

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
МЕЖДУНАРОДНЫЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМ.А.Д.САХАРОВА

УДК 579.871 + 574.34

Жебрак Инна Степановна

**ДИНАМИКА ПОПУЛЯЦИИ
CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM
В ПОЧВЕ, РИЗОСФЕРЕ И РИЗОПЛАНЕ**

03 00 16 экология
03.00.07 микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Минск – 2003

Работа выполнена на кафедре экологии Гродненского государственного университета им. Янки Купала и на кафедре биологии почв Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Научные руководители:

доктор ветеринарных наук, профессор кафедры экологии Гродненского государственного университета им. Я. Купалы **Кремлев Е.П.**

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры биологии почв Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова **Кожевни П.А.**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор кафедры лесных ресурсов и почвоведения Белорусского государственного технологического университета **Ефремов А.Л.**

кандидат медицинских наук, доцент, зав. кафедры иммунологии Международного государственного университета им. А.Д. Сахарова **Зафранская М.М.**

Оппонирующая организация:

Институт микробиологии НАН Беларуси

Защита состоится «10» апреля 2003 г. в «14⁰⁰» часов на заседании Совета по защите диссертаций К 02 28.01 в Международном экологическом университете им. А.Д. Сахарова по адресу: 220009 г. Минск, ул. Долгобродская, 23.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Я. Колоса НАН Беларуси.

Автореферат разослан «9» марта 2003 г.

Ученый секретарь Совета
по защите диссертаций



И.И. Саванович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Необходимость восстановления природных экосистем, сохранение их биологического разнообразия на уровне, гарантирующем стабильность окружающей среды, ставит перед наукой новые задачи с целью обеспечения неотложных приемов, направленных на защиту природы от загрязнения. Среди них - изучение динамики популяций конкретных видов и штаммов микроорганизмов непосредственно в природных местообитаниях с определением экологической приспособленности, механизмов регуляции численности объекта и вероятных последствий интродукции в связи с проблемой как плановой, так и несанкционированной интродукции микробных популяций - отходов микробиологических производств. Особый интерес в этом отношении представляет микробиологическое производство аминокислот, имеющих большое значение для сбалансированного питания животных и человека.

В Беларуси промышленное производство аминокислот налажено в г. п. Оболе (выпускают кормовой лизин), г. Скиделе (выпускают лейцин, изолейцин, валин, планируется выпуск лизина). Одним из продуцентов лизина при его микробиологическом синтезе является *Corynebacterium glutamicum*. Отходы производства лизина могут быть источником загрязнения окружающей среды, что делает необходимым изучение выживаемости *Corynebacterium glutamicum* в природных местообитаниях как для оценки риска его попадания в окружающую среду, так и с целью определения возможности утилизации отходов производства в виде отработанной биомассы в качестве бактериального удобрения, стимулирующего развитие растений и их урожай.

Цель и задачи исследования. Цель работы - изучение выживаемости популяции штамма *Corynebacterium glutamicum* 22 LD, продуцента лизина в системе «почва-корни растений». В задачи проводимого исследования входило

- 1 Изучение особенностей динамики популяции *Corynebacterium glutamicum* в почве, ризосфере и ризоплане растений.
- 2 Определение экологической стратегии популяции *Corynebacterium glutamicum* в почве и физиологического состояния бактериальных клеток в природных местообитаниях.
- 3 Установление влияния инокулируемой популяции на изменение структуры почвенного микробного сообщества.
- 4 Выявление влияния вносимой биомассы *Corynebacterium glutamicum* на начальные этапы развития культурных растений.

Объект и предмет исследования. Объектом исследования является штамм бактерий *Corynebacterium glutamicum* 22 LD, промышленный продуцент лизина.

Предмет исследования - динамика и стратегия популяции *Corynebacterium glutamicum* в почве и воде, влияние популяции на почвенный микробный комплекс и на рост растений, состояние исследуемых бактерий в природных местообитаниях.

Гипотеза. Выживаемость *Corynebacterium glutamicum* в природных местообитаниях может определяться на основе анализа динамики численности популяции и относительной экологической стратегии, а также методом мультисубстратного тестирования.

Методология и методы проведения исследования. Исследования базировались на модельных опытах по внесению *Corynebacterium glutamicum* в лабораторные микрокосмы и *in situ* с определением динамики и стратегии инкулированной популяции согласно концепциям, разработанным на кафедре биологии почвы МГУ им. М.В. Ломоносова Д.Г. Звягинцевым и П.А. Кожвиным. Выполнение поставленных задач основывалось на сочетании традиционных методов и новой методики мультисубстратного тестирования с использованием системы «ЭКОЛОГ». Результаты обрабатывались статистически.

Научная новизна полученных результатов.

Изучена популяционная динамика и выживаемость *Corynebacterium glutamicum* – промышленного продуцента лизина в модельных и природных экосистемах – проведено детальное исследование интродукции *Corynebacterium glutamicum* и установлена неизбежная гибель объекта исследований в почвенной и водной среде, – показано влияние а) уровня внесения бактерий, б) физико-химических свойств почвы, в) состояния почвенной микробной системы, г) биогенности почвы, д) энергетических источников углерода и азота на сохранность и выживаемость *Corynebacterium glutamicum*, – установлен достоверный стимулирующий эффект *Corynebacterium glutamicum* на развитие проростков кресс-салата (*Lepidium sativum* L.), редиса (*Raphanus sativus* L. var *radicula*) и люпина желтого (*Lupinus luteus* L.), что свидетельствует о принципиальной возможности утилизации отработанной биомассы и разработки способа приготовления бактериального удобрения с исследуемой популяцией; – впервые новым методом мультисубстратного тестирования выявлено влияние популяции *Corynebacterium glutamicum* на почвенную микробиоту: внедрение инородной популяции в структуру микробного сообщества, а также установлен период элиминации этой культуры и возвращение бактериального комплекса к исходному состоянию.

Практическое значение полученных результатов. Результаты исследований позволяют обосновать степень экологического риска в случае аварийного поступления промышленного продуцента аминокислот *Corynebacterium glutamicum* в окружающую среду на действующих микробиологических предприятиях. Показана принципиальная возможность использования отходов производства аминокислот содержащих *Corynebacterium glutamicum* в качестве бактериального удобрения, стимулирующего развитие растений на ранних стадиях их онтогенеза, что позволяет решать проблему утилизации отходов.

Результаты исследования используются в лекционных курсах «Микробиология» и «Почвоведение», а также спецкурсе «Биология почвы» на факультете биологии и экологии Гродненского государственного университета.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

- доказана неизбежная гибель примерно в течение месяца популяции *Corynebacterium glutamicum* в почве, ризосфере, ризоплане и водной среде

что позволяет обосновать степень экологического риска в случае аварийного поступления промышленного продуцента лизина в окружающую среду на действующих микробиологических предприятиях.

- определено, что клетки *Corynebacterium glutamicum* сохраняют высокую активность как в почве, так и в воде; опыты в условиях голодания характеризуют стратегию объекта как популяцию с большими затратами на поддержание метаболизма, неспособную переходить в покоящееся состояние в условиях олиготрофного местообитания; по характеру кривой динамики численности *Corynebacterium glutamicum* установлено, что вносимая популяция является относительно К-стратегом;

- новым методом мультисубстратного тестирования выявлено изменение в структуре почвенного микробного сообщества при внесении в него *Corynebacterium glutamicum*, а также период элиминации этой культуры и возвращение почвенного микробного комплекса к исходному состоянию;

- установлен достоверный стимулирующий эффект биомассы *Corynebacterium glutamicum* на растения кресс-салата (*Lepidium sativum* L.), редиса (*Raphanus sativus* L. var *radicula*) и люпина желтого (*Lupinus luteus* L.) в ранние стадии их развития.

Личный вклад соискателя. Выбор условий эксперимента, получение экспериментальных данных, анализ и интерпретация полученных результатов проведены при решающем участии автора. Повторность вариантов опытов 4-х и 5-и кратная. Некоторые опыты проводились два раза.

Автор выражает глубокую признательность д.в.н. Крэмлеву Е.П., д.б.н. Кожевину П.А., к.б.н. Скоробогатовой Р.А. за консультации и помощь в работе.

Апробация результатов диссертации. Результаты диссертационной работы докладывались на научно-практической конференции РБ «Устойчивость производственной среды в условиях техногенеза» (г. Минск, 27-28 мая 1997), на первой международной научно-практической конференции «Экология и молодежь» (г. Гомель, 17-19 мая 1998), на международной конференции «Проблемы микробиологии и биотехнологии» (г. Минск, 25-27 ноября 1998), на третьей международной научно-практической конференции «Наука – производству» (г. Гродно, июнь 1999), на международной конференции молодых ученых «Экологические проблемы 21 века» (г. Минск, 1-2 ноября 2000), на кафедре экологии и методики преподавания биологии в БГУ (г. Минск, декабрь 2000), на международной конференции ведущих специалистов, молодых ученых и студентов «Сахаровские чтения 2002 года: экологические проблемы XXI века» (г. Минск 17-21 мая 2002).

Опубликованность результатов. По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ. Их них: 3 статьи и 12 материалов и тезисов докладов конференций.

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, экспериментальной части, заключения, списка цитируемой литературы, приложения. Работа изложена на 131 странице, иллюстрирована 17 рисунками, включает 38 таблиц. Список литературы состоит из 282 источников, в том числе – 176 на иностранных языках, приложение занимает 9 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объектом нашего исследования являлась культура *Corynebacterium glutamicum* 22LD – промышленный продуцент лизина

Для внесения в почву культуру *Corynebacterium glutamicum* выращивали на мясо-пептонном бульоне с последующим центрифугированием (5000 об./мин) и отмыванием биомассы от питательной среды. Основные эксперименты проводили в лабораторных микрокосмах с образцами пахотного горизонта окультуренной дерново-подзолистой почвы (Гродненского района) при давлении почвенной влаги примерно – 0,005 МПа и температуре около 20°C. Исходный уровень внесения *C. glutamicum* в почву определяли методом посева бактериальной суспензии на твердую питательную среду мясо-пептонный агар (МПА). Во всех экспериментах предусматривалась одновременная интродукция на разных уровнях начальной популяционной плотности. В качестве контроля использовали образцы без внесения популяции. Выявление и количественный учет внесенной популяции в почве проводили с помощью посева на МПА. Культура *C. glutamicum* идентифицировалась по характерной ярко-желтой окраске её колоний и микроскопически. В экспериментах с растениями использовали кресс-салат (*Lepidium sativum* L.), редис сорт «Алекс» (*Raphanus sativus* L. var. *radicula*) и люпин желтый (*Lupinus luteus* L.) сорт «Старт». Биомасса бактерий вносилась в почву одновременно с посевом семян исследуемых растений.

Предварительная обработка почвенной суспензии (1:100) проводилась растиранием в стерильной ступке пестиком с резиновым наконечником и встряхиванием на качалке (200 об./мин, 10 мин), в некоторых случаях с помощью ультразвука (режим работы №5, 2 мин) (Звягинцев, 1987). Дифференциация зон ризосферы и ризопланы имеет операционный характер: слой почвы на расстоянии до 3 мм от корня, смытый с корней в колбе со стерильной водой (200 об./мин, 3 мин) считали ризосферой, а корни после механического удаления ризосферы — образцом ризопланы.

При изучении выживаемости *C. glutamicum* в почве различных биоценозов г. Скиделя (место застройки завода по выпуску аминокислот) использовали образцы четырех учетных площадок: 1) дуг суходольный; 2) пашня; 3) дуг низинный; 4) сосняк разнотравный (табл. 1).

В одном из экспериментов популяцию вносили в почвенные образцы одновременно с питательным субстратом (0,1% глюкозы или 0,1% пептона от массы воздушно-сухой почвы). Сукцессию почвенных микроорганизмов инициировали увлажнением сухих образцов почвы до 60% от общей влагосмкости. Образцы инкубировали определенное время (0, 7, 23 суток) при 20°C, так что в момент внесения популяции и посева семян они представляли различные этапы сукцессии почвенных микроорганизмов (Кожевин, 1989). Вносилась также живая и убитая биомасса *C. glutamicum* на разных уровнях в стерильную и нестерильную почву.

Таблица 1

Физико-химические свойства почв различных биоценозов г.Скиделя

№ образца почвы	pH	Сумма обменных оснований, мг/экв на 100 г почвы	P ₂ O ₅ , мг / 100 г почвы	K ₂ O, мг / 100 г почвы	Физическая глина, % (< 0,01)	Гумус, %
1	6,8	46.7	26	35.4	17,89	5,95
2	7,2	26.4	26	53.0	18,86	1,48
3	3,7	1,9	2,2	11,7	15,22	3,21
4	3,2	0.6	5	11,2	12,74	2,21

В полевых условиях интродукцию популяции *C. glutamicum* проводили в 1998 г на базе опытного поля Гродненского аграрного университета. Были заложены мелко-деляночные опыты. Суспензию бактерий вносили в почву одновременно с посевом семян люпина желтого.

Для определения способности популяции к выживанию в условиях голодания суспензию клеток *C. glutamicum* вносили в стерильные и нестерильные пробы водопроводной, дистиллированной, прудовой и речной воды, которые инкубировали при 4° и 25° С.

Количественный учет микроорганизмов производили методами посева на плотную питательную среду МПА (Методы почвенной микробиологии и биохимии 1991). Для функциональной характеристики объектов использовали метод мультисубстратного тестирования (Горленко, Кожевин, 1994; Gorlenko et al., 1997) по сокращенной схеме (Кожевина и др., 1995). Индекс активной биомассы определяли методом гидролиза диацетата флуоресцина (ФДА) (Кожевина и др., 1995). Расчет показателей вероятностного состояния клеток *C. glutamicum* осуществлялся по расписанию появления колоний на МПА (Кожевин, 1989; Suwa, Hattori, 1987) Активность каталазы определяли газометрическим методом (Методы почвенной микробиологии и биохимии, 1991).

Статистическая обработка результатов проведена с использованием пакетов программ EXCEL, STATEX, STATISTICA, Harvard Graphics.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ДИНАМИКА ПОПУЛЯЦИИ *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* В РАЗЛИЧНЫХ ПОЧВАХ

Исследование динамики популяции *C. glutamicum* проводили в модельном опыте с внесением бактерий на уровне 10^9 кл / г в почву 4-х биоценозов г Скиделя: 1) луг суходольный; 2) пашня; 3) луг низинный; 4) сосняк разнотравный.

Выживаемость исследуемых бактерий зависит от физико-химических свойств почвы (табл 1) Сразу после внесения популяции *C. glutamicum* в почву во всех вариантах опыта наблюдалось снижение популяционной плотности бактерий и их гибель. В почве учетных площадок №3 и №4 (луг низинный, сосняк разнотравный, соответственно) *C. glutamicum* была обнаружена только в момент внесения и не фиксировалась на 4 сутки Плохая выживаемость бактерий в почве низинного луга и сосняка разнотравного скорее всего связано с низкими значениями рН (рН равна 3,7 и 3,2, соответственно). В вариантах с интродукцией *C. glutamicum* в почву учетной площадки №1 (луг суходольный) бактерии не обнаруживались на 14-е сутки. При внесении бактерий в почву учетной площадки № 2 (пашня) исследуемая популяция сохранялась наиболее длительное время и погибала на 30-е сутки. что, по-видимому, объясняется более благоприятным рН (рН 7,2), высоким содержанием подвижных форм фосфора и калия, большим содержанием физической глины и других мелких фракций, которые адсорбируют бактериальные клетки на своей поверхности.

Популяция *C. glutamicum* также вносились в дерново-подзолистую почву на двух исходных уровнях – 10^9 кл / г (высокий уровень) и 10^7 кл / г почвы (низкий уровень) – на 3-х стадиях микробной сукцессии (0, 7, 23 сутки увлажнения) Установили, что скорость гибели бактерий определялась в основном уровнем внесения, а динамика плотности популяции незначительно зависела от состояния почвенной микробной системы в момент инокуляции

Во всех вариантах опыта с высоким уровнем внесения (10^9 кл / г) плотность популяции уменьшалась и на 35 сутки *C. glutamicum* не обнаруживалась. В случае более низкой начальной плотности *C. glutamicum* гибель бактерий зафиксирована раньше, на 14 сутки после их внесения. Кроме того, наиболее благоприятными для *C. glutamicum* являлись условия, складывающиеся на поздних стадиях сукцессии почвенных микроорганизмов

Типичная динамика *C. glutamicum* представлена на рис 1 Характер кривой динамики численности *C. glutamicum* указывает на то, что вносимая популяция является относительным К-стратегом, так как отсутствуют флуктуации, численность исследуемой популяции снижается постепенно

Популяцию *C. glutamicum* вносили также в почвенные образцы одновременно с питательным субстратом – глюкозой или пептоном В эксперименте предусматривали несколько вариантов опытов, включая внесение биомассы на разных этапах сукцессии – через 0, 7, 20 суток после запуска

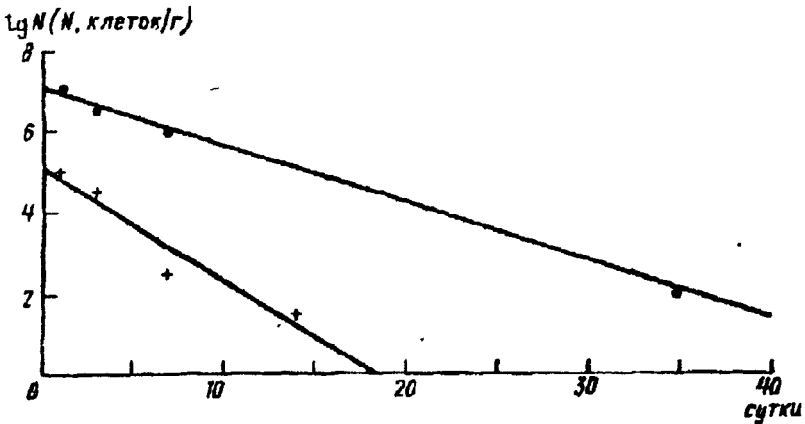


Рис. 1 Динамика численности популяции в дерново-подзолистой почве с разным уровнем внесения *Corynebacterium glutamicum*

сукцессии увлажнением. Динамика численности популяции *C. glutamicum* после внесения в почву характеризовалась явной тенденцией к снижению во всех вариантах. Наихудшие условия для выживания характерны для контроля без внесения дополнительных субстратов, где популяцию не удалось выявить через 21 день после интродукции. Питательные субстраты продлевали время жизни популяции на 7-15 дней, причём положительный эффект от глюкозы в этих условиях превышал таковой от пептона. Эффект при добавлении питательных субстратов при прочих равных условиях определяется и стадией микробной сукцессии в почве.

Интродукция *C. glutamicum* в стерильную и нестерильную почву на высоком (10^8 КОЕ/г) и низком (10^7 КОЕ/г) уровнях показала, что в нестерильной почве внесенная популяция погибала на 28-ые сутки, а в стерильной почве выживаемость *C. glutamicum* увеличивалась в 2 раза, и не обнаруживалась только на 60-ые сутки. Поскольку в нестерильной почве скорость гибели была выше, чем в стерильных образцах, можно предположить, что на выживаемость популяции *C. glutamicum* оказывает влияние комплекс почвенных микроорганизмов. Таким образом, штамм *Corynebacterium glutamicum* 22 LD плохо приспособлен к почвенным условиям и быстро погибает. Во всех экспериментах сразу же после интродукции его в почву наблюдалось неуклонное снижение популяционной плотности.

Установлено, что после внесения в почву *C. glutamicum* общее микробное число увеличивалось за счет внесенных бактерий, но по истечении месяца этот показатель был сравним с контролем. Дисперсионный анализ равномерного двухфакторного комплекса по изучению влияния уровня внесения *C. glutamicum* в почву и времени исследования почвенных образцов после

внесения бактерий на численность почвенных бактерий показала, что уровень внесения *C. glutamicum* в почву не оказывал существенного влияния на динамику численности почвенной микрофлоры.

В почве с интродукцией бактерий отмечены более высокие показатели индекса активной биомассы. Средний показатель гидролиза ФДА (величина D) в вариантах с высоким уровнем внесения составлял 0,601, с низким – 0,538, в контроле – 0,469. Следует отметить, что показатели гидролиза ФДА снижались к концу эксперимента и были сравнимы с контрольными.

В момент интродукции популяции *C. glutamicum* (10^9 кл./г) в нестерильную почву наблюдалась более высокая активность каталазы (8,5 мл O_2 /г почвы) по сравнению с контролем без внесения (2,6 мл O_2 /г почвы). К концу эксперимента в вариантах с инокуляцией бактерий активность каталазы снижалась. Таким образом, почвенный микробный комплекс определенным образом реагировал на внесение чужеродной популяции, что проявлялось в увеличении показателей активности каталазы, индекса гидролиза ФДА. Примерно через месяц эти показатели практически не отличались от контроля, что указывает на восстановление почвенного микробного комплекса по мере отмирания чужеродной популяции.

ИНТРОДУКЦИЯ *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* В ПОЛЕВЫХ ОПЫТАХ

В ходе полевых опытов нами изучалась выживаемость популяции *C. glutamicum* в почве, удаленной от растений, ризосфере и ризоплане люпина желтого (*Lupinus luteus* L.). Эксперимент проводили в условиях мелкоделяночного опыта на опытном поле Гродненского аграрного университета.

Динамика популяции *C. glutamicum* после внесения в почву характеризовалась явной тенденцией к снижению численности. В ризосфере (прикорневая почва) и в почве, удаленной от корней, на 10-е сутки эксперимента численность популяции *C. glutamicum* была равна 10^4 кл/г, а в ризоплане (бактерии на корнях) этот показатель составил 10^3 кл/г корней. На 17-е сутки после посадки семян люпина в почве, ризосфере и ризоплане внесенная популяция не была выявлена.

Для оценки влияния *C. glutamicum* на рост растений была проведена посадка семян люпина желтого в почву вместе с внесением исследуемой популяции. Интродукция *C. glutamicum* ускоряла прорастание семян в среднем на 12,5% и на 12% увеличивала биомассу проростков люпина желтого по сравнению с контролем. По всей видимости, наблюдаемый эффект определяется физиологически активными веществами, которые синтезируются *C. glutamicum*, что благотворно сказывается на прорастании семян и накоплении биомассы люпина.

ВЫЖИВАЕМОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* В РИЗОСФЕРЕ И РИЗОПЛАНЕ И ВЛИЯНИЕ ЕЕ НА РОСТ РАСТЕНИЙ

Популяция *C. glutamicum* была внесена в дерново-подзолистую почву на двух исходных уровнях — 10^9 и 10^7 кл./г почвы. Интродукцию проводили на трех стадиях микробной сукцессии: 0-е («молодая»), 6-е («промежуточная»), 19-е («зрелая») сутки. Одновременно с внесением популяции осуществляли посев семян кресс-салата (*Lepidium sativum* L.) На 9-е сутки эксперимента измеряли показатели длины проростков и корней растений. Интродукция *C. glutamicum* достоверно ускоряла рост растений по сравнению с контролем. В вариантах с внесением бактерий на уровне 10^9 кл./г наблюдалось увеличение средней длины растений на 16-23 %, в вариантах с внесением 10^7 кл./г — на 6-12 % по сравнению с контролем. Наилучшие условия для роста растений складывались в почве на более поздних стадиях микробной сукцессии (6 и 19 сутки).

Таким образом, на исследуемые параметры роста растений кресс-салата значительное влияние оказывали факторы микробной сукцессии и уровень внесения бактерий. В вариантах с внесением на уровне 10^7 кл./г почвы популяция регистрировалась только в момент внесения (10^5 кл./г) и не обнаруживалась уже на 3-и сутки. В почве с высоким уровнем внесения на 7-е сутки численность *C. glutamicum* в «молодой» (0-е сутки) почвенной системе составляла 10^1 кл./г, а в «промежуточной» (6-е сутки) и «зрелой» (19-е сутки) — 10^5 кл./г почвы. В ризосфере и ризоплане на 9-е сутки популяция *C. glutamicum* выявлялась только в «промежуточной» и «зрелой» почвенной сукцессии с высоким уровнем внесения бактерий.

В других экспериментах внесение бактерий в почву также оказывало достоверный положительный эффект на растения. На 10-е сутки эксперимента фиксировалось увеличение по сравнению с контролем длины проростков кресс-салата (*Lepidium sativum* L.) и редиса сорт «Алекс» (*Raphanus sativus* L. var. *radicula*) на 29% и 40% соответственно. Интродукция *C. glutamicum* достоверно повышала количество проросших семян кресс-салата на 26 %, а редиса — на 40 %. При этом, на 10-е сутки вносимая популяция в почве, ризосфере и ризоплане не обнаруживалась.

Результаты проведенных исследований были обработаны с помощью регрессионного анализа, который показали наличие корреляции между индексом гидролиза ФДА и длиной кресс-салата. Коэффициент корреляции был равен 0,91, а уравнение регрессии имело вид $L = 6,99 \times D + 2,58$ где, L — длина кресс-салата; D — оптическая плотность раствора. На основании регрессионного анализа полученных данных установили, что на рост кресс-салата оказывает влияние состояние почвенной микробной сукцессии и вносимая биомасса *C. glutamicum*. При этом наиболее благоприятные условия для роста растений складываются в образцах «зрелой» почвенной микробной системы в контроле и в вариантах с внесением популяции на 19 и 6 сутки сукцессии. Все варианты почвы на 0-е сутки микробной сукцессии и конт-

рольные образцы почвы на 6-е сутки сукцессии в меньшей степени оказывали влияние на длину кресс-салата

Анализ последствий интродукции в лабораторных микрокосмах показывает (рис 2), что в вариантах с внесением *C. glutamicum* не регистрируется отрицательный эффект. Более того, на начальных этапах развития растений (9-15 суток), как правило, наблюдается достоверный стимулирующий эффект, скорее всего связанный с действием биологически активных продуктов жизнедеятельности продуцента лизина на растения и почвенные микроорганизмы. На рост растений оказывали влияние такие факторы, как сукцессионное состояние естественной почвенной микробной системы и уровень внесения популяции.

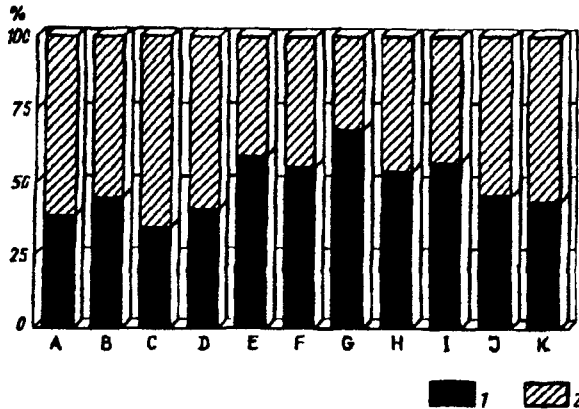


Рис 2 Последствия интродукции в системе почва — растения (А и С — прорастание семян редиса и салата; В и D — длина редиса и салата), показатели численности бактерий на МПА: Е — почва, F — ризосфера салата, G — ризоплана салата, H — ризосфера редиса, I — ризоплана редиса. J и K — индексы общей активной биомассы в почве и ризосфере. Условные обозначения: 1 — контроль, 2 — интродукция

Наиболее благоприятные условия для тест-растений складывались в почве находящейся на «зрелой» и «промежуточной» стадиях сукцессии микробных сообществ. Численность популяции *C. glutamicum* в почве, ризосфере и ризоплане снижалась, и чужеродные бактерии быстро погибали.

ДИНАМИКА ЧИСЛЕННОСТИ ПОПУЛЯЦИИ *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* В ВОДЕ

Опыты в условиях голодания дают определенное представление об экологической стратегии микроорганизмов в условиях действия внутривидовых механизмов регуляции. С этой целью нами изучалась динамика

численности и возможности выживания популяции *C. glutamicum* в воде различных водоисточников. Исследуемая популяция вносилась в нестерильную дистиллированную и прудовую воду, которая затем инкубировалась при 4°C и при 25°C. Во всех образцах воды (при 4°C) численность исследуемой популяции возрастала на 3 сутки. На 7-е сутки численность *C. glutamicum* уменьшалась. При 4°C клетки внесенной популяции не обнаруживались в дистиллированной воде на 24-е сутки, в прудовой воде – на 64-е сутки. В воде при 25°C численность виссенных бактерий резко падала, популяция не регистрировалась в прудовой и дистиллированной воде на 7-е сутки. Таким образом, выживаемость *C. glutamicum* при 4° С в 9 раз выше, чем при 25 °С. Наиболее благоприятной для выживания исследуемых бактерий была прудовая вода. Более высокую выживаемость *C. glutamicum* в прудовой воде можно объяснить наличием в ней источников питания. Дистиллированная вода – наиболее голодная среда, поэтому выживаемость *C. glutamicum* в ней ниже.

Исследование популяции в стерильных и нестерильных образцах водопроводной, речной и прудовой воды показало, что выживаемость *C. glutamicum* была выше в стерильных образцах воды. На 14-е сутки удельная скорость гибели популяции в стерильных образцах воды составляла примерно 0,024-0,035 ч⁻¹ (время полужизни около 20 ч), в нестерильных – примерно 0,050 – 0,052 ч⁻¹ (время полужизни 13,5 ч). Полученные данные свидетельствуют, что в стерильной воде действуют только внутрипопуляционные механизмы регуляции численности, а в нестерильной добавляются еще межпопуляционные механизмы отрицательного знака (конкуренция), которые также оказывают влияние на численность *C. glutamicum*. Очевидно, что метаболизм объекта характеризуется высокими тратами на поддержание и плохо приспособлен к условиям голодания, которые часто создаются в природных местообитаниях.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТОЯНИЯ ПОПУЛЯЦИИ *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* В ПРИРОДНЫХ МЕСТООБИТАНИЯХ

Для анализа вероятного состояния клеток в природном местообитании использовали модель Хатори для расписания роста колоний на питательной среде: $N = N_0 \left[1 - e^{-\lambda(t-t_0)} \right]$, где N – количество колоний в момент времени t ; N_0 – финальное число колоний; λ и t_0 – параметры (Кожевин, 1989; Suwa, Hattory, 1987). Процесс появления колоний *C. glutamicum* на поверхности твердой питательной среды представлен на рис. 3.

Характер кривых практически не зависит от времени пребывания инодродной популяции в почве. Расчетные показатели продолжительности лаг-фазы t_0 (до появления колоний) и вероятности размножения λ составляют примерно 1С и 0,25 ч⁻¹ соответственно. Показатель λ по смыслу отражает физиологическое состояние клеток. Предполагается, что для клеток с активным метаболизмом $\lambda > 0,042$ ч⁻¹, а для клеток в покоящемся состоянии $\lambda < 0,021$ ч⁻¹.

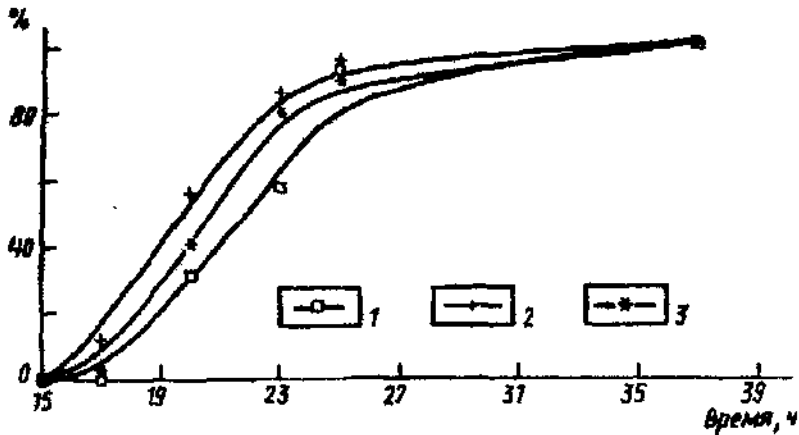


Рис. 3 Расписание появления колоний *C. glutamicum* сразу после внесения популяции в почву (1), через 3 (2) и 9 (3) суток

Полученный для исследуемой популяции показатель λ существенно превышает 0,042, что свидетельствует о сохранении высокой активности клеток как в почве, так и в воде и их неспособности перехода в покоящееся состояние в условиях олиготрофного местообитания.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЪЕКТОВ МЕТОДОМ МУЛЬТИСУБСТРАТНОГО ТЕСТИРОВАНИЯ

Анализ функциональных спектров потребления ресурсов с помощью мультисубстратного тестирования проведен методом главных компонент (ГК) (рис. 4).

Из матрицы факторных нагрузок следует, что ГК 1 в основном определяется потреблением сорбита и твина. В свою очередь ГК 2 наиболее тесно связана с серином и крахмалом, причем корреляция для данных субстратов имеет разные знаки. Ближе всего к чистой культуре *C. glutamicum* расположено почвенное микробное сообщество сразу после интродукции. На этом этапе метод подтверждает появление инородной популяции в структуре сообщества, что проявляется также в снижении показателя потребления ацетата и повышении показателя потребления серина. Однако через 30 суток вариант с интродукцией практически не отличается от контрольного микробного сообщества почвы. Таким образом, мультисубстратное тестирование подтверждает заключение об элиминации популяции примерно через месяц после интродукции и восстановления функций естественного почвенного микробного сообщества.

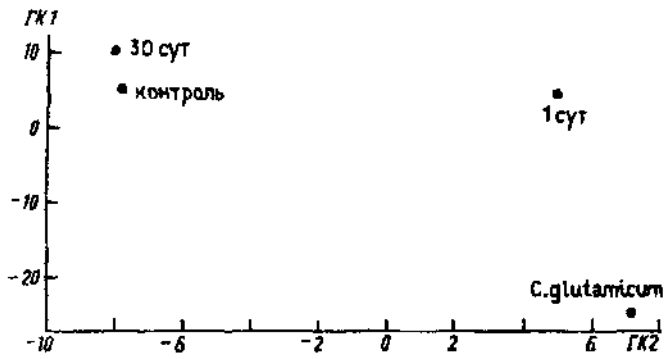


Рис. 4 Функциональная характеристика исследуемой популяции и позвешного микробного сообщества на основе мультисубстратного тестирования

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно результатам исследования в полевых условиях и в модельных опытах с внесением популяции *Corynebacterium glutamicum* в почву и одновременной инокуляцией семян кресс-салата, редиса и люпина желтого традиционными методами и с применением мультисубстратного тестирования получены следующие выводы:

1. Установлено неуклонное снижение плотности популяции *Corynebacterium glutamicum* в природных местообитаниях (почвы, ризосфера и ризоплана растений, водные среды) и ее гибель примерно в течение месяца после интродукции. Характер кривой динамики численности *Corynebacterium glutamicum* указывает на то, что вносимая популяция является относительным К-стратегом, так как отсутствуют флуктуации и численность исследуемой популяции снижается постепенно [1; 9: 15]

2. Факторы внешней среды оказывают различное влияние на выживаемость популяции *Corynebacterium glutamicum* в почве. Наиболее длительному сохранению популяции способствуют такие физико-химические свойства почвы, как нейтральное значение pH, большое количество подвижных форм фосфора и калия, высокое содержание физической глины. Наряду с этим, выживаемость объекта продлевается на 7-15 суток за счет внесения пептона и глюкозы (азотного и углеродного субстратов). В стерильной почве популяция *Corynebacterium glutamicum* сохраняется примерно в 2 раза дольше, чем в нестерильной. Исследуемая популяция быстрее погибает в вариантах с относительно низким уровнем внесения бактерий. Состояние почвенной микробной сукцессии (инициированное увлажнением) в момент интродукции *Corynebacterium glutamicum* на динамику популяции практически не оказывает влияния [2; 5; 8; 14]

3. На начальных этапах развития растений при интродукции *Corynebacterium glutamicum*, как правило, наблюдается достоверный стимулирующий эффект, по-видимому, связанный с действием биологически активных продуктов жизнедеятельности вносимых бактерий на растения и почвенные микроорганизмы. Полученные результаты допускают принципиальную возможность утилизации отработанной биомассы популяции в качестве бактериального удобрения [3; 7; 11]

4. Анализ физиологического состояния исследуемой популяции в природных местообитаниях (почва, водная среда) по расписанию появления колоний на твердой питательной среде (модель Т. Хаттори) показывает, что клетки *Corynebacterium glutamicum* не способны к переходу в покоящееся состояние в условиях олиготрофного местообитания. Удельная скорость гибели популяции *Corynebacterium glutamicum* в модельных экспериментах в условиях голодания относительно высока и составляет примерно 0,024-0,052 ч⁻¹, что характеризует объект как популяцию с большими затратами ресурсов на поддержание метаболизма и свидетельствует о неприспособленности *Corynebacterium glutamicum* к условиям голодания, которые часто имеет место в природных местообитаниях [1; 4; 13]

5. Методом мультисубстратного тестирования выявлено изменение в структуре почвенного микробного сообщества при внесении в него *Corynebacterium glutamicum*, а также период элиминации этой культуры и возвращение почвенного микробного комплекса к исходному состоянию [1; 6; 12].

6. На основании анализа популяционной динамики в природных местообитаниях, характеристики экологической стратегии (скорость гибели при голодании, вероятность размножения в модели Т. Хаттори) и результатов мультисубстратного тестирования можно охарактеризовать *Corynebacterium glutamicum* как аллюхтонный микроорганизм, который быстро элиминируется в исследуемых естественных местообитаниях и не представляет опасности в случае микробного загрязнения окружающей среды предприятиями микробиологической промышленности [1; 10; 15].

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. Жебрак И.С., Скоробогатова Р.А., Кожевин П.А. Динамика популяции *Corynebacterium glutamicum* в почве и корневой зоне растений // Вести Моск. ун-та. Сер. 17. Почвоведение. – 1998. – № 1. – С. 48-51.
2. Жебрак И.С., Скоробогатова Р.А., Кожевин П.А. Влияние питательных субстратов на динамику численности популяции *Corynebacterium glutamicum* в почве // Вестник Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Сер. 2. – 1999. – № 1. – С. 73-76.
3. Жебрак И.С. Влияние популяции *Corynebacterium glutamicum* на рост растений и выживаемость ее в ризосфере и ризоплане // Вестник Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Сер. 2. – 2001. – № 1. – С. 116-123.

Материалы докладов конференций

4. Жебрак И.С. Выживаемость *Corynebacterium glutamicum* в воде // Экология и молодежь: Материалы 1-ой международной научно-практической конференции. Гомель, 17-19 марта 1998 / Гомельский государственный университет. – Гомель, 1998. – Том I. – С. 91.
5. Жебрак И.С. Динамика популяции *Corynebacterium glutamicum* в почвах различных биоценозов // Экология и молодежь: Материалы 1-ой международной научно-практической конференции. Гомель, 17-19 марта 1998 / Гомельский госуниверситет. – Гомель, 1998. – Том I. – С. 90-91.
6. Жебрак И.С., Кожевин П.А. Исследование интродукции популяции *Corynebacterium glutamicum* в почву с помощью мультисубстратного тестирования // Проблемы микробиологии и биотехнологии: Материалы международной конференции. Минск, 25-27 ноября 1998 г. / Институт микробиологии НАН РБ. – Минск, 1998. – С. 169-170.
7. Чубук Ю.П., Жебрак И.С., Скоробогатова Р.А. Выживаемость *Corynebacterium glutamicum* в почве, ризосфере и ризоплане люпина // Наука производству: Материалы третьей международной научно-практической конференции. Гродно, июнь 1999 г. / Гродненский сельхозинститут. – Гродно, 1999. – С. 120-122.
8. Жебрак И.С., Скоробогатова Р.А. Выживаемость продуцента лизина в стерильной и нестерильной почве // Наука производству: Материалы третьей международной научно-практической конференции. Гродно, июнь 1999 г. / Гродненский сельхозинститут. – Гродно, 1999. – С. 104-106.
9. Жебрак И.С., Скоробогатова Р.А., Кремлев Е.П., Кожевин П.А. Динамика численности популяции *Corynebacterium glutamicum* в воде / Микробиология и биотехнология на рубеже XXI столетия: Материалы международной конференции. Минск, 1-2 июня 2000г. / Институт микробиологии НАН РБ. – Минск, 2000. – С. 163-164.
10. Жебрак И.С. Популяционные взаимоотношения между микробами в почве // Сахаровские чтения 2002 года: экологические проблемы 21-го века

Материалы международной конференции ведущих специалистов, молодых ученых и студентов, Минск, 27-21 мая 2002 г / Международный экологический университет им. А.Д. Сахарова. – Минск, 2002 – С.265-266.

11 Жебрак И.С. Анализ возможности применения промышленного продуцента аминокислот в качестве бактериального удобрения // Микробиология и биотехнология 21-го столетия: Материалы международной конференции. Минск. 22-24 мая 2002г / Институт микробиологии НАН Беларуси – Минск, 2002 – С. 218 –219.

Тезисы

12 Кремлев Е.П., Жебрак И.С. Сукцессионные изменения бактериального сообщества дерново-подзолистых почв после внесения культуры *Brevibacterium flavum* // Устойчивость производственной среды в условиях техногенеза. Тезисы докладов научно-практической конференции РБ, Минск, 27-28 мая 1997 г / Белорусский научно-исследовательский геологоразведочный институт – Минск, 1997.– С.27.

13 Жебрак И.С., Скоробогатова Р.А., Кремлев Е.П., Кожевни П.А. Определение состояния популяции *Corynebacterium glutamicum* в почве // Экологические проблемы XXI века: Тезисы международной конференции молодых ученых. Минск, 1-2 ноября 2000г / Международный экологический университет им. А.Д. Сахарова. – Минск, 2000. – С.121-123.

14 Скоробогатова Р.А., Полеонко Г.Н., Жебрак И.С. Влияние физических свойств почвы на выживаемость популяции *Corynebacterium glutamicum* // Экологические проблемы XXI века: Тезисы международной конференции, Минск 1-2 ноября 2000г / Международный экологический университет им. Сахарова – Минск. – 2000.– С.141-142

15 Жебрак И.С. Результаты интродукции *Corynebacterium glutamicum* // Биология – наука 21-го века: Тезисы 5-й Пушкинской конференции молодых ученых. Пущино. 16-20 апреля 2001г / Институт физико-химических проблем почвоведения – Пущино, 2001. – С. 227

РЕЗЮМЕ

Жебрак Инна Степановна

**Динамика популяции *Corynebacterium glutamicum*
в почве, ризосфере и ризоплане**

Ключевые слова: динамика, популяция, интродукция, инокуляция, почва, ризосфера, ризоплана, уровень внесения, выживаемость.

Цель работы - исследование интродукции в почву и прикорневую зону растений штамма *C. glutamicum* 22 LD, продуцента лизина.

Методы исследования – посев на плотную питательную среду МПА, метод мультисубстратного тестирования, световая микроскопия, спектрометрия в УФ области, газометрический метод.

Полученные результаты и их новизна. Впервые проведено детальное исследование интродукции популяции *C. glutamicum* в разных вариантах опыта. Установлено, что исследуемая популяция неизбежно погибает в почвенных условиях примерно в течение месяца. Скорость гибели объекта зависела от уровня внесения бактерий, физико-химических свойств почвы, состояния почвенной микробной системы, биогенности почвы, вносимых питательных субстратов – глюкозы и пептона

Показано, что в ризосфере и ризоплане популяция *C. glutamicum* быстро погибает. Вместе с тем, внесенные бактерии на начальных этапах развития растений оказывали достоверный стимулирующий эффект, который зависел от состояния почвенной микробной сукцессии. Полученные результаты допускают принципиальную возможность утилизации отработанной биомассы популяции в качестве бактериального удобрения. Определялось физиологическое состояние *C. glutamicum* в природных местообитаниях. Показано, что исследуемые бактерии сохраняют свою активность, как в почве, так и воде и не способны переходить в покоящееся состояние в условиях голодания

Методом мультисубстратного тестирования впервые было оценено влияние чужеродной популяции на почвенное микробное сообщество. В момент внесения популяции в почву метод подтверждал появление инородной популяции в структуре сообщества, однако через месяц после интродукции почвенный микробный комплекс возвращался к исходному состоянию и практически не отличался от контроля.

Область применения. Сельское хозяйство, микробиологическая промышленность, ВУЗ.

РЭЗЮМЭ
Жабрак Іна Сцяпанаўна
Дынаміка папуляцыі *Corynebacterium glutamicum*
у глебе, рызасферы, рызаплане

Ключавыя словы дынаміка, папуляцыя, інтрадукцыя, інакуляцыя, глеба рызасфера, рызаплан, узровень унясення, выжывальнасць

Мэта працы – даследаванне інтрадукцыі ў глебе і прыкарансвай зоне раслін штама *Corynebacterium glutamicum* 22 LD, прадукцэнта лізіна

Метады даследаванняў - пасеў у цвердас пажыўнае асяроддзе МПА, метады мультысубстратнага тэсціравання, светавае мікраскапія, спектраметрыя ў УФ вобласці, газаметрычны метады.

Атрыманая вынікі і іх навізна. Упершыню праведзена дэталевас даследаванне інтрадукцыі папуляцыі *C. glutamicum* у розных варыянтах вопыта Устаноўлена, што даследаваная папуляцыя непазбежна гіне ў глебавых умовах, прыкладна, на працягу месяца Хуткасць гібелі папуляцыі залежала ад узроўню унясення бактэрыі, фізіка-хімічных уласцівасцей глебы, стану глебавай мікробнай сістэмы, бягучасці глебы, пажыўных субстратаў – глюкозы і пептона

Паказана, што ў рызасферы і рызаплане папуляцыя *C. glutamicum* хутка гіне Разам з тым, унесеныя бактэрыі на пачатковых этапах развіцця раслін аказвалі верагодны стымулюючы эфект, які залежаў ад стану глебавай мікробнай сукцэсіі Атрыманая вынікі дапускаюць прыняццёвую магчымасць утылізацыі адпрацаванай біямасы папуляцыі ў якасці бактэрыяльнага ўгнаення Вызначаны фізіялагічны стан *C. glutamicum* у прыродных месцах пражывання Паказана, што даследуемыя бактэрыі захоўваюць сваю актыўнасць як у глебе, так і ў вадзе і не могуць пераходзіць у стан спакою ва ўмовах голаду

Метадам мультысубстратнага тэсціравання ўпершыню быў ацэнены ўплыў чужароднай папуляцыі на глебавас мікробнас згуртаванне У час унясення папуляцыі ў глебу метады пацвердзілі з'яўленне іншароднай папуляцыі ў складзе згуртавання, аднак праз месяц пасля інтрадукцыі глебавы мікробны комплекс вяртаўся ў зыходны стан і практычна не адрозніваўся ад кантрольнага

Вобласць выкарыстання. Сельская гаспадарка, мікрабіялагічная прамысловасць, ВНУ

SUMMARY
Zhebrak Inna

**Dynamics of *Corynebacterium glutamicum*
in soil, rhizosphere and rhizoplane**

Key words: dynamics, population, introduction, inoculation, soil, rhizosphere, rhizoplane, level of inoculation, survival

Purpose of the work: investigation of introduction into soil and plant rhizosphere of the *Corynebacterium glutamicum* 22 I.D. the producer of lysine
Methods of investigation - sowing to hard nutrient medium MPA, multisubstrate testing method, luminescent microscopy, spectrometry in UV-region, gasometry method

Obtained results and its novelty. For the first time the detailed investigation of introduction of *C. glutamicum* population in different variants of experiment was carried out. It was found, that the investigated population inevitably gets perished in soil conditions in about one month. The rate of object destruction depended on the level of bacteria introduction, physical-chemical properties of soil, state of soil microbial system. Besides, it was noticed that *C. glutamicum* population survives longer in steril soil and in soil with nutrients (glucose and pepton)

It was shown that *C. glutamicum* population gets quickly perished in rhizosphere and rhizoplane. At the same time introduced bacteria at the initial stages of plant development exert reliable stimulating effect, which depends on the stage of soil microbial succession. According to the obtained result, principle possibility of utilization of waste biomass of the population as a bacterial fertilizer is allowed. For the first time physiological state of *C. glutamicum* in natural environment was determined. It was shown that the investigated bacterias conserve their activity as in soil as in water and are not able to proceed to rested state in starvation conditions.

For the first time the effect of strange population on soil microbial community was estimated. The method confirmed the appearance of strange population in the structure of community at the moment of population introduction into the soil, however, a soil microbial complex returned to initial state after one month of the introduction and was not practically different from the control.

The field of use: agriculture, microbial industry, and high school education



Подписано в печать 26.02.2003. Формат 60х84/16
Бумага офсетная №1. Печать офсетная. Шрифт Таймс.
Усл. печ. л. 1,16. Тираж 100 экз. Заказ 20.

Отпечатано на технике издательского отдела Учреждения образования
«Гродненский государственный университет имени Янки Купалы»
ЛП №111 от 29.12.2002. Ул. Пушкина, 39. 230012. Гродно.

РНБ Русский фонд

2003-4

21532