отличаются между собой. Бактериальное разнообразие и доля бактерий-гидролитиков оказываются значительно выше в низинных торфяниках по сравнению с верховыми. Бактериальные популяции низинных торфяников находятся в более активном физиологическом состоянии, способны расти на большем количестве субстратов, и менее подвержены влиянию экстремальных факторов. Все обнаруженные различия могут быть использованы в качестве факторов, позволяющих объяснить замедленную деструкцию торфа в верховых торфяных почвах.

6.6.2. Окрашивание флуоресцентным красителем *live-dead*, наноформы бактерий в верховых торфяниках

Общую численность бактерий, численность и долю наноформ по отношению к общей численности бактерий, потенциальную жизнеспособность бактерий и наноформ бактерий (долю клеток с неповрежденной клеточной мембраной) определяли с помощью флуоресцентного двухкомпонентного красителя L7012 (LIVE/DEAD BacLight bacterial viability kit.) (Molecular Probes., 1994) в соответствии с рекомендациями производителя (Лысак и др., 2009). Применение этого красителя позволяет определить как общую численность бактерий, так и физиологическое состояние клеток. При просмотре препаратов под микроскопом с УФ источником света клетки бактерий с неповрежденными мембранами (интактные, «живые» клетки) окрашены в зеленый цвет, а клетки с поврежденными мембранами — в красный цвет. Окрашенные препараты просматривали под флуоресцентным микроскопом Axioskop 2, (“Carl Zeiss”, Германия) с эпиобъективом 100. При подсчете клеток просматривали не менее 90 полей зрения на образец. Оценивали общую численность бактерий в почве (почвенной суспензии), наноформ (в фильтрате) и долю клеток с неповрежденной и поврежденной клеточной мембраной. Расчеты численности бактерий (наноформ) на 1 г почвы проводили по общепринятой методике, используемой при работе с акридином оранжевым (Методы почвенной микробиологии и биохимии, 1991).

Наноформами бактерий считали бактерии, которые проходят через мембранный ядерный фильтр с отверстиями 0,22 мкм.

других биотопов — обитатели пищевых продуктов, вызывающие их порчу — не были способны к росту при добавлении сфагнана в среду в количестве 3 мг/мл. Ингибирующий эффект был связан с низкой забуференностью среды, которая соответствовала pH 4,3. Было проверено большое количество разных представителей грамположительных и грамотрицательных бактерий, включающих бациллы, стафилококки, энтеробактерии. Все эти бактерии при росте на хорошо забуференных средах с pH 6,5–6,8 не реагировали на внесение сфагнана. Таким образом, ингибирующий эффект сфагнанов проявляется только по отношению к бактериям, не способным расти в кислой среде. Микробицидное действие сфагнана не является специфичным. Добавление в питательную среду рамногалактуронанов, соляной и уксусной кислот оказывает такой же ингибирующий эффект, как и добавление сфагнана (Stalheim et al., 2009).

Исходя из многочисленных данных, как наших, так и зарубежных авторов, в сфагновых болотах обитают представители самых разнообразных таксонов бактерий (табл. 19). Все они способны к росту в широком интервале значений pH, кроме того, многие бактерии находят микролокусы с менее кислой средой. В результате на те бактерии, которые обитают в олиготрофных торфяниках, не должны оказывать ингибирующее влияние те сфагнаны и уроновые кислоты, которые доминируют в этих торфах. Бактерицидное действие проявляется по отношению к тем бактериям, которые занимают другие экониши. Наглядным примером может служить давнишнее использование сфагнума в медицине для подавления роста патогенных бактерий, которые, как правило, не способны к росту при низких значениях pH.

Известно также, что полисахариды из сфагнума проявляют антигрибную активность по отношению к поверхностным дерматофитам, и она оказалась выше, чем у нитрофунгина. В то же время полифенольные фракции показали низкую активность (Юдина и др., 1999).

7.6.2. Сфагнолы

Одной из причин медленного разложения верхового торфа называют токсичность фенольных соединений, накапливающихся в больших количествах в сфагновом торфе. Об антимикробных свойствах сфагнума свидетельствует сохранение в сфагновых болотах тел людей и животных, остатков пищи, которые не подверглись разложению микроорганизмами, хотя пролежали там более 2 тысяч лет. Таких археологических находок, называемых “peat-bog bodies”, обнаружено много: 10 — в Норвегии, 45 — в Финляндии, 55 — в Швеции, 57 — в Англии, 60 — в Ирландии, 418 — в Дании, 602 — в Германии (Painter, 1991). Существуют также сказания о викингах, которые, совершая морские походы, брали с собой именно болотную воду, как наиболее стерильную. Недаром сфагнум использовался и в медицине в качестве антисептического средства при лечении ран, начиная с 1880 г. Большие количества сфагнума были заготовлены во время первой мировой войны и использовались вместо хлопка и лигнина для приготовления бинтов для раненых, так как сфагнум обладает максимальной абсорбционной способностью. Все сведения об истории использования сфагновых мхов в медицине собраны в обзоре белорусских микробиологов (Podterob, Zubets, 2002). В 1899 г. чешский исследователь Чапек выделил из листьев сфагнума специфическое фенолоподобное

Табл. 19

Филогенетическая принадлежность бактерий сфагновых болот по данным метода посева на питательные среды

Название рода	Количество родов	Доля от общего числа родов (%)
<u>Proteobacteria:</u>		
Alpha: <i>Asticcacaulis</i> , <i>Brevundimonas</i> , <i>Caulobacter</i> , <i>Hyphomicrobium</i> , <i>Methylocapsa</i> , <i>Methylocella</i> , <i>Methylocystis</i> , <i>Prosthecomicrobium</i> , <i>Rhodomicrobium</i> , <i>Sphingomonas</i> ;	30	59
Beta: <i>Achromobacter</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Aquaspirillum</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Chromobacterium</i> , <i>Rhodoblastus</i> , <i>Rubrivivax</i> ;		
Gamma: <i>Acinetobacter</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rahnella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Vibrio</i> ;		
Delta: <i>Myxococcus</i> , <i>Corallococcus</i> , <i>Polyagnum</i>		
<u>Actinobacteria:</u>		
<i>Micrococcus</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Rhodococcus</i>	8	15
<u>Bacteroidetes:</u>		
<i>Cytophaga</i> , <i>Sporocytophaga</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Pedobacter</i> , <i>Chryseobacterium</i> , <i>Mucilaginibacter</i> , <i>Chitinophaga</i>	7	14
<u>Acidobacteria:</u>		
<i>Terriglobus</i>	1	2
<u>Planctomycetes:</u>		
<i>Schlesneria</i> , <i>Singulisphaera</i>	2	4
<u>Firmicutes:</u>		
<i>Bacillus</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Clostridium</i>	3	6
Итого:	51	100

антисептическое вещество, названное впоследствии сфагнолом. Сфагнол хорошо растворим в воде, спиртовых и щелочных растворах. Сфагнол — это смесь ароматических кислот, среди которых доминирует сфагновая кислота. В настоящее время установлена формула сфагновой кислоты — это гидроксикарбоксиметил-коричная кислота — $C_{11}H_{10}O_5$. Она обнаружена у 30 видов сфагнума. Изучен её метаболизм в клеточных стенках бриофитов (Rudolph, Samland, 1985). Было показано, что все производные коричной кислоты находятся в сфагнуме в растворимой форме. Культивирование видов сфагнума в биореакторе при соблюдении стерильности привело к дальнейшему увеличению растворимой доли всех анализируемых фенолов и уменьшению части фенолов, связанных с клеточными стенками сфагнума. Кроме сфагновой кислоты были выделены этиловый эфир коричной кислоты, р-гидроксibenзойная кислота, р-кумаровая кислота (Rasmussen et al., 1995). В другой работе (Opelt et al., 2007) в качестве характерных метаболитов

сфагновых мхов называют галловую кислоту, хлорогенную, сфагновую (коричную), катехин, рутин-гликозиды и флавоноиды.

Биологическая активность водно-этанольных экстрактов сфагнума проверялась как на бактериях, так и на грибах. Сфагновые экстракты проявили бактерицидные свойства по отношению к стафилококкам, стрептококкам, дифтероидам. Впоследствии была обнаружена антигрибная активность водных экстрактов у 14 видов сфагнума. При этом было установлено, что наибольшей антифунгальной активностью обладает вид *S. fuscum* (Бабешина, 2002). Ингибирующий эффект был максимальным, когда использовали водные экстракты, полученные при температуре 100 °С. В результате изучения антибактериального действия этих экстрактов по отношению к *Staphylococcus aureus* и другим бактериям, вызывающим интоксикацию продуктов, было показано, что минимальная ингибирующая концентрация четырех типов экстрактов составляет более 2,5 мг/мл, а сфагновой (коричной) кислоты — более 5 мг/мл. Эти концентрации значительно выше тех, которые обнаружены в листьях сфагнума (Mellegard et al., 2009). Авторы делают вывод, что фенолы из сфагнума в их естественных концентрациях не оказывают ингибирующего влияния на бактерии. С другой стороны, возможно практическое применение сфагновых экстрактов в высоких концентрациях в качестве веществ, ингибирующих патогенные бактерии.

Антибактериальной активностью обладали и флавоноиды, изолированные из мхов. Они оказывали бактерицидное действие на культуры *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes* и *Pseudomonas aeruginosa*. Минимальная бактериостатическая концентрация составила 4 мкг/мл. Антибактериальный спектр определялся грамотрицательными бактериями, вызывающими оппортунистические инфекции (Mellegard et al., 2009). Недаром бриофиты лишены паразитических микроорганизмов. Фунгицидная активность водно-этанольных вытяжек из сфагнума была выявлена белорусским исследователем по отношению к плесневым грибам, обитающим на поверхности зерна (Khrpovich, 2009). Ингибирующее воздействие на дрожжевые грибы оказала ванильная кислота, выделенная из сфагнума. Подавлялся рост следующих видов дрожжевых грибов — *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Z. rouxii* (Kaellman, 1994).

Таким образом, анализ разных фракций экстрактов из сфагнума позволил выявить, что наибольшим бактерицидным и фунгицидным эффектом обладают фенольные соединения, представленные различными ароматическими кислотами, спиртами, флавоноидами. Естественно, что все эти исследования связаны с поиском практического использования сфагнума и его экстрактов в медицине и пищевой промышленности.

Однако не менее важным представляется вопрос об экологической значимости антимикробных свойств сфагнума в плане решения глобального вопроса — почему так медленно разлагается сфагновый мох, и как повлияет изменение климата на этот процесс. В связи с этим следует переключиться на изучение совсем другого спектра микроорганизмов, по сравнению с тем, который был выбран в медицинских исследованиях. Необходимо выявить и сравнить чувствительность и устойчивость к воздействию сфагновых экстрактов микроорганизмов, с одной стороны — типичных для сфагновых болот, с другой стороны — выделенных из других природных биотопов и практически не выделяющихся из сфагнового торфа.

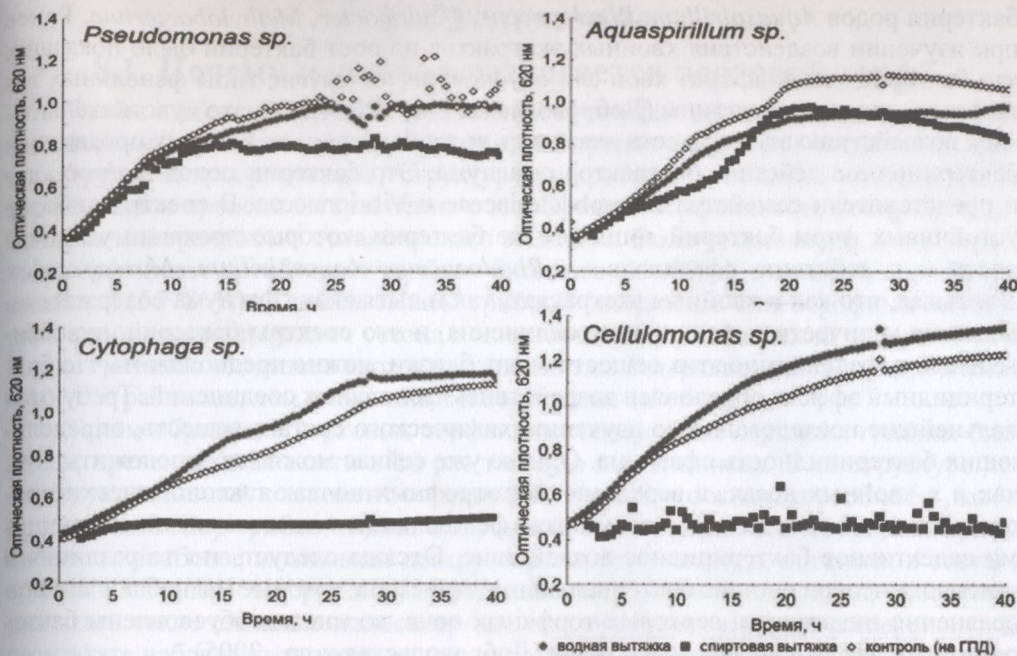


Рис. 21. Влияние сфагновых экстрактов (концентрация 1 : 2) на рост бактерий.

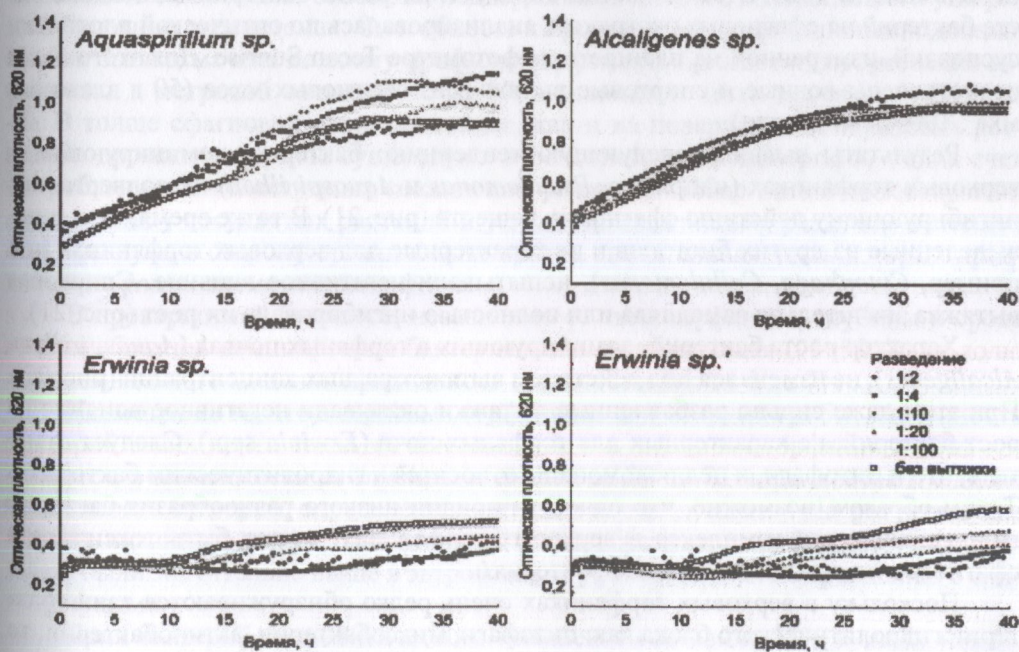


Рис. 22. Влияние разных концентраций сфагновых экстрактов на рост бактерий.

бактерии родов *Aquaspirillum*, *Rhodococcus*, *Caulobacter*, *Methylobacterium*. Ранее при изучении воздействия хвойных экстрактов на рост бактерий было показано, что бактерицидный эффект хвои ели обуславливают другие типы фенольных веществ — проантоцианидины (Добровольская и др., 2004). Однако чувствительными к воздействию этих веществ оказались те же бактерии, на которых проявилось бактерицидное действие экстрактов сфагноума. Это бактерии родов *Arthrobacter* и представители семейства *Enterobacteriaceae* и *Vibrionaceae*. В спектр наиболее устойчивых форм бактерий вошли те же бактерии, которые проявили устойчивость и к действию сфагнолов — *Rhodococcus*, *Aquaspirillum*, *Myxococcales*. Учитывая, что как в хвойных экстрактах, так и вытяжках сфагноума содержатся в больших количествах фенольные соединения, и что спектры бактерий, чувствительных к воздействию этих веществ очень близки, можно предположить что бактерицидный эффект обусловлен воздействием фенольных соединений. Требуются дальнейшие исследования по изучению химического состава веществ, определяющих бактерицидность сфагноума. Однако уже сейчас можно предположить, что, как и в хвойных лесах, в верховых олиготрофных почвах таксономический состав бактерий определяется во многом фенольными веществами, оказывающими селективное бактерицидное воздействие. Отсюда следует, что те различия в таксономическом составе бактериальных комплексов, которые мы наблюдали при сравнении низинных и верховых торфяных почв, во многом обусловлены бактерицидным эффектом сфагновых мхов (Добровольская и др., 2005).

Для проверки действия сфагновых экстрактов на рост бактерий нами был использован и кинетический метод определения роста бактерий. Динамика роста бактерий на сфагновых экстрактах анализировалась по оптической плотности суспензий, измеренной на планшетном фотометре Tecan Sunrise. Для этого были приготовлены водные и спиртовые вытяжки из сфагновых мхов (50 г влажного мха : 100 мл жидкости).

Результаты выявили следующую тенденцию: бактерии, доминирующие в верховых торфяниках (например, *Pseudomonas* и *Aquaspirillum*) не подвергались ингибирующему действию сфагновых веществ (рис. 21). В то же время, бактерии, выделенные из других биотопов и не характерные для верховых торфяников (например, *Cytophaga*, *Cellulomonas*), испытывали негативное влияние. Спиртовая вытяжка значительно замедляла или полностью ингибировала их рост (рис. 21).

Характер роста бактерий, доминирующих в торфяных почвах (*Aquaspirillum*, *Alcaligenes*), не изменялся под действием вытяжек разных концентраций (рис. 22). При этом даже сильно разбавленные вытяжки оказывали негативное влияние на рост бактерий, не характерных для торфяных почв (*Erwinia* spp.). Следует отметить, что и цитофаги, и целлюломонады относятся к гидролитическим бактериям. Таким образом, возможно, что одной из причин низкого разнообразия бактерий гидролитического комплекса в верховых торфяниках, может быть токсичность сфагнолов по отношению к этим бактериям.

Поскольку в верховых торфяниках очень редко обнаруживаются такие бактерии гидролитического блока как: цитофаги, миксобактерии, актинобактерии, то возникает вопрос: «Может быть, их нет в сфагнуме потому, что они чувствительны к воздействию сфагнолов?» Для ответа на этот вопрос требуются дополнительные исследования.