

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРИЕМА ИНТРОДУКЦИИ В ОРГАНИЧЕСКИЙ СУБСТРАТ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВЕРМИКОМПОСТА С УСИЛЕННЫМИ РОСТОСТИМУЛИРУЮЩИМИ И ФУНГИСТАТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

Представлены результаты исследований, имевших целью отработку приема интродукции в перерабатываемый дождевыми червями органический субстрат бактериальной культуры рода *Pseudomonas*; дана оценка эффективности приема интродукции.

Начало XX в. ознаменовалось широким и повсеместным внедрением индустриальных технологий в сельскохозяйственное производство, а также крупномасштабными мероприятиями по химизации и мелиорации земель. Все это привело к заметному увеличению урожайности возделываемых культур. В то же время резко упал уровень плодородия вовлеченных в сельскохозяйственное освоение почв. Неотъемлемыми спутниками данного процесса выступают сокращение запасов гумуса и проявление эффекта почвоутомления в связи с сужением видового разнообразия микробного сообщества почвы и высвобождением дополнительных экологических ниш для фитопатогенных микроорганизмов.

Особенно ощутимо негативное последствие бесконтрольного применения средств химизации и неправильной агротехники проявляется на малогумусных почвах зоны рискованного земледелия, в которую входит и Западно-Сибирский регион. Одним из решений проблемы получения качественного урожая без снижения уровня плодородия почвы могут стать производство и применение органических компостов, которые наряду с достаточным содержанием питательных элементов отличались бы также высоким уровнем биологической активности, обеспечивая рост и развитие растений и их защиту от патогенов.

Биогумус дождевых червей в полной мере отвечает этим требованиям. При этом высокие адаптогенные свойства биогумуса в основном обусловлены наличием в нем комплекса полезной микрофлоры, способной как к прямому подавлению патогенных агентов, так и к вытеснению их из состава микробного сообщества почвы до экологически безопасного уровня. В связи с этим с научной и практической точек зрения представляется интересным изучение возможности усиления ростостимулирующих и фунгистатических свойств биогумуса за счет интродукции в его микробное сообщество активных продуцентов биологически активных веществ, обладающих свойствами стимуляторов роста растений и биофунгицидов.

Как известно, бактерии рода *Pseudomonas* являются одними из наиболее активных представителей так называемой микрофлоры биоконтроля, способных продуцировать широкий спектр веществ антибиотической и антифунгальной природы. Поскольку биогумус дождевых червей в целом отличается довольно высокой численностью псевдомонад, выбор представителей данной систематической группы для интродукции оказался наиболее целесообразным.

Объекты и методы

В качестве органического субстрата для культивирования технологичных навозных червей (*Eisenia foetida*)

использовали торфонавозную смесь, состоящую из низинного торфа месторождения «Кандинское» Томской области и подстилочного навоза КРС (крупного рогатого скота) в соотношении 1:4 по объему. Норма запуска червей соответствовала 40 половозрелым особям на 1 кг субстрата. Влажность субстрата поддерживали на уровне 75–80%, а температуру – в пределах +22...+25°C. Длительность культивирования червей до интродукции штамма – 2 нед. Для интродукции использовали формальдегид резистентный штамм В-6798 из коллекции кафедры сельскохозяйственной биотехнологии ТГУ. Штамм В-6798 вносили в биогумус в виде накопительной культуры на мясо-пептонном бульоне (МПБ) с титром 150 тыс. клеток в 1 мл культуральной среды в дозе 0,6 л на 5 кг биогумуса. В качестве контроля использовали вариант с биогумусом без интродукции и поливом равным количеством воды.

Эффективность интродукции штамма проверяли методами посева из опытного и контрольного вариантов органического субстрата на мясо-пептонном агаре (МПА) с последующим учетом численности бактерий [1].

Изменение ростостимулирующих свойств биогумуса после интродукции штамма В-6798 проверяли в биотесте на семенах пшеницы. Семена пшеницы замачивали в течение 5 мин в слабокислотных вытяжках из контрольного и опытного вариантов биогумуса. В качестве холостого опыта в биотесте использовали обработку семян дистиллированной водой. После замачивания семена проращивали между двумя слоями влажной фильтровальной бумаги в чашках Петри в течение 7 сут. Об изменении ростостимулирующей активности биогумуса с интродукцией бактериального штамма судили по разнице показателей веса корней и зеленой массы проростков в данном варианте и варианте без интродукции. Кислотные вытяжки готовили следующим образом. Биогумус с влажностью 60–65% заливали дистиллированной водой в соотношении 1:10 по весу. К полученной взвеси добавляли по каплям 1 н. раствор HCl до pH 4,5 и затем выдерживали на водяной бане в течение 1 ч при температуре +80°C. После охлаждения колб раствор отфильтровывали и измеряли pH. Благодаря высоким буферным свойствам биогумуса изначальная кислотность раствора в норме нейтрализуется до pH 6,0–6,5.

Изменение фунгистатической активности биогумуса после интродукции штамма В-6798 исследовали в биотесте с чистой культурой фитопатогенного гриба *Bipolaris sorokiniana* при его совместном культивировании на картофельно-глюкозном агаре в присутствии бактериальных изолятов, выделяемых из контрольного и опытного вариантов биогумуса. Об изменении фунгистатической активности судили по разнице скорости

роста гриба в присутствии бактериальных изолятов, выделенных из вариантов биогумуса без интродукции и с интродукцией штамма В-6798.

Достоверность полученных результатов оценивали при помощи пакета прикладных программ Statistica 5.5.

Результаты и обсуждение

Перед тем как приступить непосредственно к интродукции штамма, предстояло ответить на вопрос о выборе наиболее оптимального приема интродукции. Как известно, бактерии рода *Pseudomonas* являются хорошо выраженными R-стратегиями, обладающими небольшим временем генерации и дающими вспышки численности на легкодоступных источниках органического вещества. Высокая численность и довольно большое видовое разнообразие псевдомонад в биогумусе могли значительно осложнить интродукцию штамма В-6798. Для подавления неизбежной конкуренции интродуцируемого штамма с аборигенными видами псевдомонад был выбран прием искусственного снижения влажности биогумуса (на 10%) и после-

дующего обильного увлажнения непосредственно перед процедурой интродукции штамма перед запуском микробной сукцессии. Эффективность интродукции бактериальных штаммов в почву неоднократно была показана как в отечественных, так и в зарубежных исследованиях, посвященных применению микробных удобрений [2, 3].

Результаты микробиологических исследований показали, что прием уменьшения влажности на 10% (с 65 до 55%) обусловил снижение доли псевдомонад в 1,5 раза от общей численности микроорганизмов в биогумусе (рис. 1).

Полученные результаты позволили предположить, что интродукция активного штамма В-6798 в биогумус в момент запуска микробной сукцессии, обусловленного обильным увлажнением после предварительного снижения влажности, может быть достаточно успешной из-за существенного снижения доли аборигенных псевдомонад в составе микробного сообщества биогумуса. В таких условиях шансы интродуцируемого штамма на заполнение высвободившейся экологической ниши значительно возрастут.

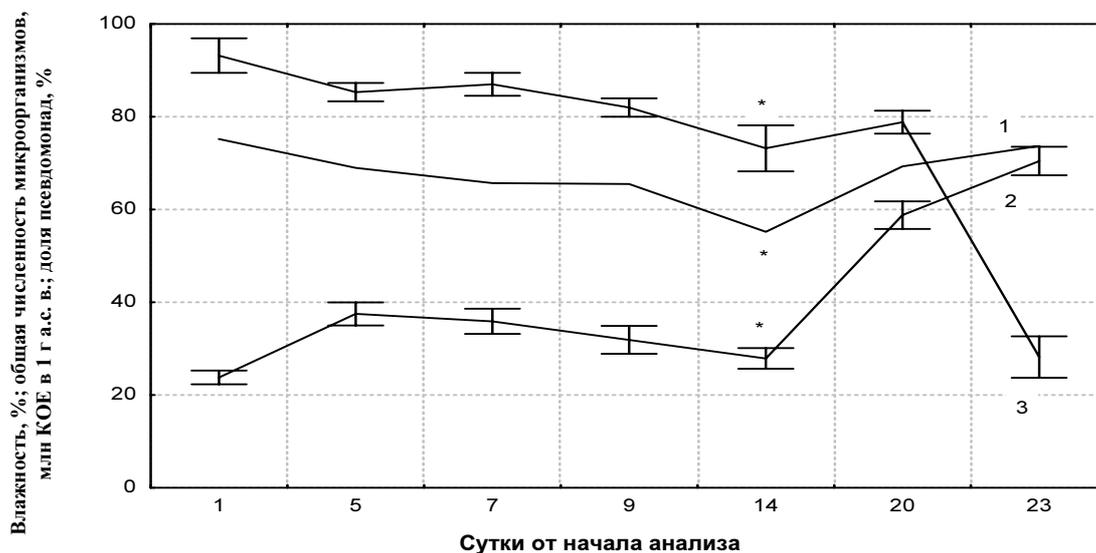


Рис. 1. Влияние уровня влажности на изменение численности микроорганизмов в биогумусе: 1 – уровень влажности, %; 2 – доля бактерий рода *Pseudomonas*; 3 – общая численность микроорганизмов

Для проверки предположения об успешности интродукции штамма В-6798 в биогумус в момент запуска микробной сукцессии со вторых суток после интродукции исследовали динамику общей численности микроорганизмов в контрольном и опытном варианте, а также численности интродуцированного штамма.

Из рис. 2 видно, что и в контрольном, и в опытном вариантах динамика численности микроорганизмов имеет колебательный характер. Причем в контроле амплитуда колебаний с момента запуска микробной сукцессии и на исследуемом отрезке времени постоянна. Обильный полив привел к резкому увеличению численности микроорганизмов, однако не отразился на увеличении средних значений амплитуды колебаний численности микроорганизмов, по-видимому, характерных для данного варианта биогумуса.

В опытном варианте интродукция штамма В-6798 в составе культуральной среды, напротив, обусловила возрастание численности микроорганизмов более чем на порядок. Причем основная доля (92–95%) приходилась на штамм В-6798, что свидетельствует об успешности выбранного приема интродукции. Однако уже на 8-е сут наблюдалось резкое снижение амплитуды колебаний численности – более чем в 3 раза. Сократилась и доля интродуцированного штамма от общего числа микроорганизмов. В первые сутки после интродукции численность штамма соответствовала 990 тыс. клеток в 1 г а.с.в. биогумуса.

К 20-м сут после интродукции его численность снизилась почти в 25 раз. К концу периода наблюдения доля штамма от общего числа микроорганизмов составляла 9%, что не превышало средних показателей для других видов псевдомонад, колеблющихся в пределах 10–15%.

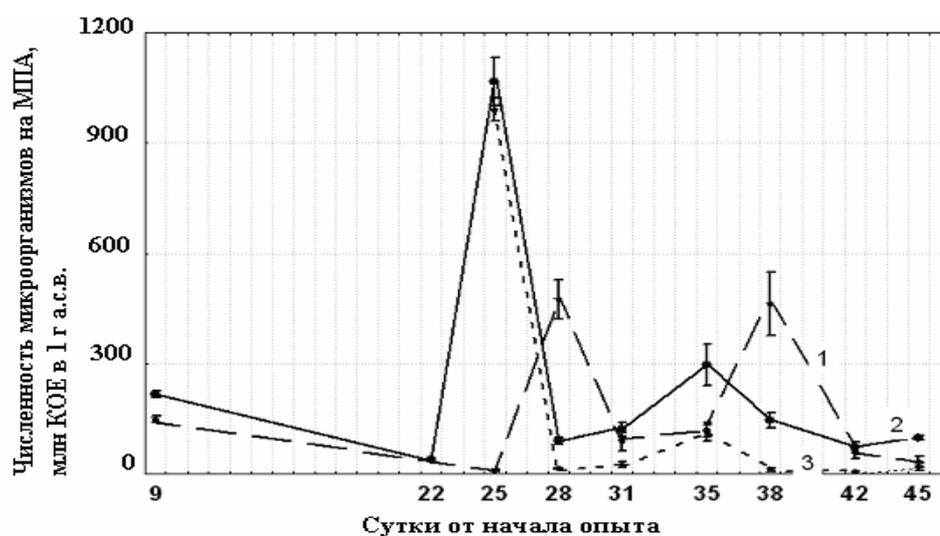


Рис. 2. Динамика численности микроорганизмов в опытном и контрольном вариантах биогумуса после интродукции штамма В-6798: 1 – общая численность микроорганизмов в контроле без интродукции; 2 – общая численность микроорганизмов в варианте с интродукцией; 3 – численность штамма В-6798

Из этого следует, что в целом выбранный прием снижения влажности и последующего обильного увлажнения можно признать эффективным для запуска микробной сукцессии и интродукции активных культур псевдомонад в биогумус. Интродукция штамма В-6798 прошла успешно, штамм занял определенную экологическую нишу, хотя и не получил доминирующего положения. Анализ численности аборигенных видов *Pseudomonas* показал, что интродукция штамма В-6798 привела

к частичной перестройке структуры микробного сообщества биогумуса. Согласно результатам, приведенным в таблице, численность некоторых видов *Pseudomonas* после внедрения в микробиоценоз штамма В-6798 значительно снизилась, а один из видов (Б.И.1.1 – бактериальный изолят 1.1) полностью элиминировал из состава микробного сообщества биогумуса. Возможно, внесение нового штамма способствовало усилению межвидовой конкуренции микроорганизмов за субстрат в биогумусе.

Динамика численности микроорганизмов в торфоавтомном субстрате в процессе вермикультивирования; млн клеток в 1 г а.с.в.

Дата анализа	Общая численность		Pseudomonas sp. В-6798 II вариант	Жёлтопигментные		Доля неспоробразующих бактерий, %	
	I вариант	II вариант		I вариант	II вариант	I вариант	II вариант
06.03.06	148,00	215,60	–	0,00	6,53	78	61
19.03.06	38,96	38,44	–	11,70	0,00	77	57
23.03.06	9,24	1066,91	990,96	6,93	0,00	62	92
26.03.06	473,64	88,44	13,60	0,00	0,00	95	74
29.03.06	88,44	120,83	24,99	2,50	0,00	92	77
05.04.06	462,43	145,66	10,92	6,80	0,00	93	87
09.04.06	57,87	70,87	6,75	7,70	0,00	75	81
12.04.06	20,00	97,87	6,65	6,66	0,00	76	88

Примечание. I вариант – вариант биогумуса без интродукции; II вариант – вариант биогумуса с интродукцией штамма *Pseudomonas* sp. В-6798.

Изучение динамики общей численности микроорганизмов в контрольном и опытном вариантах биогумуса после запуска микробной сукцессии и интродукции штамма В-6798 показало, что численность микроорганизмов изменяется циклически. Причем период колебаний в обоих вариантах биогумуса одинаков и примерно соответствует 10 сут. В варианте с интродукцией штамма наблюдалось некоторое смещение фазы колебаний: вспышки численности наступали на 3 дня раньше, чем в контрольном варианте биогумуса. По-видимому, внесение питательных элементов при интродукции в опытном варианте привело к опережению фаз подъема и спада численности микроорганизмов в органическом субстрате. На рис. 2 хорошо заметно смещение пиков численности в опытном варианте влево.

Исходя из этого, можно сделать предположение о том, что для микробного сообщества исследованного

биогумуса характерна внутренняя цикличность численности с периодичностью примерно в 10 сут. Причем подобный характер динамики численности, по-видимому, имеет статус закономерности, поскольку даже внесение дополнительных источников питания приводило лишь к смещению фаз циклов, но не вызвало нарушений в периодичности самих циклов. Явления цикличности отмечены практически для всех биологических систем, начиная от клеток микроорганизмов и заканчивая глобальными экосистемами [4, 5].

Причины, обуславливающие явления цикличности физиологических процессов живых организмов, стали предметом пристального исследования сравнительно недавно и послужили базой для создания целого направления в биологической науке – хронобиологии. Однако несмотря на довольно большой накопленный к

настоящему времени фактический материал, касающийся механизмов, обеспечивающих цикличность биологических процессов, о причинах данного явления у исследователей до сих пор нет четкого ответа. Открытие таких колебательных химических реакций, как реакция Белоусова – Жаботинского, позволяет выдвинуть предположение о том, что цикличность, возможно, является неотъемлемым свойством любых систем и неизбежно появляется на определенном уровне организации материи.

Успешность интродукции в биогукус штамма В-6798 позволила перейти ко второму этапу исследований, целью которых была проверка эффективности внедрения нового штамма. Необходимо было установить, привела ли интродукция В-6798 к усилению ростостимулирующих и фунгистатических свойств исследуемого образца биогукуса. Для ответа на поставленный вопрос были проведены два биотеста.

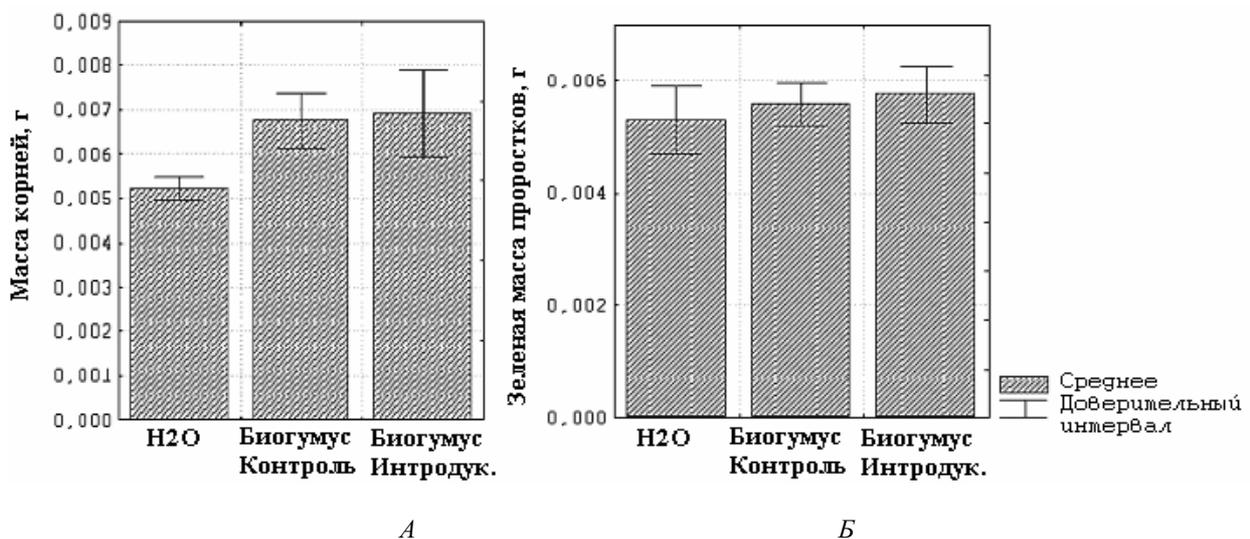


Рис. 3. Активность кислотных вытяжек из контрольного (без интродукции) и опытного (с интродукцией) вариантов биогукуса по отношению к сухой массе корней (А) и зеленой массе (Б) проростков

На массу корней вытяжки из обоих исследованных вариантов биогукуса оказали дополнительное стимулирующее влияние, однако между собой они различались недостоверно. Обработка семян пшеницы кислотной вытяжкой из контрольного варианта биогукуса обеспечила 25-процентную прибавку веса корней проростков по сравнению с холостым опытом, а обработка вытяжкой из биогукуса с интродукцией – 32-процентную прибавку.

Таким образом, результаты биотеста с кислотными вытяжками из обоих исследованных вариантов биогукуса свидетельствуют о том, что интродукция активного штамма В-6798 в биогукус не обеспечила достоверного увеличения его ростостимулирующей активности.

Основной целью интродукции активного штамма В-6798 в биогукус было усиление не только ростостимулирующих, но и его фунгистатических свойств. Для определения влияния интродукции штамма В-6798 на

Так как ранее одним из авторов [6] было установлено, что основными стимуляторами роста растений в биогукусе являются витамины, аминокислоты и низкомолекулярные органические кислоты, т.е. основные продукты кислотного гидролиза, определение уровня ростостимулирующей активности проводили в биотесте с семенами пшеницы, обработанными кислотными вытяжками из контрольного (без интродукции) и опытного (с интродукцией) вариантов биогукуса. Результаты биотеста представлены на рис. 3.

Как видно из рис. 3, обработка кислотными вытяжками из обоих вариантов биогукуса не обеспечила достоверной прибавки зеленой массы проростков по отношению к холостому опыту (обработка H₂O). Интродукция активного штамма В-6798 также не оказала дополнительного положительного эффекта на зеленую массу проростков по сравнению контрольным вариантом биогукуса.

уровень фунгистатической активности биогукуса из контрольного и опытного вариантов биогукуса предварительно выделили бактериальные изоляты, по морфологии колоний и клеток соответствующие роду *Pseudomonas*. Далее определили уровень их фунгистатической активности в биотестах с чистой культурой фитопатогенного гриба *Bipolaris sorokiniana*.

Результаты биотеста представлены на рис. 4. Анализ изменения радиальной скорости роста гриба *Bipolaris sorokiniana* в биотестах в зависимости от проявляемой бактериальными изолятами антифунгальной активности показал, что во всех вариантах поставленного биотеста гриб образует мицелий, наблюдается его рост и спороношение. Большинство выделенных из обоих вариантов биогукуса бактериальных изолятов обладали хорошо выраженным супрессивным воздействием на показатели радиального роста фитопатогенного гриба.

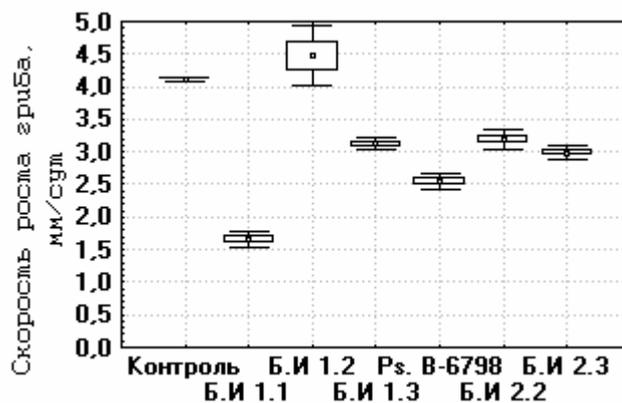


Рис. 4. Показатели скорости роста гриба *Bipolaris sorokiniana* в биотестах с чистыми культурами бактерий рода *Pseudomonas*, выделенными из контрольного и опытного вариантов биогумуса, а также со штаммом В-6798. Б.И.1.1, Б.И.1.2., Б.И.1.3 – бактериальные изоляты из биогумуса без интродукции штамма; Б.И.2.2, Б.И.2.3 – бактериальные изоляты из биогумуса с интродукцией штамма. Контроль – показатели роста гриба без бактерий

Интродуцированный штамм В-6798 также проявлял способность подавлять рост гриба, однако его показатели не намного превышали средние показатели по опыту. Самой высокой антифунгиальной активностью отличался формирующий на среде Кинга В и на МПА желтопигментные нефлюорисцирующие колонии бактериальный изолят Б.И.1.1, обеспечивший в биотесте более чем двукратное подавление скорости роста *Bipolaris sorokiniana* по сравнению с холостым опытом и более чем полуторное подавление по сравнению с интродуцированным штаммом В-6798 (см. рис. 4).

Однако согласно результатам микробиологического анализа в варианте с интродукцией данная желтопигментная бактериальная культура полностью элиминировала из состава микробного сообщества биогумуса. На основании этого можно предположить, что интродукция штамма В-6798 привела к замене более активной абортинной культуры на менее активную интродуцированную. Можно сделать вывод, что интродукция данного штамма для усиления ростостимулирующей и фунгистатической активности биогумуса может оказаться неэффективной, а учитывая дополнительные затраты на ее проведение, не оправдаться и с экономической точки зрения.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Методы почвенной микробиологии* / Под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд-во МГУ, 1980. 223 с.
2. *Базиллинская М.Б.* Биоудобрения. М.: Наука, 1989. 126 с.
3. *Эффективность* применения микробных удобрений за рубежом. М.: ВНИИТЭИ, 1987. 32 с.
4. *Уинфри А.Т.* Время по биологическим часам: Пер. с англ. М.: Мир, 1990. 208 с.
5. *Глас А., Мэки М.* От часов к хаосу. Ритмы жизни: Пер. с англ. М.: Мир, 1991. 248 с.
6. *Терещенко Н.Н.* Эколого-микробиологические аспекты вермикультивирования. Новосибирск: Изд-во СО РАСХН, 2003. 116 с.

Статья поступила в редакцию журнала 18 июля 2006 г., принята к печати 21 ноября 2006 г.