

УДК 579.222.4: 550.72: 631.823

ДИНАМИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ЧИСЛЕННОСТИ КЛЕТОК ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ *BACILLUS MUCILAGINOSUS* И НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ СИЛИКАТНЫХ БАКТЕРИЙ ИЗ ДЕРНОВО-ПОДЗОЛИСТОЙ ПОЧВЫ В СИСТЕМЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ ПРИРОДНЫХ КРЕМНИЙСОДЕРЖАЩИХ МАТЕРИАЛОВ

Козлов А.В., Копосова Н.Н.

ФГБОУ ВО «Нижегородский государственный педагогический университет им. Козьмы Минина»,
Нижний Новгород, e-mail: a.v.kozlov_ecology@mail.ru

В условиях лабораторных экспериментов было изучено 30-дневное изменение численности живых микробных клеток чистой культуры *Bacillus Mucilaginosus*, а также накопительной культуры природного комплекса силикатных бактерий, происходящее при биохимической деградации природных кремнийсодержащих пород – диатомита, цеолита и бентонитовой глины. Бактерии были выделены из дерново-подзолистой легкосуглинистой почвы Нижегородской области. Для сравнения использовался штамм В-2609 бациллы *Bac. Mucilaginosus*. Было выявлено, что численность *Bac. Mucilaginosus* имела максимальное увеличение при деструкции бентонитовой глины (до $66,10 \times 10^6$ клеток/1 мл), оказалась на среднем уровне при деструкции диатомита ($17,80 \times 10^6$ клеток/1 мл) и была минимальной при деградации цеолита (до $2,13 \times 10^6$ клеток/1 мл). Штаммовый вариант изучаемой бациллы давал аналогичные, но более высокочисленные тенденции по породам. Накопительная культура природного комплекса почвенных силикатных бактерий дала максимальную численность на варианте с цеолитовой породой (до $476,3 \times 10^6$ клеток/1 мл), среднюю – на варианте с диатомитом (до $320,4 \times 10^6$ клеток/1 мл) и минимальную – на варианте с бентонитовой глиной (до $273,3 \times 10^6$ клеток/1 мл).

Ключевые слова: численность бактериальных клеток, силикатные бактерии, *Bacillus Mucilaginosus*, биохимическая деградация пород, диатомит, цеолит, бентонитовая глина

DYNAMIC CONDITION OF CAGES NUMBER OF *BACILLUS MUCILAGINOSUS* TRUE CULTURE AND SILICATE BACTERIA ACCUMULATIVE CULTURE FROM CESPITOSE-PODSOLIC SOIL IN SYSTEM OF NATURAL SILICEOUS MATERIALS BACTERIAL LEACHING

Kozlov A.V., Kuposova N.N.

Minin Nizhny Novgorod State Pedagogical University, Nizhny Novgorod,
e-mail: a.v.kozlov_ecology@mail.ru

In the conditions of laboratory experiments 30-day change of number of living microbic cells of true culture of *Bacillus Mucilaginosus*, and also accumulative culture of a natural complex of silicate bacteria, happening at biochemical degradation of natural siliceous breeds – diatomite, zeolite and bentonite clay has been studied. Bacteria have been allocated from the cespitose-podsolic sandy loam soil of the Nizhny Novgorod Region. For comparison bacillus of *Bac. Mucilaginosus* V-2609 strain was used. It has been revealed, that *Bac. Mucilaginosus* number had the maximum increase at destruction of bentonite clay (to $66,10 \times 10^6$ cages / 1 ml), it was at the average level at diatomite destruction ($17,80 \times 10^6$ cages / 1 ml) and was minimum at zeolite degradation (to $2,13 \times 10^6$ cages / 1 ml). The strain option of the studied bacillus gave similar, but more high-numerical tendencies on breeds. The accumulative culture of a natural complex of soil silicate bacteria gave the maximum number on option with zeolite breed (to $476,3 \times 10^6$ cages / 1 ml), average – on option with diatomite (to $320,4 \times 10^6$ cages / 1 ml) and minimum – on option with bentonite clay (to $273,3 \times 10^6$ cages / 1 ml).

Keywords: number of bacterial cages, silicate bacteria, *Bacillus Mucilaginosus*, biochemical degradation of breeds, diatomite, zeolite, bentonite clay

В почвоведении известен факт прямого участия всех микробиотических представителей как в первичной деструкции почвообразующих пород, так и в формировании профиля почвенного тела [3, 8]. Однако в практике почвенной микробиологии, к сожалению, пока недостаточно сведений о прямом участии некоторых родов почвообитающих микроорганизмов в деградации веществ, используемых в качестве удобрений и почвенных кондиционеров [2, 6, 7]. В том числе данный пробел имеется и в отношении эффектов от прямого (без участия собственно почвенного вещества) биохими-

ческого воздействия силикатных бактерий, выделенных из конкретных природных биогеоценозов, на вещество высококремнистых пород – диатомита, цеолита и бентонитовой глины [5].

Цель исследования. Целью исследования настоящей работы явилось изучение динамики численности живых клеток накопительной природной культуры силикатных бактерий, а также чистой культуры *Bacillus Mucilaginosus*, выделенных из дерново-подзолистой легкосуглинистой почвы Нижегородской области, в условиях осуществления биохимической деградации вещества

природных кремнийсодержащих пород, которые используются в наших полевых исследованиях в качестве удобрений и почвенных кондиционеров.

Материалы и методы исследования

Исследования проводились в 2017 году на базе научно-образовательного центра «Биотехнология» и лабораторного комплекса «Эколого-аналитическая лаборатория мониторинга и защиты окружающей среды» Мининского университета в виде серии постановочных лабораторных экспериментов с природными кремнийсодержащими породами. Данные материалы подвергались микробиологической деградации чистой культурой *Bacillus Mucilaginosus* и накопительной культурой комплекса силикатных бактерий, выделенных из дерново-подзолистой легкосуглинистой почвы природного биогеоценоза (лесной массив Борского района Нижегородской области).

Объектами исследований являются кремнийсодержащие породы – диатомит Инзенского месторождения (Ульяновская область), цеолит Хотынецкого месторождения (Орловская область) и бентонитовая глина Зырянского месторождения (Курганская область), обобщенный химический состав которых представлен в таблице.

Накопительную культуру комплекса силикатных бактерий получали путем засева стерильного жидкого варианта питательного агара Александра-Зака (ААЗ) навеской подготовленной почвы с последующим культивированием бактериальной биомассы в термостате в течение 7 суток при температуре +26°C. Чистую природную культуру *Bac. Mucilaginosus* получали аналогичным способом в виде двойного посева идентифицированных клеток на селективном жидком варианте питательного агара Няниковой-Виноградова (АНВ) [10].

В-2609, лиофилизат которого был закуплен во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ФГУП «ГосНИИгенетика»). Первичная биомасса данного штамма была получена аналогичным с природными клетками образом при его двукратном культивировании на L-агаре (АЛ) в соответствии с рекомендациями изготовителя.

Затем производился засев испытуемых пород полученными бактериальными комплексами. Опыты ставили в стерильных конических колбах на 100 мл, в которые асептически помещалось по 40 мл селективной жидкой питательной среды и точно по 1,000 г высушенной кремнийсодержащей породы, после чего полученная система асептически заседалась 10 мл суспензии 7-суточной накопительной культуры силикатных бактерий, а также чистой культуры природного и штаммового вариантов *Bac. Mucilaginosus* [1, 4].

Засеянные колбы помещались в термостат и культивировались при +26°C в течение 30 суток; 2 раза в сутки содержимое колб встряхивалось в течение 1-го часа. Через определенные интервалы времени (на 1, 3, 5, 7, 10, 12, 15, 20, 25 и 30 день) производилось определение численности живых клеток бактерий люминесцентной микроскопией с акридином оранжевым [9] с помощью микроскопа «БиоТех-330-LED2-Г».

Математическая обработка результатов исследований выполнена методами вариационной статистики с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007; повторность в опытах четырехкратная.

Результаты исследования и их обсуждение

На рис. 1 представлена 30-дневная динамика численности живых клеток чистой природной культуры *Bacillus*

Обобщенный химический состав высококремнистых пород

Порода	ИЕ*	Элемент в оксидной форме (на абс.-сух. вещество)				
		SiO ₂	P ₂ O ₅	K ₂ O	CaO	MgO
Диатомит	80					
- валовая форма, %		83,1	0,05	1,25	0,52	0,48
- подвижная форма, мг/кг		12200	37	350	10	39
Цеолит	48					
- валовая форма, %		56,6	0,23	1,82	13,3	1,90
- подвижная форма, мг/кг		7950	260	250	4800	1600
Бентонит	150					
- валовая форма, %		52,3	0,12	0,92	5,5	3,2
- подвижная форма, мг/кг		10500	165	87	46,1	14,2

* – ионообменная емкость, мг-экв./100 г

Для сравнения жизнеспособной численности природной клетки *Bac. Mucilaginosus* использовали условный эталон – аналогичную бактерию штамма

Mucilaginosus и штамма В-2609, принято за условный эталон, в системе «диатомит-культура».

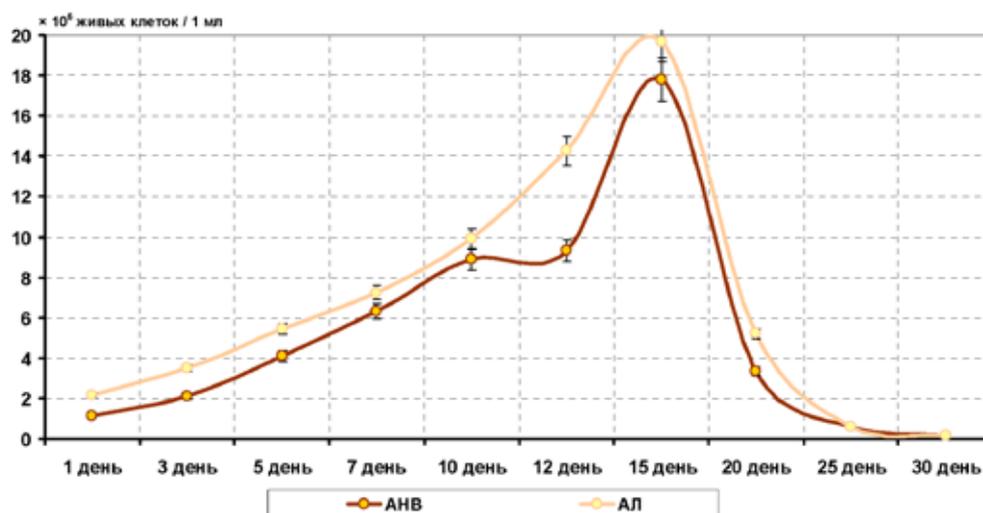


Рис. 1. Динамика численности живых клеток чистой почвенной культуры (АНВ) и штамма В-2609 (АЛ) *Bacillus Mucilaginosus* при биохимической деградации диатомита Инзенского месторождения

Нужно сказать, что численность клеток *Vac. Mucilaginosus* обоих рассматриваемых вариантов увеличивалась достаточно плавно к 15-му дню культивирования, где составила $17,80 \times 10^6$ клеток/1 мл по почвенной культуре и $19,69 \times 10^6$ клеток/1 мл по эталонному штамму В-2609. В течение всей экспозиции эксперимента с диатомитом численность штаммовых клеток была стабильно выше количества природного аналога.

Данные рис. 2 отражают 30-дневную динамику численности живых клеток чистой природной культуры *Bacillus Mucilaginosus* и штамма В-2609, принятого за условный эталон, в системе «цеолит-культура».

При бактериальной деструкции цеолита численность почвенной культуры *Vac.*

Mucilaginosus увеличивалась не с такой интенсивностью, как на варианте с диатомитом. Здесь наибольшее количество живых клеток было отмечено на 10-й и 12-й дни эксперимента – $7,82 \times 10^6$ и $5,19 \times 10^6$ клеток/1 мл. Количество клеток штамма В-2609 аналогичным образом увеличивалось к 10-му дню, где составило $7,82 \times 10^6$ клеток/1 мл. На 15-й и 20-й дни численность была практически неизменна (плато в $3,99$ – $3,83 \times 10^6$ клеток/1 мл), далее резко шел спад жизнеспособности культуры.

На рис. 3 показана 30-дневная динамика численности живых клеток чистой природной культуры *Bacillus Mucilaginosus* и штамма В-2609, принятого за условный эталон, в системе «бентонит-культура».

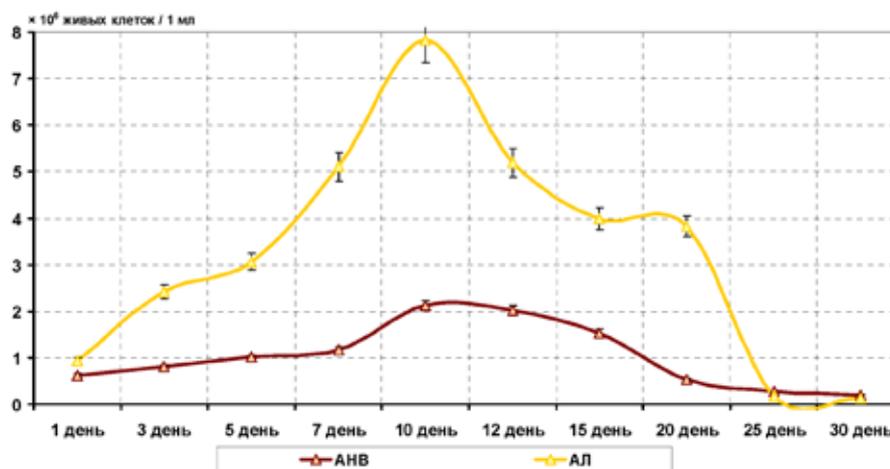


Рис. 2. Динамика численности живых клеток чистой почвенной культуры (АНВ) и штамма В-2609 (АЛ) *Bacillus Mucilaginosus* при биохимической деградации цеолита Хотынецкого месторождения

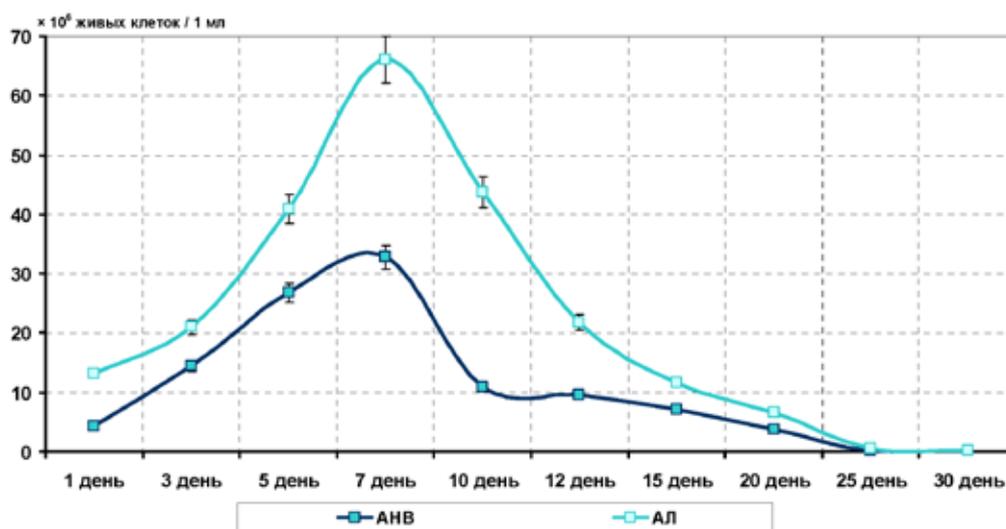


Рис. 3. Динамика численности живых клеток чистой почвенной культуры (АНВ) и штамма В-2609 (АЛ) *Bacillus Mucilaginosus* при биохимической деградации бентонита Зырянского месторождения

Из всех изучаемых пород вариант с бентонитовой глиной оказался самым многочисленным по количеству клеток бактерий *Vac. mucilaginosus*. Кроме того, на данном варианте максимальный пик численности бацилл пришелся уже на 7-й день как по почвенной культуре, так и по штамму. В частности, по природной культуре данная численность составила $32,84 \times 10^6$ клеток/1 мл, в то время как по штамму В-2609 –

$66,10 \times 10^6$ клеток/1 мл. В последующие дни экспозиции эксперимента с бентонитом жизнеспособность бацилл стабильно снижалась.

Данные рис. 4 показывают 30-дневную динамику численности живых клеток накопительной природной культуры комплекса силикатных бактерий в системе «порода-культура» с различными кремнийсодержащими материалами.

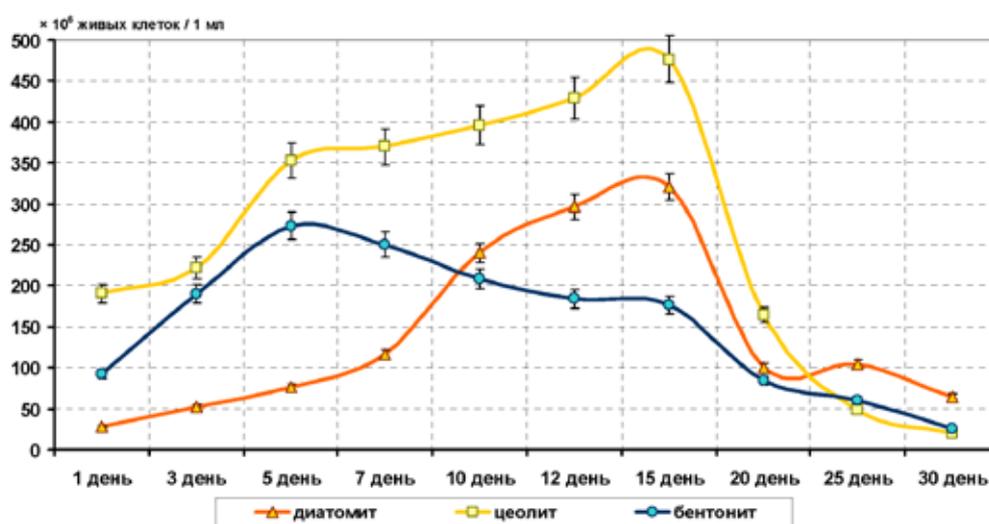


Рис. 4. Динамика численности живых клеток накопительной почвенной культуры комплекса силикатных бактерий при биохимической деградации кремнийсодержащих пород

В отличие от обеих изучаемых культур *Bac. Mucilaginosus*, численность накопительной культуры комплекса силикатных бактерий, полученная на агаре Александра-Зака, по-иному изменялась в зависимости от той или иной кремнийсодержащей породы. Так, на варианте с диатомитом пик численности клеток пришелся на 15-й день и составил $320,4 \times 10^6$ клеток/1 мл. На варианте с цеолитом в это же время численность составила $476,3 \times 10^6$ клеток/1 мл. Однако на варианте с бентонитовой глиной пик максимального числа пришелся много раньше – на 5-й день ($273,3 \times 10^6$ клеток/1 мл), после чего показатель снижался до плато, пришедшегося на 12-й и 15-й дни ($183,9$ – $176,1 \times 10^6$ клеток/1 мл), а затем спадал до уровня численности бактерий остальных вариантов исследования.

Заклучение

В условиях лабораторных экспериментов было изучено 30-дневное изменение численности живых микробных клеток чистой культуры *Bacillus Mucilaginosus*, а также накопительной культуры природного комплекса силикатных бактерий, происходящее при биохимической деградации природных кремнийсодержащих пород – диатомита, цеолита и бентонитовой глины. Бактерии были выделены из дерново-подзолистой легкосуглинистой почвы Нижегородской области. Для сравнения использовался штамм В-2609 бациллы *Bac. Mucilaginosus*. Было выявлено, что численность *Bac. Mucilaginosus* имела максимальное увеличение при деструкции бентонитовой глины (до $66,10 \times 10^6$ клеток/1 мл), оказалась на среднем уровне при деструкции диатомита ($17,80 \times 10^6$ клеток/1 мл) и была минимальной при деградации цеолита (до

$2,13 \times 10^6$ клеток/1 мл). Штаммовый вариант изучаемой бациллы давал аналогичные, но более высокочисленные тенденции по породам. Накопительная культура природного комплекса почвенных силикатных бактерий давала максимальную численность на варианте с цеолитовой породой (до $476,3 \times 10^6$ клеток/1 мл), среднюю – на варианте с диатомитом (до $320,4 \times 10^6$ клеток/1 мл) и минимальную – на варианте с бентонитовой глиной (до $273,3 \times 10^6$ клеток/1 мл).

Список литературы

1. Биогeотехнология металлов: практическое руководство. – М.: Центр международных проектов ГКНТ, 1989. – 375 с.
2. Бочарникова Е.А. Кремниевые удобрения и мелиоранты: история изучения, теория и практика применения / Е.А. Бочарникова, В.В. Матыченков, И.В. Матыченков // Агрoхимия. – 2011. – № 7. – С. 84–96.
3. Добровольский Г.В. Экология почв / Г.В. Добровольский, Е.Д. Никитин. – М.: Изд-во МГУ, 2012. – 412 с.
4. Козлов А.В. Лабораторно-инструментальные методы исследований в экологии объектов окружающей среды. – Н. Новгород: НГПУ им. К. Минина, 2016. – 89 с.
5. Козлов А.В. Роль и значение кремния и кремнийсодержащих веществ в агроэкoсистемах / А.В. Козлов, А.Х. Куликова, Е.А. Яшин // Вестник Мининского университета. – 2015. – № 2 (10). – С. 23.
6. Козлов А.В. Экологическая оценка влияния диатомита на фитоценоз и состояние почвенно-биотического комплекса светло-серой лесной легкосуглинистой почвы: автореф. дисс. канд. биол. наук. – Москва, 2013. – 24 с.
7. Матыченков В.В. Роль подвижных соединений кремния в растениях и в системе «почва-растение»: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. – Пущино, 2008. – 34 с.
8. Муха В.Д. Естественно-антропогенная эволюция почв (общие закономерности и зональные особенности). – М.: КолосС, 2004. – 271 с.
9. Нетрусов А.И. Микробиология / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – М.: Академия, 2006. – 352 с.
10. Няникова Г.Г. *Bacillus Mucilaginosus*. Перспективы использования / Г.Г. Няникова, Е.Я. Виноградов. – С-Пб.: НИИХ, С-ПбГУ, 2000. – 124 с.