

УДК 631.46

ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ СПОСОБОВ СТЕРИЛИЗАЦИИ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЧЕРНОЗЕМА ОБЫКНОВЕННОГО

Акименко Ю.В., Казеев К.Ш., Колесников С.И.

ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет», Ростов-на-Дону, Россия (344006, Ростов-на-Дону, ул. Б. Садовая, 105/42), e-mail: akimenkojuliya@mail.ru

В модельных экспериментах изучено влияние термических ($t\ 180^{\circ}\text{C}$, тиндаллизация) и химических (фумигация хлороформом и антибиотиками) способов стерилизации на изменение качественного и количественного состава микроорганизмов и ферментативной активности чернозема обыкновенного. Установлено, что действие температурных факторов оказывает более существенное ингибирование биологической активности, нежели действие химических факторов. Ферменты оказались наиболее устойчивы к действию всех используемых способов стерилизации, чем почвенные микроорганизмы. По степени ингибирования почвенных микроорганизмов исследуемые способы стерилизации расположились в следующем ряду: $t\ 180^{\circ}\text{C}$ > хлороформ > антибиотики > тиндаллизация. При помощи качественной идентификации установили, что разнообразие штаммов уменьшается в ряду нестерильная почва – стерилизация парами хлороформа и антибиотиками – стерилизация температурой. Термические факторы наиболее эффективны в отношении бактерий, а фумигация хлороформом и антибиотиками в отношении микросцистов чернозема обыкновенного.

Ключевые слова: чернозем обыкновенный, почвенные микроорганизмы, антибиотики, термическая стерилизация, химическая стерилизация, биологическая активность почв, ферментативная активность почв.

INFLUENCE OF DIFFERENT WAYS OF STERILIZATION ON BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE CHERNOZEM ORDINARY

Akimenko Y.V., Kazeev K.S., Kolesnikov S.I.

Southern federal university, Rostov-on-Don, Russia (344006, Rostov-on-Don, street B. Sadovaya, 105/42), e-mail: akimenkojuliya@mail.ru

In model experiments influence thermal (180°C , tindallization) and chemical (fumigation by chloroform and antibiotics) ways of sterilization on change of qualitative and quantitative structure of microorganisms and enzyme activity of the chernozem ordinary is studied. It is established that more essential inhibition of biological activity, than action of chemical factors has effect of temperature factors. Enzymes were steadiest against action of all used ways of sterilization, than soil microorganisms. On degree of inhibition of soil microorganisms studied ways of sterilization settled down in the following row: 180°C > chloroform > antibiotics > tindallization. By means of high-quality identification established that a variety of strains decreases among the unsterile soil – sterilization by vapors of chloroform and antibiotics – sterilization by temperature. Thermal factors are most effective concerning bacteria, and fumigation by chloroform and antibiotics concerning chernozem micromycetes.

Keywords: chernozem ordinary, soil microorganisms, antibiotics, thermal sterilization, chemical sterilization, biological activity of soil, enzyme activity of soil.

Введение

Возрастающее антропогенное воздействие требует новых эффективных методов диагностики. Биологическая диагностика почв позволяет определить характер и степень антропогенного воздействия на почвенный покров на ранних стадиях развития процессов. Это позволяет оценить возможные негативные процессы при антропогенном воздействии почв и предотвратить снижение их плодородия.

Биологическая активность почв – одна из самых главных характеристик при проведении биомониторинга и биодиагностики. Биологическая активность почв обусловлена интенсивностью протекающих в ней биологических процессов и состоит из

ферментативного пула почвы и продуктов жизнедеятельности микроорганизмов и растений [10]. На изменение биологической активности оказывают действие различные факторы. Одни из самых важных – это высокие температуры, токсические химические вещества и радиация, которые ингибируют активность ферментов и почвенных микроорганизмов.

К настоящему времени проведен широкий диапазон исследований, с целью определения эффектов тяжелых металлов [8], излучений [6] и других загрязнителей на биологические свойства почв. Однако полностью подавить биологическую активность почв не удается.

Одним из основных почвенных компонентов, реагирующих на температурное воздействие, являются микробоценозы, что проявляется в изменении структуры и функциональной активности. Влияние прогревания среды на микроорганизмы многосторонне, особенно в такой гетерогенной среде, как почва. Температура может влиять на почвенные микробные популяции и видовой состав в зависимости от интенсивности, максимальных температур, от типа почвы и увлажнения, а также продолжительности воздействия [4].

Высокие температуры изменяют органическое вещество почв, количество микробной биомассы и устойчивость микробных сообществ, ферментативная активность относительно устойчива при нагревании почвы до 100 °С, но полностью инактивируется и денатурируется при более высоких температурах [2].

Актуальность исследования заключается в анализе действия физических и химических факторов, воздействующих на почву, чувствительности отдельных групп микроорганизмов, а также возможности использования стерилизации почв.

Целью настоящего исследования являлось изучение влияния разных способов стерилизации на биологические свойства чернозема обыкновенного.

Материал и методы

Объектом исследования являлся чернозем обыкновенный карбонатный мощный слабогумусированный тяжелосуглинистый на желто-бурых суглинках, отобранный на территории Ботанического сада Южного федерального университета. Данный тип почв был выбран в связи с тем, что черноземы составляют большую часть почвенного покрова Юга России и имеют особое значение в продовольственном обеспечении страны [5].

Методика исследования заключалась в следующем: образцы почвы (0–25 см) подвергали воздействию термических (180 °С, тиндализация) и химических (хлороформ, антибиотики) факторов в соответствующих дозах.

Стерилизация проводилась методом фумигации, который основан на интенсификации дыхания почвенного образца при его обработке фумигантом. Почвенные образцы

обрабатывали парами хлороформа в анаэробных условиях в течение 24 часов, а также раствором комплекса антибиотиков бензилпенициллина и нистатина в концентрации 600 мг/кг. Данный комплекс антибиотиков в соответствующей концентрации был выбран исходя из ранее полученных рекогносцировочных исследований [1]. Бензилпенициллин – антибиотик группы биосинтетических пенициллинов. Оказывает бактерицидное действие за счёт ингибирования синтеза клеточной стенки микроорганизмов. Активен в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, анаэробных спорообразующих палочек. Нистатин – полиеновый противогрибковый антибиотик. Действует на патогенные грибы, и особенно на дрожжеподобные грибы р. *Candida*, а также на аспергиллы, в отношении бактерий не активен [3].

Для обработки почвы термическим способом использовали метод высушивания в сушильном шкафу при 180 °С в течение 3 часов и процесс тиндализации. Тиндализация – это метод стерилизации, заключающийся в повторном воздействии на стерилизуемые объекты относительно невысокой температурой с суточными интервалами. Тиндализацию проводят в следующих условиях: трехкратно при температуре 70–90 °С в течение часа [9].

При получении аналитических данных применялась разработанная и апробированная методология исследования биологической активности с использованием общепринятых в почвоведении и биологии методов [7]. Аналитические определения биологических свойств почвы выполняли в 3-кратной повторности.

Комплексное исследование микробоценоза чернозема обыкновенного включало определение численности жизнеспособных микроорганизмов методом глубинного посева соответствующих разведений на твердые среды: бактерий – на мясо-пептонноагаре, микромицетов – на среде Чапека. Активность каталазы измеряли методом Галстяна, дегидрогеназы – методом Галстяна в модификации Хазиева [7].

Результаты и их обсуждение

Температура может влиять на почвенные микробные популяции и видовой состав в зависимости от интенсивности, максимальных температур, от типа почвы и увлажнения, а также продолжительности воздействия. Температура свыше 127 °С стерилизует почву, а воздействие 70 °С убивает неспорообразующие грибы и некоторые бактерии, актиномицетов, но практически не влияет на спорообразующие бактерии и грибы (*Bacillus* spp., *Clostridium*). Термическая обработка при свыше 105 °С (термошок) приводит соответственно к среднему и сильному нарушению устойчивости микробного сообщества почвы. При термошоке необратимо теряется 41 % микробной биомассы [4].

Исследованиями Е.В. Благодатской с соавторами (1996) показано, что в микробном сообществе, сформировавшемся после термического шока, может превалировать г-стратегия, характерная для менее устойчивых местообитаний.

При изменении экологической ситуации смена доминирующей экологической стратегии микробного сообщества почвы является механизмом адаптации почвенных микроорганизмов к новым условиям. Воздействие высоких температур почв приводит к разрушению микробных клеток и высвобождению из них органических веществ [4].

В рамках нашего исследования все изучаемые способы стерилизации оказали ингибирующее воздействие на численность почвенных микроорганизмов чернозема обыкновенного. По степени ингибирования почвенных микроорганизмов исследуемые способы стерилизации можно расположить в следующем ряду: 180 °С > хлороформ > антибиотики > тиндализация (рис.1). Наиболее чувствительными к действию исследуемых факторов оказались бактерии. При этом нагревание почвы при 180 °С в течение 3-х часов подавляло численность бактерий значительно, чем фумигация хлороформом и антибиотиками, которые в свою очередь оказали наиболее сильный подавляющий эффект на численность грибов чернозема обыкновенного.

Таким образом, термические факторы наиболее эффективны в отношении бактерий, а фумигация хлороформом и антибиотиками в отношении грибов чернозема обыкновенного.

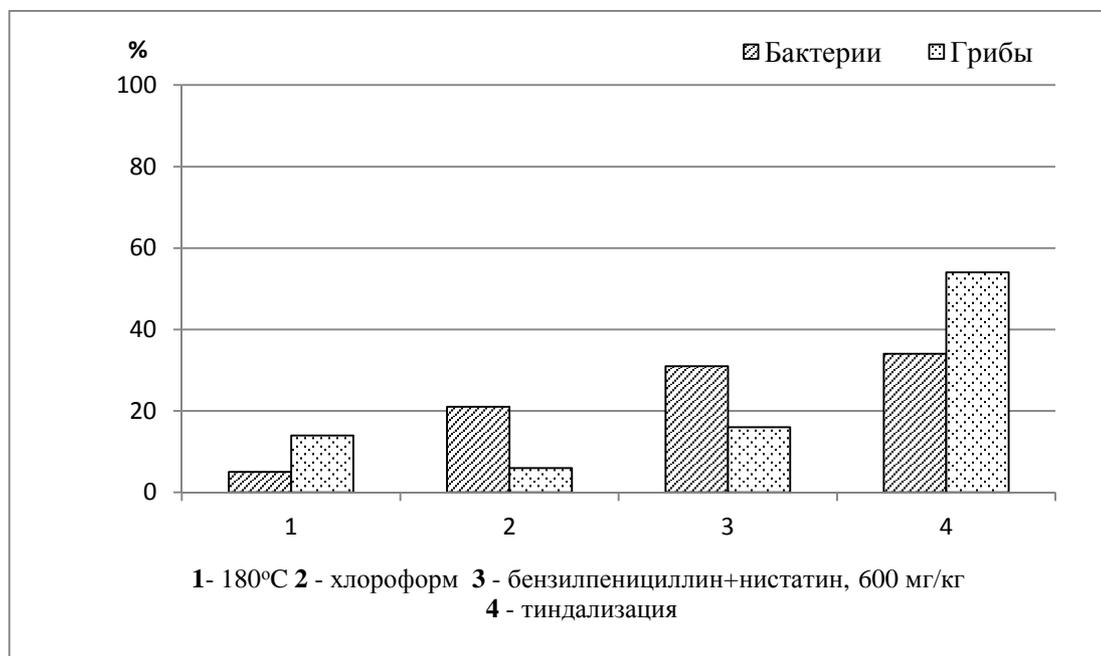


Рисунок 1. Влияние разных способов стерилизации на численность микроорганизмов чернозема обыкновенного

При помощи качественной идентификации установили, что разнообразие штаммов уменьшается в ряду нестерильная почва – стерилизация парами хлороформа – стерилизация температурой. И если пары хлороформа незначительно понижали разнообразие, то

воздействие температуры выдерживал только р. *Micrococcus*. Подобная закономерность выявлена и при изучении грибов. В варианте чернозема, подверженном температурному воздействию, обнаружен только р. *Mucor* (табл.1).

Таблица 1. Качественная идентификация микроорганизмов чернозема обыкновенного, подверженного термической обработке и фумигации хлороформом

	Контроль	180 °С	Фумигация хлороформом
Бактерии	<i>Bacillus sp.*</i> <i>Bacillus mycoides*</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Cytophaga*</i> <i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus*</i> <i>Bacillus sp.</i> (2 штамма)	<i>Bacillus sp.</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Micrococcus*</i>
	Примечания		
	большинство бациллярных форм	выражена пигментация колоний кокков, бациллы в минимальном количестве	большинство кокков
Грибы	<i>Aspergillus *</i> <i>Penicillium</i> <i>Mucor</i> <i>Trichoderma</i>	<i>Mucor*</i>	<i>Mycogone*</i> <i>Penicillium</i>
	Примечания (пигменты)		
	черный *, оранжевый *, белый, серый	желтый *, зеленый	зеленый *, черный

*Доминантный род.

Обеспеченность растений доступными питательными веществами в значительной степени связана с ферментативной активностью почв. В почвенных исследованиях достаточное внимание уделяется катализаторам многих процессов трансформации органических и минеральных веществ. Такие ферменты, как уреазы, дегидрогеназы, каталазы, фосфатазы, инвертазы способны сохранять устойчивость в случае, когда окружающие условия неблагоприятны для жизнедеятельности растений и микроорганизмов.

Многие почвенные ферменты обладают большой термоустойчивостью и разрушаются лишь при температурах, превышающих 100 °С. Инвертазы, каталазы, уреазы проявляют относительную термоустойчивость при нагревании почвы при 100 °С. Активность фосфатазы и дегидрогеназы менее устойчива, по сравнению с инвертазой, каталазой и уреазой, к нагреванию. Каталаза обладает высокой термостабильностью, активность дегидрогеназы и уреазы возрастает после 3-х часового нагревания образцов из некоторых горизонтов профиля.

Нами исследована устойчивость ферментов класса гидролаз (каталаза, дегидрогеназа) к действию разных способов стерилизации. По степени ингибирования

каталазной активности чернозема, способы стерилизации располагаются в ряду: 180 °С > антибиотики > тиндализация > хлороформ.

Таким образом, температура и антибиотики оказали наибольшее влияние на активность каталазы, чем пары хлороформа. По степени ингибирования дегидрогеназной активности чернозема, способы стерилизации располагаются в ряду: 180 °С > тиндализация > хлороформ > антибиотики. Дегидрогеназа оказалась менее устойчива к действию всех исследуемых способов стерилизации, нежели каталаза (рис. 2,3).

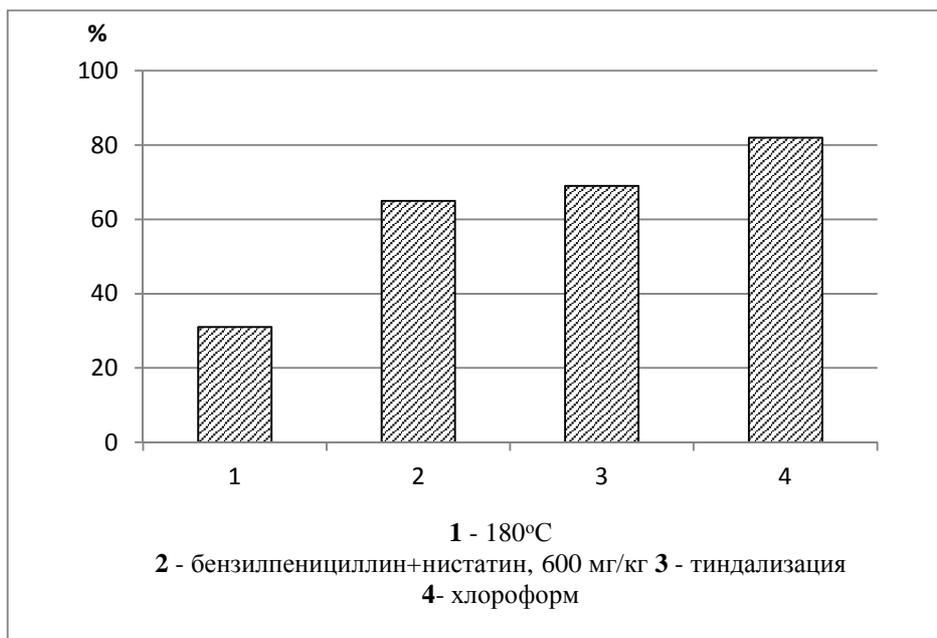


Рисунок 2. Влияние разных способов стерилизации на каталазную активность чернозема обыкновенного

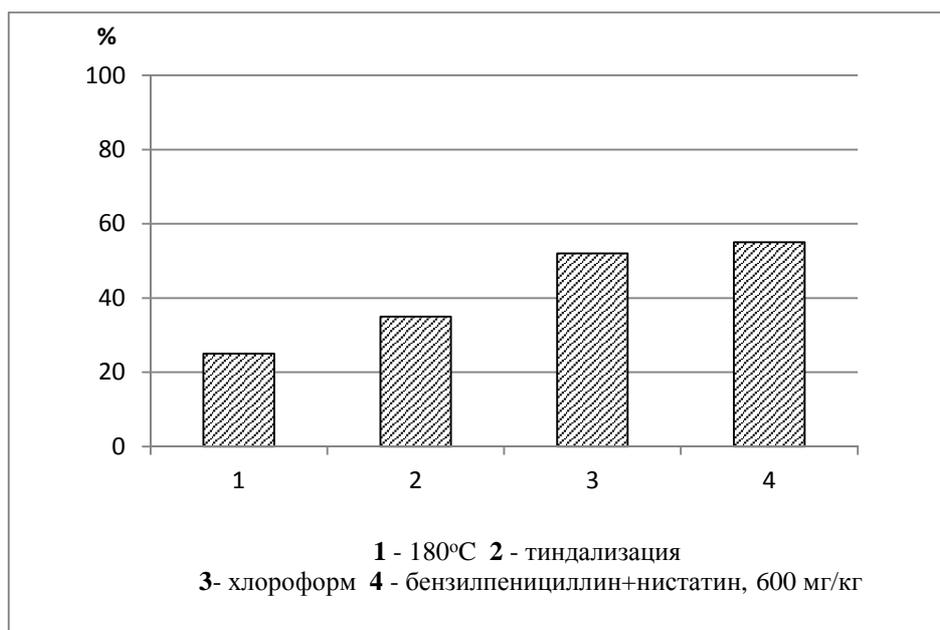


Рисунок 3. Влияние разных способов стерилизации на дегидрогеназную активность чернозема обыкновенного

Выводы

В результате проведенных исследований получены следующие выводы:

1. Все исследуемые способы стерилизации оказывают ингибирующее действие на численность почвенных микроорганизмов и ферментативную активность почв.
2. По степени ингибирования микроорганизмов чернозема исследуемые способы стерилизации располагаются в ряду: 180 °С > хлороформ > антибиотики > тиндализация.
3. Ферменты более устойчивы к действию всех используемых способов стерилизации, нежели почвенные микроорганизмы. Из ферментов класса гидролаз наиболее устойчива – каталаза, нежели дегидрогеназа.
4. При помощи качественной идентификации установили, что разнообразие штаммов уменьшается в ряду: нестерильная почва – стерилизация парами хлороформа и антибиотиками – стерилизация температурой. И если пары хлороформа незначительно понижали разнообразие, то воздействие температуры выдерживал только р. *Micrococcus*. Подобная закономерность выявлена и при изучении грибов. В варианте чернозема, подверженном температурному воздействию, обнаружен только р. *Mucor*.
5. Термические факторы наиболее эффективны в отношении бактерий, а химические (фумигация хлороформом и антибиотиками) в отношении грибов чернозема обыкновенного.

Исследование выполнено в рамках реализации Программы развития Южного федерального университета (213.1-24/2013-85; 213.1-24/2013-44).

Список литературы

1. Акименко Ю.В., Казеев К.Ш., Колесников С.И. Динамика ферментативной активности чернозема обыкновенного при загрязнении антибиотиками // Научный журнал КубГАУ. – 2013. – № 01(85). – С. 578–587; <http://ej.kubagro.ru/2013/01/pdf/46.pdf>.
2. Ананьева Н.Д. Микробиологические аспекты самоочищения и устойчивости почв. – М.: Наука, 2003. – 222 с.
3. Базы данных по лекарственным средствам: <http://drugreg.ru/Bases/>.
4. Благодатская Е.В., Ананьева Н.Д. Оценка устойчивости микробных сообществ в процессе разложения поллютантов в почве // Почвоведение. – 1996. – № 11. – С. 1341–1346.
5. Вальков В.Ф., Казеев К.Ш., Колесников С.И. Почвоведение: учебник для бакалавров. – 4–е изд., перераб. и доп. – М.: Изд-во Юрайт, 2012. – 527 с.
6. Денисова Т.В., Казеев К.Ш. Радиочувствительность разных групп микроорганизмов чернозема обыкновенного к гамма-излучению // Экология. – 2008. – № 2. – С. 110–115.

7. Казеев К.Ш., Колесников С.И. Биодиагностика почв: методология и методы исследований / К.Ш. Казеев, С.И. Колесников. – Ростов-на-Дону: Изд-во Южного федерального ун-та, 2012. – 260 с.
8. Колесников С.И., Спивакова Н.А., Казеев К.Ш. Влияние модельного загрязнения Cr, Cu, Ni, Pb на биологические свойства почв сухих степей и полупустынь юга России // Почвоведение. – 2011. – № 9. – С. 1094–1101.
9. Нетрусов А.И., Котова И.Б. Микробиология. – М.: АСАДЕМА, 2006. – 350 с.
10. Орлов Д.С. О возможности использования некоторых биохимических показателей для диагностики и индикации почв // Проблемы и методы биологической диагностики почв. – М.: Наука, 1976. – С. 4–15.

Рецензенты:

Денисова Т.В., д.б.н., профессор кафедры экологии и природопользования ЮФУ, г. Ростов-на-Дону.

Минкина Т.М., д.б.н., профессор кафедры почвоведения и оценки природных ресурсов ЮФУ, г. Ростов-на-Дону.