СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОЛОГИЯ, 2014, № 5, с. 107-112

Почвенная микробиология

УДК 631.147:579.64 doi: 10.15389/agrobiology.2014.5.107rus

ИНТРОДУКЦИЯ В ПОЧВУ *Bacillus megaterium* 501^{rif}: ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ВЫЖИВАНИЕ, СПОРООБРАЗОВАНИЕ И РАЗЛОЖЕНИЕ ГЕРБИЦИДА ПРОМЕТРИНА

Ю.В. КРУГЛОВ, Т.О. ЛИСИНА

Вопросы интродукции микроорганизмов в почву относятся к фундаментальным основам применения микробных препаратов в земледелии, растениеводстве и экологии. Эффективность интродукции зависит от совокупности многих факторов — вида и штамма микроорганизма, физико-химических свойств почвы, растительного покрова, климата и т.д., которые изучены недостаточно, что обусловливает высокую вариабельность результатов применения микробных препаратов. В настоящей работе впервые исследована динамика роста и спорообразования у интродуцируемого в дерново-подзолистую почву штамма *Bacillus megaterium* 501^{rif} в зависимости от температуры почвы, содержания органического вещества и 2-метилтио-4,6-бис (изопропиламино)-симтриазина (гербицид прометрин). В лабораторных опытах было установлено, что оптимальные условия для интродукции бактерий складываются при температуре 20 °С: спустя 3 сут после инокуляции титр бактерий в почве возрастал почти на порядок и оставался таким до окончания эксперимента (32 сут). Интродуцированная культура *B. megaterium* 501^{rif} в течение всего опыта находилась в форме физиологически активных вегетативных клеток, становясь конкурентоспособным компонентом почвенного микробиома. Дополнительное введение в почву органического вещества в виде соломы зерновых и кукурузной муки в этих условиях приводило к увеличению численности интродуцируемых бактерий на 1-2 порядка. При 37 °С общая численность *B. megaterium* 501^{rif} снижалась в несколько раз и стабилизировалась на установившемся уровне до конца опыта. При этом 100 % клеток бактерий формировали споры и находились в физиологически неактивном состоянии. Температура ниже физиологического минимума репродукции *B. megaterium* (4 °С) подавляла спорообразование и приводила к быстрому отмиранию вегетативных клеток бактерий, вносимых в почву. Их общая численность в течение месяца уменьшалась в 1000 раз. Эти данные приводят к заключению, что низкотемпературный шок снижает конкурентоспособность *B. megaterium* в отношении аборигенной микрофлоры и устойчивость интродуцируемой культуры к бактерицидным продуктам метаболизма почвенного биома. Показано, что при оптимальной температуре (20 °С) инокуляция почвы штаммом *B. megaterium* 501^{rif} и дополнительное внесение органического вещества в виде соломы ускоряли разложение прометрина, что потенциально может быть использовано в биотехнологии ремедиации почвы, загрязненной этим гербицидом.

Ключевые слова: *Bacillus megaterium*, спорообразование, интродукция, почва, температурный режим, органическое вещество, прометрин.

Биопрепараты на основе бактерий применяются в практике сельского хозяйства для стимуляции роста и развития растений, их защиты от фитопатогенов и вредителей, а также очищения почв от ксенобиотиков (1-4). При этом особое место занимают биопрепараты аэробных споровых бактерий, относящиеся к роду *Bacillus*. В растениеводстве широкое применение нашли средства на основе *B. thuringiensis* (5, 6), *B. subtilis* (7), *B. megaterium* (8-10). Они достаточно технологичны при производстве, имеют длительный срок хранения, удобны для применения в полевых условиях. Вместе с тем эффективность использования таких препаратов варьирует в широком диапазоне из-за малой изученности поведения интродуцируемых в почву бацилл.

Споровые бактерии широко распространены в различных типах почв. Их численность зависит от почвенно-климатических условий и растительного покрова и составляет от 10^3 до 10^6 КОЕ/г (11). Одни авторы (11, 12) считают эти бактерии свободноживущими почвенными микроорганизмами, другие (13) — напротив, обычными обитателям ризосферы, по крайней мере, ряда растений, а таких, как *B. subtilis* и *B. megaterim*, относят к факультативным эндофитам (14, 15). По данным А.И. Мелентьева (16),

приживаемость споровых бактерий в ризосфере зерновых культур зависела от вносимого количества, вида и штамма интродуцента. Их численность на корнях растений варьировала в среднем от 10^4 до 10^7 КОЕ/г корней и, как правило, к концу вегетации была ниже исходного содержания. Бактерии в основном находились в виде спор, которые физиологически неактивны и, соответственно, не могут каким-либо образом влиять на рост и развитие растений.

Что касается судьбы споровых аэробных бактерий, инокулируемых в почву, то этот вопрос практически не изучен. Недостаточные знания в этой области не позволяют оптимизировать условия жизнедеятельности бацилл в почве и эффективно использовать биопрепараты на их основе для повышения продуктивности растений и биоремедиации почв.

Нашей целью было изучение влияния различных факторов на результаты интродукции *Bacillus megaterium* в почву и деградацию гербицида прометрина.

Методика. В опытах использовали устойчивый к антибиотику рифампицину мутантный штамм *B. megaterium* 501^{rif}, полученный градиентным отбором устойчивых резистентных форм (17) на основе исходного родительского штамма *B. megaterium* 501, который был выделен нами из чернозема обыкновенного среднесуглинистого (Кокчетавская обл., Казахстан). *B. megaterium* 501 депонирован в ведомственной коллекции микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВКСХМ, Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии). Биомассу *B. megaterium* 501^{rif} выращивали в колбах Эрленмейера на ротационной качалке (УМВТ-12-250, «Эллион», Россия) при интенсивной аэрации (140 об/мин). Состав питательной среды (г/л): K_2HPO_4 — 1,6, KH_2PO_4 — 0,4, NH_4NO_3 — 0,5, $MgSO_4$ — 0,2, $CaCO_3$ — 0,025, $FeSO_4$ — 0,025, дрожжевой экстракт — 0,2, сахароза — 10, pH 6,8-7,0. Дерново-подзолистую легкосуглинистую почву (pH 6,7) расфасовывали в пластмассовые емкости и инокулировали 2-суточной жидкой культурой *B. megaterium* 501^{rif}, содержащей не менее 90 % вегетативных клеток. Влажность почвы поддерживали в пределах 50-60 % от полной влагоемкости.

Влияние температурного режима на рост и спорообразование оценивали в трех вариантах — при 4, 20 и 37 °С. Для изучения эффекта органического вещества измельченную солому овса (0,2 мм) и кукурузную муку вносили в количестве 20 г/кг почвы. При исследовании влияния прометрина — 2-метилтио-4,6-бис (изопропиламино)-сим-триазина (18) на *B. megaterium* 501^{rif}, а также динамики его бактериальной деградации гербицид вносили в почву в виде водной эмульсии 50 % смачивающего порошка («Panama Agrochemicals Inc.», Республика Панама) в дозе 4 и 20 мг/кг.

Общую численность *B. megaterium* 501^{rif} (КОЕ/г почвы) учитывали общепринятым методом серийных разведений (19) с высевом почвенной суспензии на агаризованную минеральную среду следующего состава (г/л): NH_4NO_3 — 0,5, K_2HPO_4 — 1,6, KH_2PO_4 — 0,4, $MgSO_4$ — 0,2, $CaCO_3$ — 0,025, $FeSO_4$ — 0,025, сахароза — 10, дрожжевой экстракт — 0,2, агар-агар — 20, рифампицин — 0,02. Для учета числа спор почвенную суспензию перед посевом пастеризовали при 80 °С в течение 10 мин.

Гербицид экстрагировали из почвы ацетоном и анализировали с использованием газожидкостной хроматографии (ГЖХ) (20).

Статистическая обработка результатов была проведена до уровня $P_{0,05}$ (21).

Результаты. В нестерильной почве в условиях низкой температуры

(рис. 1) наблюдалось резкое снижение численности *B. megaterium* 501^{rif} после инокуляции в почву, при этом 12 сут бациллы находились в состоянии вегетативных клеток. При 4 °С, что ниже температурного минимума развития для *B. megaterium* 501^{rif}, задерживалось формирование спор и, соответственно, происходило быстрое отмирание вегетативных клеток. Через 1 мес общая численность инокулянта в почве оказалась меньше исходной в 1000 раз. Наблюдалось интенсивное развитие грибов, относящихся к родам *Fusarium* и *Penicillium*. Из этого следует, что «низкотемпературный шок» снижает защитные функции и конкурентоспособность *B. megaterium*.

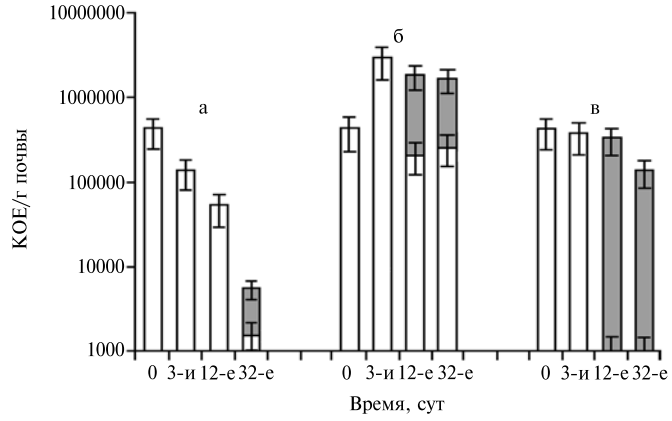

Рис. 1. Динамика выживаемости и спорообразования *Bacillus megaterium* 501^{rif} при инокуляции в зависимости от температуры почвы: а, б, в — соответственно 4, 20 и 37 °С; серый и белый цвет — соответственно число спор и вегетативных клеток (лабораторный опыт).

Относительно высокую выживаемость *B. megaterium* 501^{rif} регистрировали при температуре 37 °С. На 32-е сут общая численность инокулированных в почву бактерий снизилась относительно исходной в 3 раза, при этом наблюдали активное спорообразование: уже на 12-е сут степень споруляции составила 100 %.

Наиболее благоприятные условия для *B. megaterium* 501^{rif} в нестерильной почве сложились при 20 °С. Уже на 3-и сут после инокуляции титр бактерий в почве возрастал почти на порядок и оставался таким практически до конца опыта (32 сут). Спорообразование наблюдалось на 12-е сут, но доля спор не превышала 30 %. Следовательно, *B. megaterium* 501^{rif} в течение всего опыта находилась в активном состоянии в микробиоме дерново-подзолистой почвы.

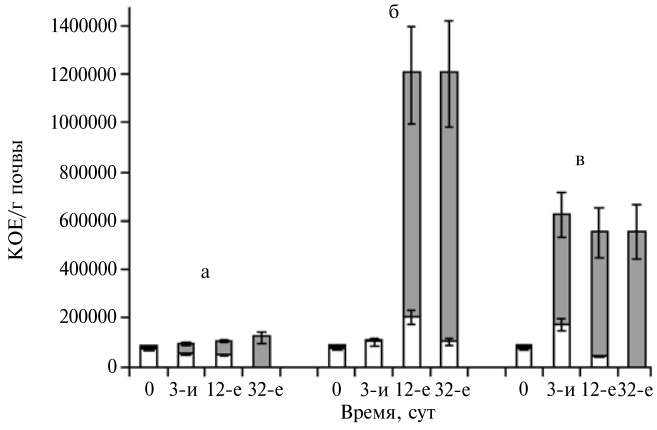

Рис. 2. Динамика выживаемости и спорообразования *Bacillus megaterium* 501^{rif} при инокуляции с дополнительным внесением органического вещества: а, б, в — соответственно контроль, овсяная солома и кукурузная мука; серый и белый цвет — соответственно число спор и вегетативных клеток (лабораторный опыт).

При дополнительном внесении соломы в почву численность *B. megaterium* 501^{rif} (рис. 2) уже на 12-е сут после инокуляции увеличивалась на порядок. При этом высокий титр сохранялся на протяжении 1 мес, а численность физиологически активных бактерий превышала 10^5 КОЕ/г. Аналогичная закономерность наблюдалась и в варианте с кукурузной мукой. Однако в этом случае происходило интенсивное спорообразо-

вание: через 1 мес 100 % бактерий находились в виде спор.

Положительное действие соломы и кукурузной муки на *B. megaterium* 501^{rif}, безусловно, с одной стороны, связано с дополнительным введением в почву питательных элементов, поддерживающих жизнедеятельность этого микроорганизма, с другой — обусловлено влиянием этих субстратов на формирование микробной ассоциации, благоприятной для *B. megaterium*.

На протяжении ряда десятилетий обсуждаются вопросы взаимодействия микроорганизмов и ксенобиотиков в почве, к которым, в частности, относятся гербициды, используемые в сельскохозяйственном производстве для борьбы с сорняками (18). Актуальность таких исследований обусловлена воздействием этих препаратов на почвенно-микробиологические процессы и в целом на плодородие почвы, а также проблемой детоксикации и деградации пестицидов в окружающей среде, поскольку многие из них представляют опасность для экологии и здоровья человека и животных.

В связи с этим мы исследовали взаимодействие инокулированной в почву *B. megaterium* 501^{rif} и гербицида прометрина, который эффективно используется для борьбы с сорняками в посевах картофеля, сои, моркови и других сельскохозяйственных культур. Установлено, что прометрин в дозах, превышающих производственные в десятки раз, не оказывал отрицательного влияния на *B. megaterium* 501^{rif}, а при дополнительном внесении соломы численность этой бактерии существенно возрастала (табл.).

Динамика численности и спорообразования (КОЕ, тыс/г) **при инокуляции в почву *Bacillus megaterium* 501^{rif} на фоне внесения разных доз гербицида прометрина и овсяной соломы** ($X \pm x$, лабораторный опыт)

Время, сут	Контроль	Прометрин		
		4 мг/кг почвы	20 мг/кг почвы	20 мг/кг почвы + солома (2 %)
0	80±1,2	80±1,2	80±1,2	80±1,2
	13±0,5	13±0,5	13±0,5	13±0,5
3	200±3,4	135±24,2	90±6,0	1600±100,8
	150±12,6	65±0,9	40±6,2	500±8,0
12	135±5,3	114±3,5	100±10,0	1200±150,0
	115±1,5	112±4,0	54±2,7	1000±21,0
32	110±10,7	140±1,5	118±9,4	1200±63,6
	90±2,7	140±10,3	115±1,5	1100±49,5

Примечание. Над чертой — общая численность, под чертой — число спор.

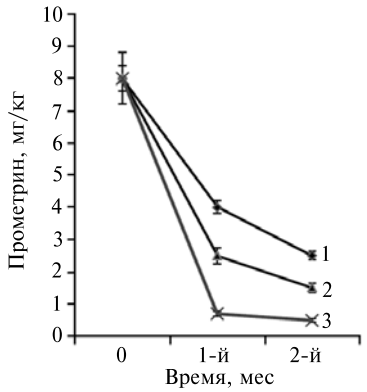

Рис. 3. Динамика деградации гербицида прометрина в почве при разных вариантах инокуляции *Bacillus megaterium* 501^{rif}: 1 — контроль, 2 — инокуляция, 3 — инокуляция с внесением овсяной соломы (2 %) (лабораторный опыт).

В почве, инокулированной *B. megaterium* 501^{rif}, скорость деградации прометрина значительно увеличивалась (рис. 3). Наиболее интенсивно этот процесс протекал при дополнительном внесении соломы (спустя 1 мес содержание гербицида было в 10 раз ниже, чем в контроле), и это коррелировало с увеличением общей численности *B. megaterium* 501^{rif}.

Результаты этих исследований позволяют сделать вывод, что важным, а может быть, и основным условием повышения эффективности процесса биоремедиации при загрязнении прометрином служит введение в почву органического вещества в виде растительных остатков, богатых целлюлозой, и инокуляция почвы микроорганизмами, способными разлагать гербицид.

Итак, показано, что инокулируемые в почву вегетативные клетки

Bacillus megaterium 501^{rif} достаточно длительное время находятся в физиологически активном состоянии. Дополнительное внесение в почву органических веществ в виде соломы зерновых и кукурузной муки приводит к быстрому размножению бактерий. Их численность возрастает в сотни раз, и титр стабильно сохраняется. Через 12 сут после инокуляции бактерий в почву начинается активное спорообразование. Эффективность интродукции и физиологический статус бактерий напрямую зависят от температурного режима почвы. Наиболее благоприятна для выживания *B. megaterium* (при оптимальной влажности почвы) температура в диапазоне 20-37 °С, а также наличие органического вещества в виде растительной массы, богатой целлюлозой (соломенная резка, пожнивные остатки и т.д.). Выделенный нами штамм *B. megaterium* 501^{rif} заметно ускоряет процесс деградации прометрина и может быть полезен при разработке биотехнологии ремедиации почвы, загрязненной этим гербицидом.

ГНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии,
196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,
e-mail: yuvkruglov@yandex.ru, lisina-to@yandex.ru

Поступила в редакцию 24 апреля 2014 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2014, № 5, pp. 107-112

Bacillus megaterium 501^{rif} INTRODUCED INTO THE SOIL: FACTORS AFFECTING THE RATE OF SURVIVAL, SPORULATION AND DECOMPOSITION OF THE HERBICIDE PROMETRYN

Yu.V. Kruglov, T.O. Lisina

All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology, Russian Academy of Agricultural Sciences, 3, sh. Podbelskogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail yuvkruglov@yandex.ru, lisina-to@yandex.ru
Received April 24, 2014 doi: 10.15389/agrobiology.2014.5.107eng

Abstract

Introduction of microorganisms into the soil is a fundamental problem in application of microbial preparations in agriculture, crop production and ecology. Its effectiveness depends on many factors (i.e. the type and strain of microorganism, the physical and chemical properties of the soil, plant cover, climate and so on), which are not well understood, leading to a high variability of the results of application of microbial preparations. In this article, there is reported the first investigation of survival and sporulation dynamics of *Bacillus megaterium* 501^{rif} introduced into sod-podzolic soil, depending on the temperature of the soil, organic matter content and herbicide prometryn, the 2-methylthio-4,6-bis (iso-propylamino)-sim-triazine, application. In laboratory experiments it was found that the optimal conditions for the *Bacillus megaterium* 501^{rif} introduced into the soil are achieved at a temperature of 20 °C. After the third day after inoculation the titer of bacteria in the soil increased almost 10 times and remained at that level until the end of the experiment (32 days). *B. megaterium* 501^{rif} throughout the experiment was mainly in the form of a physiologically active cells and fits well into the soil microbiom. Under these conditions an additional incorporation into the soil of the organic matter, such as cereal straw and corn flour, leads to 10-100-fold increase of the amount of *B. megaterium* 501^{rif}. At 37 °C the total number of *B. megaterium* 501^{rif} reduced several times, and stabilized at this level until the end of the experiment. In this case, 100 % of *B. megaterium* 501^{rif} revert into spores and are physiologically inactive. The temperature below the minimum for physiological reproduction of *B. megaterium* (4 °C) inhibits spore formation and leads to a rapid loss of physiologically active bacterial cells introduced into the soil. The total number of bacteria decreases 1000 times within a month. These data lead to the conclusion that the «low-temperature shock» reduces the competitiveness of *B. megaterium* to the indigenous microflora and its resistance to bactericidal metabolic products of soil biome. It is shown that at the optimum temperature (20 °C) of soil the *B. megaterium* inoculation and the use of additional organic matter such as straw accelerate the decomposition of herbicide prometryn, can potentially be used in a biotechnology of remediation of the soil, contaminated by herbicide.

Keywords: *Bacillus megaterium*, sporulation, introduction, soil, temperature, organic matter, prometryn herbicide.

REFERENCES

1. Tikhonovich I.A., Kozhemyakov A.P., Chebotar' V.K., Kruglov Yu.V.,

Kandybin N.V., Laptev G.Yu. *Biopreparaty v sel'skom khozyaistve. Metodologiya i praktika primeneniya mikroorganizmov v rastenievodstve i kormoproizvodstve* [Biopreparations in agriculture. Methodology and practical use of microorganisms in crop and forage production]. Moscow, 2005.
2. Zavalin A.A. *Biopreparaty, udobreniya i urozhai* [Biopreparations, fertilizers and yield production]. Moscow, 2005.
3. Bashan Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, 1998, 16(4): 729-770 (doi: 10.1016/S0734-9750(98)00003-2).
4. Mostafiz S.B., Rahman M., Rahman M. Biotechnology: role of microbes in sustainable agriculture and environmental health. *The Internet Journal of Microbiology*, 2012, 10(1) (http://ispub.com/IJMB).
5. Kandybin N.V., Patyka T.I., Ermolova V.P., Patyka V.F. *Mikrobiokontrol' chislennosti nasekomykh i ego dominanta Bacillus thuringiensis*. [Microbiocontrol of insects and *Bacillus thuringiensis* as its dominant]. St. Petersburg, 2009.
6. Sanahuja G., Banakar R., Twyman R.M., Capell T., Christou P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnol. J.*, 2011, 9(3): 283-300 (doi: 10.1111/j.1467-7652.2011.00595.x).
7. Chebotar' V.K., Zavalin A.A., Kiprushkina E.I. *Effektivnost' primeneniya preparata ekstrasol* [Efficacy of Extrasol application]. Moscow, 2007.
8. Omer A.M., Bioformulations of *Bacillus* Spores for using as biofertilizer. *Life Sci. J.*, 2010, 7(4): 124-131.
9. Chumthong A., Kanjanamaneesathian M., Pengnoo A., Wiwattanapatapee R. Water-soluble granules containing *Bacillus megaterium* for biological control of rice sheath blight: formulation, bacterial viability and efficacy testing. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 24(11): 2499-2506 (doi: 10.1007/s11274-008-9774-7).
10. Zlotnikov A.K., Alekhin V.T., Andrianov A.D. et al. *Biopreparat al'bit dlya povysheniya urozhaya i zashchity rastenii: opyty, rekomendatsii, rezul'taty primeneniya* /Pod redaktsiei V.G. Mineeva [Albit for yield increase and plant protection: experience, recommendations and results of application. V.G. Mineev (ed.)]. Moscow, 2008.
11. Mishustin E.N., Mirzoeva V.A. *Izvestiya AN SSSR, Seriya biologicheskaya*, 1965, 5: 682-691.
12. Beattie G.A. Plant associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. In: *Plant associated bacteria* /S.S. Gnanamanickam (ed.). Springer, Dordrecht, Netherland, 2007: 1-56.
13. Miller H.J., Henren G., Van Veen L.F. Variation and composition of bacterial populations in the rhizospheres of maize, wheat and grass cultivars. *Can. J. Microbiol.*, 1989, 35(46): 656-660 (doi: 10.1139/m89-106).
14. Rosenblueth M., Martinez-Romero E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2006, 19: 827-837 (doi: 10.1094/MPMI-19-0827).
15. Figueiredol J., Gomes E., Guimarres C., Gomes de Paula Lana S.U., Teixeira M, Lima G., Bressan W. Molecular analysis of endophytic bacteria from the genus *Bacillus* isolated from tropical maize (*Zea mays* L.). *Braz. J. Microbiol.*, 2009, 40(3): 522-534 (doi: 10.1590/S1517-83822009000300014).
16. Melent'ev A.I. *Aerobnye sporoobrazuyushchie bakterii Bacillus Chon. v agroekosistemakh* [Aerobic sporeforming bacteria *Bacillus* Chon. in agroecosystems]. Moscow, 2007.
17. *Metody obshchei bakteriologii* /Pod redaktsiei F. Gerkharda [Methods of general bacteriology. V. 2. F. Gerhard (ed.)]. Moscow, 1983, tom 2.
18. Mel'nikov N.N., Novozhilov K.V., Belan S.R., Pylova T.N. *Spravochnik po pestitsidam* [Pesticide manual]. Moscow, 1985.
19. *Metody pochvennoi mikrobiologii i biokhimii* /Pod redaktsiei D.G. Zvyagintseva [Methods of soil microbiology and biochemistry. D.G. Zvyagintsev (ed.)]. Moscow, 1991.
20. *Metody opredeleniya mikrokolichestv pestitsidov v produktakh pitaniya, kormakh i vneshnei srede* /Pod redaktsiei M.A. Klisenko [Methods for determination of trace pesticides in food, feed and the environment. M.A. Klisenko (ed.)]. Moscow, 1983.
21. Plokhinskii N.A. *Biometriya* [Biometry]. Moscow, 1970.