

# ПАРАМЕТРЫ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ЭДАФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

В результате исследования параметров жизнедеятельности клубеньковых бактерий культур-фитомелиорантов (донника и люцерны) в условиях засоления установлено, что наиболее токсичным для клубеньковых бактерий являлось содовое засоление. При смешанном типе засоления наличие соды также усиливало ингибирование ризобий в общем составе солей. Участие гипса при смешанном засолении многократно ослабляет токсичность солевой среды для бактерий. Это указывает на необходимость нейтрализации техногенно засоленных и природных грунтов, буровых шламов и почв гипсованием при проведении рекультивационных работ.

**Ключевые слова:** химизм и степень засоления, клубеньковые бактерии, осмотическое давление, щелочность среды, токсичность.

L.N. Skipin, V.S. Petukhova, N.V. Perfiliev, N.V. Khramtsov

## VITAL FUNCTION PARAMETERS OF NODULE BACTERIA IN CHANGING EDAPHIC FACTORS

As a research result on the vital function parameters of nodule bacteria cultures - phyto-ameliorators (sweet clover and alfalfa) in the salinization conditions it is found that the most toxic for nodule bacteria was soda salinization. In the mixed type of salinization the soda presence also increased the inhibition of rhizobia in the overall salt composition. The gypsum presence in the mixed salinization weakens manyfold the salt medium toxicity for bacteria. This indicates to the necessity of neutralization of anthropogenically salted and natural soils, oil rigs limes and soil by gypsuming in the recultivation process.

**Key words:** chemism and salinization degree, nodule bacteria, osmotic pressure, medium alkalinity, toxicity.

В рекультивируемых засоленных почвах, грунтах, буровых шламах (БШ) численность клубеньковых бактерий мала или отсутствует, поэтому можно ожидать благоприятные результаты от нитрагирования семян бобовых трав. Эффективность биологического этапа рекультивации будет во многом определяться качеством подбора растений и выбором способов активизации функционирования фитоценозов [3].

Важно отметить, что изучаемые нами БШ имеют разный химизм и степень засоления. Это требует научно обоснованного подбора культур-фитомелиорантов, способных выносить характерный для них химизм и степень засоления. Учитывая, что рост и развитие бобовых культур протекают совместно с клубеньковыми бактериями, необходимо изучить характер влияния присутствующих солей как на растение-хозяина, так и на инокулянты.

**Цель исследований.** Установить влияние концентрации солей в чистом и смешанном виде на жизнедеятельность клубеньковых бактерий донника и люцерны.

### Задачи исследований:

- изучить влияние токсичности солей на жизнеспособность клубеньковых бактерий донника и люцерны в питательных средах;
- определить реакцию клубеньковых бактерий донника и люцерны на pH среды и осмотическое давление;
- провести сравнительное изучение жизнеспособности ризобий донника и люцерны.

Для проведения этих исследований нами проводился ряд лабораторных экспериментов по влиянию разной концентрации солей, присущих БШ, засоленным грунтам и почвам, на рост и развитие клубеньковых бактерий.

**Условия проведения и методы исследований.** Для проведения опытов клубеньковые бактерии берутся непосредственно из ризоторфина с 5-кратным разбавлением. В качестве традиционной питательной среды используется бобовый агар. Его готовят следующим образом: 50 г гороха заливают 1 л водопроводной воды и варят; отвар фильтруют через вату, доводят до 1 л и добавляют 10 г сахарозы, 0,5 г  $K_2HPO_4$ , 20 г агара, количество и качество солей, соответствующее изучаемому варианту. Среду стерилизуют в автоклаве при 120°C. После этого на агаровую среду производят посев с указанным разведением, засеянные чашки Петри помещают в термостат (при температуре 28°C), на 3-е сутки проводится подсчет колоний и описание культуральных признаков. Опыты закладывались в трехкратной повторности. Методика проведения лабораторных опытов изложена Аристовской, Владимирской, Голлербах и др. (1962) [1].

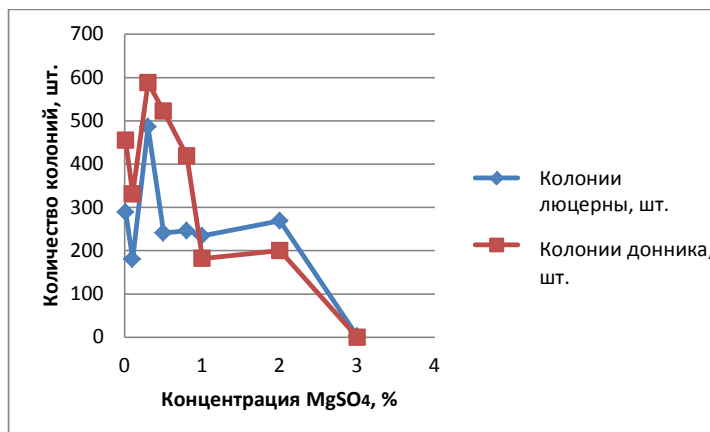


Рис. 1. Влияние концентрации  $MgSO_4$  (3%) на число колоний клубеньковых бактерий люцерны и донника

Лабораторные опыты направлены на изучение прямого действия концентрации, типа засоления, осмотического давления и pH среды на численность колоний клубеньковых бактерий люцерны и донника. Знание этих закономерностей позволит с большей целесообразностью и результативностью использовать инокуляцию семян люцерны и донника при залужении БШ, засоленных грунтов и почв. Выявление токсичных концентраций для ризобий по отдельным солям позволит установить наиболее вредоносные из них и выявить их долю влияния при смешанном засолении.

**Результаты исследований.** Добавление сернокислого магния в питательную среду показало, что полное угнетение клубеньковых бактерий люцерны и донника наступает при 3%-й концентрации данной соли. Оптимальный рост и развитие ризобий отмечаются при 0,3%-й степени засоления. Осмотическое давление при этой градации составляет 3,14 атм, pH – 6,65 (рис. 1).

Действие натриевых солей на рост и развитие микроорганизмов в настоящее время остается малоизученным. Так, гибель клубеньковых бактерий люцерны и донника при внесении сульфата натрия в бобовый агар соответствовала степени засоления 2 %, величина осмотического давления этой смеси составляла 8,9 атм, pH – 6,6 (рис. 2). Это также свидетельствует, что клубеньковые бактерии по отношению к названному характеру засоления значительно чувствительнее. При данном химизме достаточно благоприятно размножились ризобии люцерны с концентрацией до 0,8 % (осмотическое давление 5,2 атм, pH – 6,72). Применительно к клубеньковым бактериям донника такой закономерности не отмечалось, очевидно, что это во многом определяется особенностями происхождения и различием самих изучаемых штаммов.

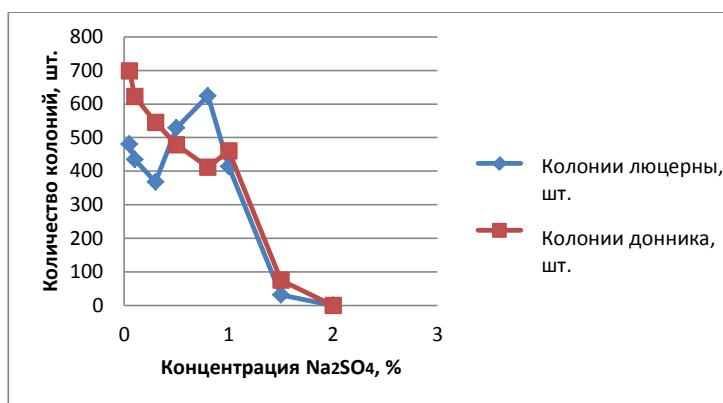


Рис. 2. Действие концентрации  $Na_2SO_4$  на число клубеньковых бактерий люцерны и донника

При хлоридном засолении питательной смеси (рис. 3) гибель колоний ризобий и их оптимальное развитие во многом соответствовали параметрам сульфатного химизма ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ).

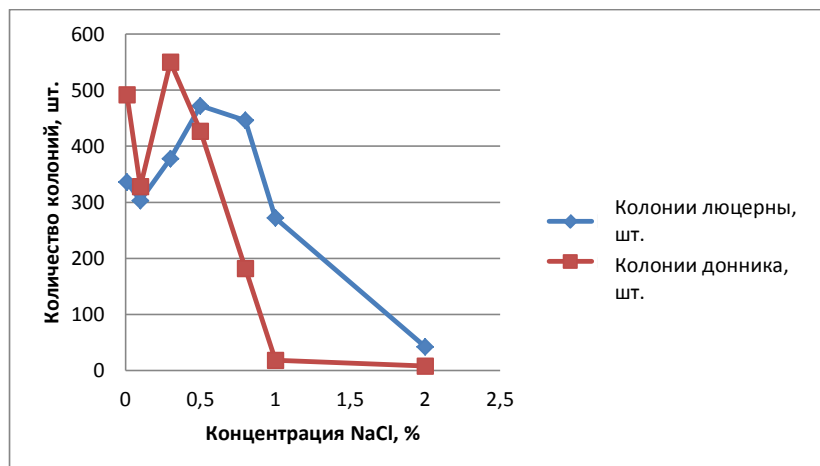


Рис. 3. Изменение числа колоний клубеньковых бактерий люцерны и донника от концентрации  $\text{NaCl}$

Полученные данные при использовании солей  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и  $\text{NaHCO}_3$  (рис. 4) свидетельствуют о том, что наиболее токсичными из всех вышеперечисленных солей являются двууглекислая и нормальная сода. Здесь гибель колоний азотфиксирующих бактерий люцерны наступает при степени засоления 0,3–0,5 %. Большой токсичностью обладал гидрокарбонат натрия (осмотическое давление 4,32 атм, pH–9,20), значительное угнетение ризобий проявлялось на бобовом агаре уже при содержании  $\text{NaHCO}_3$  0,1%, главной причиной этого является сильное подщелачивание питательной среды.

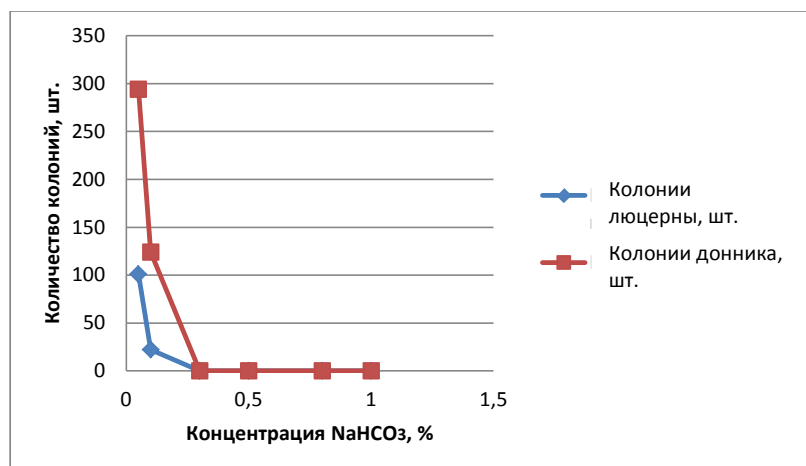


Рис. 4. Действие степени засоления  $\text{NaHCO}_3$  на число клубеньковых бактерий люцерны и донника

Наличие нормальной соды в засоленных почвах и грунтах данного региона, как правило, незначительное. Однако ряд ученых отмечают, что в небольших концентрациях  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  оказывает сильное стимулирующее действие на развитие аммонификаторов и нитрификаторов (рис. 5). В наших исследованиях по отношению к клубеньковым бактериям такой закономерности не проявлялось.

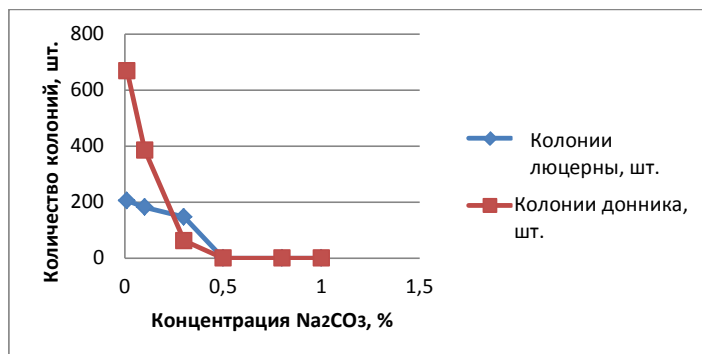


Рис. 5. Влияние степени засоления  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  на число колоний клубеньковых бактерий люцерны и донника

Относительно высокое содержание соды присуще БШ. Данные рисунка 5 свидетельствуют о том, что преобладание соды в общем составе солей определяет высокую токсичность для клубеньковых бактерий. Критическое состояние солей для ризобий здесь находится на уровне 0,4 % (рН–9,40).

Таким образом, проведенные опыты позволили определить влияние степени засоления на жизнедеятельность ризобий. Установлен критический уровень содержания каждой соли в чистом виде, при котором наступает практически полная гибель микроорганизмов. Выявлено, что клубеньковые бактерии в большей степени отрицательно реагировали на щелочную реакцию питательной среды. Такая реакция создавалась при участии нормальной и двууглекислой соды. Так, токсичность гидрокарбонатной и нормальной соды была в 4–10 раз выше, чем нейтральных солей. Нейтральные типы засоления, представленные одной или несколькими солями с участием натрия и магния при небольших концентрациях (0,3–0,8%), благоприятно сказываются на жизнедеятельности клубеньковых бактерий в питательных средах. При уровне засоления 2–3 % они способны полностью подавлять рост и развитие ризобий.

Анализ полученных результатов свидетельствуют, что на всех средах со смешанным нейтральным типом засоления полная гибель колоний отмечалась при рН 6,1–7,3 (осмотическое давление 8,0–24,8 атм). На средах с полным или частичным участием соды это явление отмечалось при рН 9,0–10,3 (осмотическое давление 2,9–9,4 атм). Такая закономерность дает основание утверждать, что определяющим фактором в жизни ризобий при нейтральном характере засоления является непосредственно токсичность самой соли и в меньшей степени – вызываемое ею осмотическое давление. Невысокое осмотическое давление и концентрация солей в средах с участием соды, соответствующие гибели клубеньковых бактерий, указывают на преобладающее действие здесь фактора ингибирования самой соды и щелочной реакцией среды.

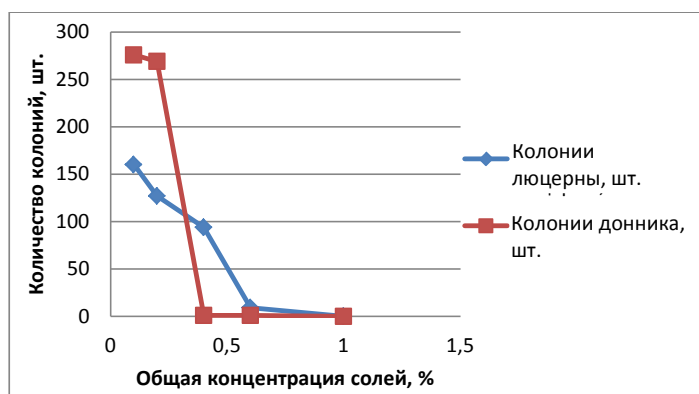


Рис. 6. Изменение численности колоний клубеньковых бактерий люцерны и донника от степени сульфатно-содового засоления

Изучение природного и техногенного сульфатно-содового засоления показало, что преобладание соды в общем составе солей определяет высокую токсичность для клубеньковых бактерий (рис. 6). Критическое состояние солей для ризобий здесь находится на уровне 0,4 % (рН=9,40).

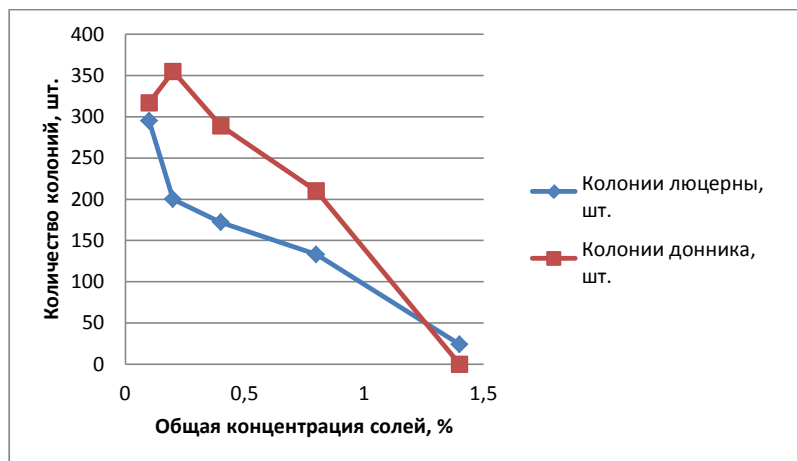


Рис. 7. Изменение численности колоний клубеньковых бактерий люцерны и донника от степени сульфатно-хлоридного засоления

Из рисунка 7 видно, что при сульфатно-хлоридном химизме порог токсичности для клубеньковых бактерий люцерны наступает при концентрации солей 1,4 %. Это свидетельствует о том, что на средах сульфатно-содового засоления предел гибели для ризобий проявляется при содержании солей в 2,3 раза меньше, чем на нейтральном засолении.

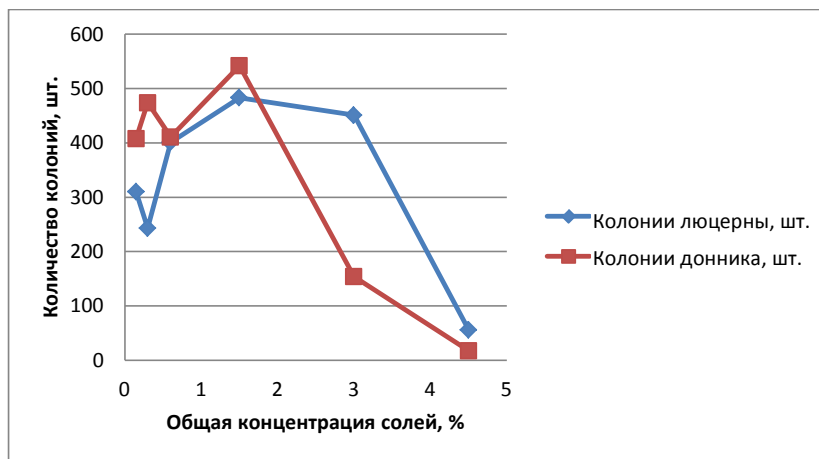


Рис. 8. Действие степени хлоридно-сульфатного засоления с гипсом на численность клубеньковых бактерий люцерны

Наличие кальция гипса в сильной степени ослабляет токсичность смешанного состава солей для клубеньковых бактерий люцерны (рис. 8). Критическая концентрация солей для жизнедеятельности бактерий здесь наступает при 4,5 % (рН=7,3, осмотическое давление 24,8 атм). Такое насыщение солей в естественных условиях возможно при внесении высоких доз гипса и при слабом оттоке продуктов обменных реакций.

По мнению ученых [Takahashi, Gibbons, 1959], присутствие кальция и магния делает клетки микроорганизмов менее чувствительными к изменению концентрации солей в среде [5]. При этом клетки способны выносить более высокое осмотическое давление. По данным ряда исследователей [Brisson, Vargues, 1963; Вяткин, 1959], при отсутствии ионов Ca и Mg подавляется деление клеток и наблюдается явление их лизиса [3, 4]. Изменение химизма засоления с использованием мелиоранта ослабляет токсичность сульфатно-содового засоления для ризобий люцерны в 7,5 раза. При уровне засоления в 1,5 % (рН–6,40, осмотическое давление 8,3 атм) здесь отмечалось благоприятное действие на рост и развитие бактерий.

Изучая вопрос об антагонизме ионов, Штапп и Рушман (1924) установили, что смесь из пяти солей (NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>), взятая каждая в определенных количественных соотношениях, создает раствор, более благоприятный для развития азотобактера, содержащий одну из указанных солей.

Таким образом, наличие соды в составе солей играет определяющую роль. Так, концентрация, соответствующая уровню токсичности для клубеньковых бактерий донника и люцерны при отдельном засолении Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и NaCl соответствовала 2 %. Присутствие этих солей в сульфатно-содовом засолении не снижало показателя токсичности. Гибель колоний ризобий здесь происходила при концентрации 0,4–0,6 %. Аналогичная закономерность (1,4 %) отмечалась и при сульфатно-хлоридном засолении, где участие соды было незначительным.

Анализ полученных результатов свидетельствует, что на всех средах с нейтральным типом засоления полная гибель колоний отмечалась при рН 6,1–7,3 (осмотическое давление 8,0–24,8 атм). На средах с полным или частичным участием соды это явление отмечалось при рН 9,0–10,3 (осмотическое давление 2,3–9,4 атм). Такая закономерность дает основание утверждать, что определяющим фактором в жизни ризобий при нейтральном характере засоления является непосредственно токсичность самой соли и в меньшей степени – вызываемое ею осмотическое давление. Невысокое осмотическое давление и концентрация солей в средах с участием соды, соответствующие гибели клубеньковых бактерий, указывают на преобладающее действие здесь фактора ингибирования самой соды и щелочной реакцией среды.

Присутствие кальция гипса в составе легкорастворимых солей усиливает устойчивость микроорганизмов к повышенной концентрации солей в 7,5 раза в сравнении с сульфатно-содовым засолением.

#### Литература

1. Большой практикум по микробиологии / Т.В. Аристовская, М.Е. Владимирская, М.М. Голлербах [и др.]. – М.: Высш. шк., 1962. – 487 с.
2. Вяткин В.В. Влияние солей магния на *Aspergillus niger* // Физиология и биохимия микроорганизмов: сб. тр. / Ин-т микробиологии АН СССР. – 1959. – 286 с.
3. Экология и рекультивация техногенных ландшафтов / И.М. Гаджиев, В.М. Курачев, Ф.К. Рагим-заде [и др.]. – Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1992. – 305 с.
4. Brisson J., Vargues H. Action des cations Ca et Mg sur la croissance de quelques bacteries halophiles d'origine marine // Ann. Inst. Pasteur. – 1963. – № 3. – P. 598.
5. Takahshi J., Gibbons N.E. Effect of salt concentration of the morphology and chemical composition of *Micrococcus halogenitricans* // Canad. J. Microbiol. – 1959. – № 1. – P. 25–35.

