

УДК 547.466.46:631.4

И. С. ЖЕБРАК

МЕХАНИЗМЫ ИНТРОДУКЦИИ *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* В СТЕРИЛЬНУЮ И НЕСТЕРИЛЬНУЮ ПОЧВУ

Гродненский государственный университет имени Янки Купалы

(Поступила в редакцию 10.03.2005)

Введение. Уникальность почвы как среды обитания живых организмов выражается в том, что, являясь самой тонкой частью биосферы, она характеризуется высокой плотностью жизни и наибольшим видовым разнообразием живых организмов [1, 2]. Следует отметить, что наши представления о функционировании микробных сообществ весьма ограничены и о реальных взаимодействиях микроорганизмов в природных местообитаниях известно крайне мало. Проблема межмикробного взаимодействия в почве представляет несомненный интерес с точки зрения управления численностью инокулируемых микробных популяций. В соответствии с концепцией самоочищения принято считать, что основную роль в элиминации интродуцируемых популяций играют механизмы, связанные с конкуренцией, антагонизмом, хищничеством и паразитизмом [3]. Эту точку зрения можно оспаривать, поскольку было установлено, что многие популяции микроорганизмов, внесенные в почву, не погибают, а стабилизируются на достаточно высоком уровне [4, 5, 6]. Выживаемость микроорганизмов может быть объяснена тем, что механизмы, определяющие процесс гибели, по мере снижения обилия внесенной популяции ослабевают сами по себе, а также компенсируются механизмами противоположного знака [7]. В настоящее время существует представление о ненасыщенности комплекса почвенных микроорганизмов, то есть способности принять в себя внешние извне популяции [2, 8]. В функциональном состоянии микробных популяций важную роль играют микробные метаболиты, где они служат не только для роста и энергии микроорганизмов, но и являются показателями биохимической активности микробных популяций и их реакции на влияние экологических факторов и стрессовых ситуаций [9].

Преждевременным является утверждение об отсутствии риска при применении генно-инженерных микробных популяций. Факты, которыми располагает экология почвенных микроорганизмов, позволяют сомнительно относиться к подобным утверждениям [10, 11, 12]. Основным критерием приспособленности считается тип популяционной динамики, установленный экспериментально, значимость такого решения очевидна, так как в экологии не расшифрованы механизмы интродукции, и даже в экспериментах с растениями и животными не удается надлежащим образом предсказать поведение популяции и последствия интродукции [13, 14].

В настоящей работе приводятся результаты изучения динамики численности промышленного продуцента лизина *Corynebacterium glutamicum* 22 LD в стерильной и нестерильной почве. Цель данного исследования — оценка риска его попадания в окружающую среду и влияния почвенной биоты на выживаемость чужеродной популяции.

Объекты и методы исследования. Изучали культуру *Corynebacterium glutamicum* 22 LD — промышленный продуцент L-лизина, предоставленный Институтом микробиологии (Латвия) в 1987 г. и хранившийся в коллекции кафедры биотехнологии Гродненского государственного университета.

Для изучения влияния почвенной биоты на динамику численности популяции *C. glutamicum* вносились живая и отмершая биомасса исследуемых бактерий 10^7 , 10^9 кл/г в стерильную и нестерильную почву. С этой целью *C. glutamicum* выращивали в течение 3 сут на мясопептонном бульоне с последующим центрифугированием (5000 об/мин) и трехкратным отмыванием биомассы от питательной среды. Эксперимент проводили в лабораторных микрокосмах с образцами пахотного горизонта окультуренной дерново-подзолистой почвы (Гроднен-

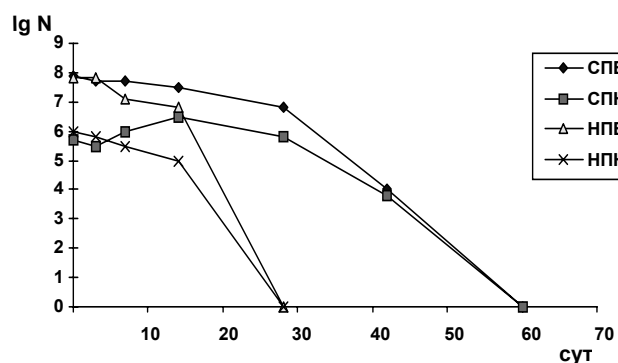
ская область) при давлении почвенной влаги $-0,005$ МПа и температуре 20 °С. Исходный уровень внесения *C. glutamicum* почву определяли методом посева бактериальной суспензии на плотную питательную среду — мясопептонный агар (МПА). В качестве контроля использовали почву без внесения популяции.

Лабораторный опыт проводился по следующей схеме.

1. Нестерильная почва + *C. glutamicum* 10^9 кл/г (НП 10^9).
2. Нестерильная почва + *C. glutamicum* 10^7 кл/г (НП 10^7).
3. Нестерильная почва + отмершая биомасса *C. glutamicum* 10^9 кл/г (НПУБ 10^9).
4. Нестерильная почва + отмершая биомасса *C. glutamicum* 10^7 кл/г (НПУБ 10^7).
5. Нестерильная почва без внесения *C. glutamicum* (НП К).
6. Стерильная почва + *C. glutamicum* 10^9 кл/г (СП 10^9).
7. Стерильная почва + *C. glutamicum* 10^7 кл/г (СП 10^7).
8. Стерильная почва без внесения *C. glutamicum* (СП К).

Выявление и количественный учет внесенной популяции в почве проводили с помощью посева на МПА с инкубацией чашек при 30 °С в течение 3 сут. Культура *C. glutamicum* идентифицировалась по характерной ярко-желтой окраске ее колоний с последующим микроскопированием. Предварительная обработка почвенной суспензии (1:100), направленная на разрушение микроколоний и десорбцию клеток с почвенных частиц, проводилась растиранием в стерильной ступке пестиком с резиновым наконечником.

Для анализа почвенной микробной системы проводили количественный учет почвенных микроорганизмов методами посева на плотную питательную среду (МПА) с применением стандартного метода. Активность каталазы определяли газометрическим методом, основанным на измерении скорости разложения перекиси водорода при ее взаимодействии с почвой по объему выделившегося кислорода [15].



Динамика численности популяции *Corynebacterium glutamicum* в стерильной и нестерильной почве: НПВ — нестерильная почва + *C. glutamicum* 10^9 кл/г; НПН — нестерильная почва + *C. glutamicum* 10^7 кл/г; СПВ — стерильная почва + *C. glutamicum* 10^9 кл/г; СПН — стерильная почва + *C. glutamicum* 10^7 кл/г (СП 10^7); N — количество кл/г почвы

Результаты и их обсуждение.

После внесения популяции *C. glutamicum* в дерново-подзолистую нестерильную почву на уровне 10^9 и 10^7 кл/г почвы наблюдалось постепенное снижение популяционной плотности бактерий, что видно на рисунке. В течение 14 сут эксперимента средняя скорость гибели популяции в нестерильной почве с высоким уровнем внесения составляла $0,0129$ ч $^{-1}$, с низким — $0,0110$ ч $^{-1}$ (табл. 1). В более поздние сроки скорость гибели популяции увеличивалась и к 28-м суткам была равна $0,0425$ и $0,0293$ ч $^{-1}$ (с внесением на уровне 10^9 и 10^7 кл/г соответственно). На 28-е сутки в обоих вариантах нестерильной почвы вносимые бактерии не регистрировались. Таким образом, в нестерильной почве с высоким уровнем внесения популяция отмирала быстрее, чем в почве с более низким уровнем интродукции.

Т а б л и ц а 1. Показатели скорости изменения плотности (r) и времени полужизни ($t_{1/2}$) популяции *C. glutamicum* в стерильной и нестерильной почве

Вариант опыта	Показатель	Время после интродукции <i>C. glutamicum</i> , сут					
		3	7	14	28	43	60
НП 10^9	r , ч $^{-1}$	0,0005	0,0145	0,0129	0,0425	—	—
	$t_{1/2}$, ч	1254,5	47,6	53,5	16,2	—	—
НП 10^7	r , ч $^{-1}$	0,0158	0,0031	0,0110	0,0293	—	—
	$t_{1/2}$, ч	43,7	221,1	62,2	23,5	—	—
СП 10^9	r , ч $^{-1}$	0,0075	0,0019	0,0032	0,0045	0,0065	0,0278
	$t_{1/2}$, ч	95,0	368,0	215,0	150,0	105,0	24,8
СП 10^7	r , ч $^{-1}$	0,0005	0,0048	0,0076	0,0007	0,0038	0,0264
	$t_{1/2}$, ч	1254,5	140,0	90,7	932,0	178,7	26,1

При интродукции *C. glutamicum* в стерильную почву выживаемость исследуемых бактерий увеличивалась в 2 раза, популяция сохранялась в почве до конца эксперимента, но на 60-е сутки не была выявлена. В стерильной почве с внесением продуцента 10^9 кл/г к 7-м суткам отмечалось небольшое увеличение численности исследуемой популяции, в более поздние сроки количество *C. glutamicum* медленно уменьшалось. Средняя скорость гибели на 14-е сутки составляла $0,0032 \text{ ч}^{-1}$, на 28-е сутки — $0,0045 \text{ ч}^{-1}$, а к концу опыта (60-е сутки) — $0,0278 \text{ ч}^{-1}$, то есть наблюдалось постепенное увеличение скорости вымирания популяции после ее попадания в почву (табл. 1).

В стерильной почве с низким уровнем интродукции (10^7 кл/г почвы) численность *C. glutamicum* в течение первых 3 сут незначительно уменьшалась, но к 14-м суткам отмечался достоверный рост обилия исследуемых бактерий в 5 раз, скорость увеличения плотности популяции к этому времени составляла $0,0076 \text{ ч}^{-1}$ (табл. 1). В последующие сроки происходило снижение численности *C. glutamicum*, и к 60-м суткам исследуемые бактерии погибали. Таким образом, во всех вариантах опыта скорость гибели объекта была выше в почве с более высоким уровнем внесения.

Наилучшие условия для выживания популяции *C. glutamicum* складывались в стерильной почве с низким уровнем внесения (10^7 кл/г почвы), где средняя скорость гибели была равна $0,0092 \text{ ч}^{-1}$. В то время как в вариантах с высоким уровнем внесения популяции (10^9 кл/г почвы) в стерильной почве этот показатель составлял $0,0126 \text{ ч}^{-1}$. В нестерильной почве с высоким и низким уровнем внесения — $0,0267$ и $0,0205 \text{ ч}^{-1}$ соответственно. Можно предположить, что на выживаемость популяции *C. glutamicum* оказывал влияние комплекс почвенных микроорганизмов, поскольку в нестерильной почве скорость гибели была выше, чем в стерильных образцах. Гибель популяции, возможно, связана с межпопуляционной конкуренцией за субстрат, но в основном определяется внутривидовыми процессами, так как *C. glutamicum* погибает во всех образцах почвы.

Т а б л и ц а 2. Изменение активности каталазы (мл $\text{O}_2/\text{г}$ почвы) после внесения в почву *C. glutamicum* ($n = 3$)

Вариант опыта	Время после внесения <i>C. glutamicum</i> в почву, сут				
	0	3	7	14	28
НП 10^9	*8,20±0,43	*5,70±0,43	*3,05±0,21	*1,30±0,14	1,10±0,21
НП 10^7	*1,70±0,21	1,40±0,28	0,45±0,70	1,00±0,28	1,20±0,14
НПУБ 10^9	1,50±0,67	0,75±0,70	0,75±0,14	0,85±0,70	1,10±0,14
НПУБ 10^7	1,50±0,70	0,75±0,70	1,20±0,01	0,35±0,21	1,10±0,14
НП К	1,60±0,21	0,45±0,70	1,15±0,21	0,20±0,14	0,80±0,21
СП 10^9	**3,90±0,42	**4,45±0,49	**4,70±0,43	**3,70±0,01	1,25±0,14
СП 10^7	0,50±0,14	0,75±0,70	0,75±0,75	0,53±0,21	0,45±0,70
СП К	*0,10±0,14	*0	0,10±0,15	0,30±0,14	0,25±0,35

* $P < 0,05$ по сравнению с контролем нестерильной почвы без внесения бактерий.

** $P < 0,05$ по сравнению с контролем стерильной почвой без внесения бактерий.

Исследование ферментативной активности почвы показало (табл. 2), что в момент внесения популяции *C. glutamicum* (0-е сутки) наибольшая активность каталазы (8,2 мл $\text{O}_2/\text{г}$ почвы) отмечалась в нестерильной почве с внесением бактерий в количестве 10^9 кл/г. В нестерильной почве с низким уровнем интродукции (10^7 кл/г) наблюдалось недостоверное увеличение активности каталазы — 1,7 мл $\text{O}_2/\text{г}$ почвы, в то время как в контрольных вариантах (без внесения бактерий) этот показатель составлял 1,6 мл $\text{O}_2/\text{г}$ почвы. Внесение в нестерильную почву отмершей биомассы бактерий не оказало существенного влияния на ферментативную активность почвы. В стерильной почве наибольшая активность каталазы наблюдалась в вариантах с высоким уровнем внесения *C. glutamicum* (3,9 мл $\text{O}_2/\text{г}$ почвы), причем этот показатель оставался примерно на таком же уровне продолжительное время и только к 28-м суткам эксперимента снизился примерно в 3 раза. Таким образом, на увеличение активности каталазы в почве оказывала влияние чужеродная популяция, вносимая в нее на высоком уровне, а снижение ферментативной активности происходило по мере отмирания интродуцируемой популяции и к концу эксперимента было сравнимо с контролем. Внесение в почву популяции *C. glutamicum* во всех вариантах опыта способствовало увеличению общего количества микроорганизмов за счет поступления в почву инокулированных бактерий

Т а б л и ц а 3. Показатели общего микробного числа (посев на МПА) в почве после внесения живой и отмершей биомассы *C. glutamicum*, кл/г ($n = 4$)

Вариант опыта	Время после внесения <i>C. glutamicum</i> в почву, сут				
	0	3	7	14	28
НП10 ⁹	$*(6,9\pm 0,8)\cdot 10^7$	$*(5,8\pm 1,3)\cdot 10^7$	$*(2,5\pm 0,5)\cdot 10^7$	$(4,4\pm 2,1)\cdot 10^6$	$(4,6\pm 0,1)\cdot 10^5$
НП10 ⁷	$*(8\pm 0,3)\cdot 10^5$	$(6\pm 0,6)\cdot 10^5$	$(1\pm 0,5)\cdot 10^6$	$(5,8\pm 1,4)\cdot 10^5$	$(4\pm 1,6)\cdot 10^5$
НПУБ10 ⁹	$(5,4\pm 0,5)\cdot 10^5$	$(6,2\pm 0,8)\cdot 10^5$	$(5,5\pm 1)\cdot 10^5$	$(5,2\pm 0,5)\cdot 10^5$	$(3,1\pm 0,6)\cdot 10^5$
НПУБ10 ⁷	$(5\pm 0,2)\cdot 10^5$	$(6,4\pm 1,2)\cdot 10^5$	$(5,2\pm 1,7)\cdot 10^5$	$(6,7\pm 1)\cdot 10^5$	$(2,9\pm 0,5)\cdot 10^5$
НПК	$(5,7\pm 0,1)\cdot 10^5$	$(5,4\pm 0,5)\cdot 10^5$	$(5,2\pm 1)\cdot 10^5$	$(5,4\pm 3,3)\cdot 10^5$	$(2,9\pm 1)\cdot 10^5$

* $P < 0,05$ по сравнению с контролем без внесения бактерий.

(табл. 3). Непосредственно после интродукции *C. glutamicum* показатель общего количества микроорганизмов в образцах почвы с высоким уровнем внесения был на два порядка выше, чем в контроле (без внесения бактерий) и составлял 10^7 кл/г почвы. Уже на 28-е сутки эксперимента численность почвенных бактерий сокращалась с 10^7 до 10^5 кл/г почвы. В почве с низким уровнем интродукции этот показатель достоверно увеличивался по сравнению с почвой без внесения бактерий только на 0-е сутки эксперимента, в более поздние сроки общее число микроорганизмов было сравнимо с контролем. Внесение в почву отмершей биомассы не оказывало существенного влияния на общее число бактерий.

Заключение. Полученные результаты позволяют выдвинуть предположение о механизмах интродукции и неприспособленности популяции *C. glutamicum* к выживанию в почве, неизбежности ее гибели в течение месяца, сроки выживаемости популяции оцениваются отрицательным влиянием почвенного микробного комплекса, так как в стерильной почве популяция сохраняется значительно дольше, микробное сообщество энзиматической реакцией и количественно реагирует на внесение чужеродной популяции по увеличению активности каталазы и общего микробного числа, через месяц результаты тестирования практически не отличались от контроля, что указывает на восстановление почвенного микробного комплекса по мере отмирания инородной популяции.

Литература

- Добровольская Т. Г. Структура бактериальных сообществ почв. М., 2002. С. 75—96.
- Звягинцев Д. Г. Почва и микроорганизмы. М., 1987. С. 146—235.
- Никитин Д. И., Никитина Э. С. Процессы самоочищения окружающей среды и паразиты бактерий (род *Bdellovibrio*). М., 1978. С. 69—80.
- Кожевин П. А. Микробные популяции в природе. М., 1989. С. 27—60.
- Кожевин П. А. Популяционная экология почвенных микроорганизмов: Дис. ... д-ра биол. наук. М., 2000. С. 20—28.
- Суховицкая Л. А., Сафронова Г. В., Клышко Г. М., Короленок Н. В. // Прикладная биохимия и микробиология. 2002. Т. 38, № 1. С. 73—78.
- Кожевин П. А. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 17. Почвоведение. 1992. № 2. С. 39—56.
- Звягинцев Д. Г. // Интродукция микроорганизмов в окружающую среду: Тез. докл. конф. М., 1992. С. 37—38.
- Ефремов А. Л. Микробиота и биогенность почв. Мн., 2002. С. 5—6.
- Дебабов В. Г. // Микробиология. 1991. Т. 60, № 1. С. 5—9.
- Кожевин П. А. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 17. Почвоведение. 2001. № 4. С. 44—47.
- Сямашка И. У., Лабанок А. Г. // Вестн. НАН Беларуси. Сер. біял. навук. 1995. № 3. С. 18—51.
- Кожевин П. А. // Интродукция микробных популяций в окружающую среду: Тез. докл. конф. М., 1992. С. 49—50.
- Кожевин П. А., Полянская Л. М., Лукин С. А. и др. // Микроорганизмы и охрана почв. М., 1989. С. 151—162.
- Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д. Г. Звягинцева. М., 1991. С. 59—62; 243—245.

ZHEBRAK I. S.

THE MECHANISMS OF INTRODUCTION OF *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* INTO STERILE AND NOT STERILE SOIL

Summary

The *Corynebacterium glutamicum* population, which is industrial producer of lysine was added into sterile and not sterile soil. Soil microbe complex influenced negatively on researching population surviving, because introduced bacterium survived twice longer in sterile soil than in not sterile and were not detected only on 60th day. The adding of *Corynebacterium glutamicum* into not sterile soil caused growing of microorganisms total number and increasing of catalase activity. These parameters were not differed from the control after one month that indicates soil microbe complex restoration with alien population dying.