

5. Дворецкий М.Л. Пособие по вариационной статистике / М.Л. Дворецкий. –

М.: Лесная промышленность, 1971. – 104 с.



УДК 579.246.2

И.Б. Бороздина

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ РОДА *VACILLUS* СЕМЕЙСТВА *БЕРЁЗОВЫЕ (BETULACEAE)* ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА ИСКУССТВЕННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Ключевые слова: идентификация, филлоплан, *Vacillus*, филлосфера, Берёза повислая, Берёза белая, Ольха мелкопильчатая.

Бактерии рода *Vacillus* вызывают большой интерес микробиологов по причине повсеместного распространения представителей этого рода, цикла развития, необычной устойчивости их спор, химическим и физическим агентам и патогенности.

В процессе своей жизнедеятельности растения входят в сложные взаимоотношения с микроорганизмами, населяющими филлосферу растений (филлосфера – греч. *phylon* – лист и *sphere* – шар – часть эдасферы, воздушное пространство, заполняющее и на небольшое расстояние окружающее крону отдельного растения, его фотосинтезирующие органы и испытывающее значительное их влияние) [1].

Взаимоотношение микроорганизмов и высших растений является одной из сложнейших проблем микробиологии.

Исследование закономерностей формирования этой эволюционно сложившейся биологической системы позволило разработать и обосновать безопасные для окружающей среды способы и средства подавления вредителей и болезней растений с помощью биологических методов их защиты. В настоящее время особое внимание заслуживает проблема создания и практического применения препаратов на основе живых культур аэробных спорообразующих бактерий из рода *Vacillus*. Поэтому проблема идентификации и изучения морфологических, культуральных, тинкториальных признаков различных представителей рода *Vacillus* является актуальной [2].

Цель исследования: выделить, идентифицировать и изучить морфофизиологические, биохимические, культуральные свойства видов рода *Vacillus*, высеянных с поверхности верхней и нижней поверхностей филлоплана семейства Берёзовые (*Betulaceae*) – Берёзы повислой (*Betula pendula*), Берёзы белой (*Betula alba*), Ольхи мелкопильчатой (*Alnus serrulata*).

Материалы и методы исследования

Изучение микрофлоры филлоплана проводили в весенне-летний период 2008–2009 гг. на базе кафедры общей биологии ГОУ ВПО «Ставропольский государственный университет» и бактериологической лаборатории ГУЗИБ № 4 г. Армавира путём отбора проб с верхней и нижней поверхностей листовых пластинок растений семейства Берёзовые (*Betulaceae*) – Берёзы повислой (*Betula pendula*), Берёзы белой (*Betula alba*), Ольхи мелкопильчатой (*Alnus serrulata*).

Культуры микроорганизмов, полученные методом отпечатков, высевали на плотные питательные среды: ГРМ – агар, МПА с добавлением раствора 40%-ной глюкозы, декстрозный бульон, 5%-ный кровяной агар, среду Сабуро, селективную питательную среду для *Vacillus cereus*, изготовленную ФГУП «Питательные среды», глюкозо-солевой агар при 7%-ном NaCl, солевой полимиксиновый агар 2-, 3-, 5-трифенилтетразолий хлоридом (ТТХ) при pH среды 7,2–7,6 и оптимальной $t = 37^{\circ}\text{C}$ в течение 18–24 ч [3].

В экспериментальной работе использовали питательные среды, содержащие легко усвояемые микроорганизмами углеводородные и сложные органические соединения.

Общую бактериальную обсеменённость рассчитывали по количеству вырос-

ших колоний и определяли количество КОЕ в 1 мл по формуле:

$$M = a \cdot 10^n / V,$$

где a – количество выросших колоний;

10^n – разведение;

V – посевная доза (0,1 мл).

Трудности возникали при идентификации рода *Bacillus*, характеризующегося видовым разнообразием, морфолого-физиологической колониальностью, на разных средах колонии R-формы переходили в колонии S-формы, и наоборот, что затрудняло первичное определение по культуральным и тинкториальным признакам.

Для изучения морфологических и тинкториальных свойств выделенных микроорганизмов из полученных колоний делали мазки, окрашивали их по Синёву, Граму и Циллю-Нильсену и микроскопировали.

Для выделения видов *Bacillus* исследуемый материал высевали на дифференциально-диагностические среды (Кларка, желточно-солевой агар, Хью-Лейфсена) [4].

Лецитиназную активность изучали путём посева исследуемой культуры на желточно-солевой агар. На проявление лецитиназной активности указывало появление золотисто-жёлтого ободка вокруг колонии.

Проявление лецитиназной активности является одним из основных дифференцирующих признаков при идентификации *Bacillus cereus*. Под действием фосфолипазы – C у *Bacillus cereus* происходит расщепление лецитина яичного желтка с образованием жирных кислот и щелочно-продукта фосфохолина [5].

Для изучения продукции каталазы на предметное стекло наносили каплю 3%-ного раствора перекиси водорода и петлёй вносили исследуемую суточную культуру. Образование пузырьков газа подтверждало положительную каталазную активность.

Гидролиз крахмала обнаруживали после обработки агаровой пластинки раствором Люголя. Для этого на поверхность среды наливали 3-5 мл раствора Люголя. Среда, содержащая крахмал, окрашивалась в синий цвет, а зона гидролиза оставалась бесцветной [6, 7].

Для определения способности бактерий окислять глюкозу до глюконовой кислоты в аэробных условиях использовали среду Хью-Лейфсена. Посев производили уколом в два столбика агара, один из которых заливали 1 мл стерильного вазелинового масла. Посевы инкубировали в тер-

мостате в течение суток при температуре 37°C. При положительной реакции происходило желтовато-розоватое окрашивание среды в столбике без вазелина [8].

Гемолитическую активность идентифицируемых бактерий определяли при просмотре через 24 ч колоний, выросших на 5%-ном кровяном агаре. Наличие зон просветления вокруг колоний указывало на наличие в культуре гемолизина.

Результаты и обсуждение

Биоразнообразие бактерий рода *Bacillus*, выделенных с поверхности филоплана, представлено следующими видами: *Bac. laterosporus*, *Bac. mesentericus*, *Bac. mycoides*, *Bac. subtilis*, *Bac. cereus*, *Bac. megaterium*.

Выделенные представители идентифицировали в процессе изучения морфологических, культуральных, тинкториальных, физиолого-биохимических свойств [9].

Все идентифицированные бациллы являются аэробами или факультативными анаэробами, а также каталазо-положительными и имеют выраженную гемолитическую активность.

Это грамположительные, подвижные, прямые или слегка изогнутые палочки, содержащие внутриклеточные глобулы (эндоспоры), не окрашиваемые фуксином. Подвижные за счёт латерально или перетрихально расположенных жгутиков (обнаружение жгутиков проводили путём окраски клеток по методу Лёффлера в модификации Пешкова). Расположение клеток различное – от одиночных до длинных нитевидных цепочек [10].

Споры у представителей рода *Bacillus* расположены центрально и имеют эллипсоидную форму. Спорообразование не подавляется экспозицией на воздухе.

В состоянии покоя споры показывают высокую степень устойчивости к инактивации различными физическими факторами, включая влажный пар, высушивание, ультрафиолетовое гамма-излучение и окисляющие агенты.

Покоящиеся споры показывают невероятную долговечность и могут быть обнаружены в любом типе среды обитания на Земле.

У *Bac. laterosporus* отмечается отчётливая раздутость спорангия, а у остальных исследуемых бацилл этот признак отсутствует.

Для идентифицированных видов спороспособных бактерий характерны культуральные особенности роста на питательных средах.

На твёрдых питательных средах образуются гладкие, плёнчатые, сухие, складчато-морщинистые, маслянистые колонии с гладким или фестончатым краем.

На МПА колонии *Bac. subtilis* и *Bac. mesentericus* имеют вид плотных сухих морщинистых колоний, вросших в агар с волнистыми выступами по краю.

Bac. subtilis хорошо образует споры на картофельном агаре. Эндоспоры эллипсоидные, расположены центрально и не выходят из размеров спорангия. Околоспоральных включений не обнаружено.

Через 48 ч роста при температуре 37°C на суспо-агаре культура имеет непрозрачные матовые колонии с фестончатым краем. Хорошо снимается петлёй с поверхности агара.

Культура не растёт в анаэробных условиях и при 10%-ном NaCl не образует газ из NO.

Состав питательных сред играет решающую роль для обнаружения *Bac. cereus*. Низкая требовательность к условиям, необходимым для роста, приводит к тому, что *Bac. cereus* может размножаться на любых экологических нишах филлосферы и при массовом обсеменении приводить к возникновению токсикоинфекции. В связи с этим представляет интерес применение оптимальной селективной среды, позволяющей в один приём выделить чистые культуры данного микроорганизма.

Бактериологические лаборатории нашей страны для выделения *Bac. cereus* используют солевой полимиксиновый агар с 2-, 3-, 5-трифенилтетразолий хлоридом (2, 3, 5 ТТХ), имеющий длительный срок выделения *Bac. cereus* (48 ч).

На солевом полимиксиновом агаре с 2, 3, 5 ТТХ он образует яркие рубиновые колонии за счёт восстановления ТТХ и зону преципитации диаметром 4-5 мм за счёт реакции с желточной эмульсией.

На селективной питательной среде, изготовленной ФГУП «Питательные среды» колонии *Bac. cereus* молочно-белого цвета со слегка изрезанными краями, диаметром 1,8-2,5 мм, окружённые зоной коагулянта светло-фиолетового цвета, диаметром 4 мм (проявление лецитиназной активности).

Данная среда обладает более высокой скоростью роста *Bac. cereus* (18-20 ч).

На 5%-ном кровяном агаре колонии *Bac. cereus* образуют плотные, преломляющие свет, восковидные колонии с перламутровым отливом, а на глюкозно – солевом агаре – сплошные белые колонии.

Основным дифференцирующим признаком *Bac. cereus* является проявление лецитиназной активности, а у идентифицированных нами *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Bac. mycoides*, *Bac. laterosporus* и *Bac. megaterium* она отсутствует.

Bac. mycoides на МПА с добавлением 40%-ного раствора глюкозы образуют беловато-серый налёт с ветвистыми выростами. На 5%-ном кровяном агаре образует сероватые зернистые колонии.

В названии *Bac. mycoides* отражена его способность развиваться на питательных средах в виде ложногрибового налёта (лат. *mycoides* – грибовидный), напоминающий мицелий грибов.

При росте на жидких питательных средах, в частности на декстрозном бульоне, отмечалось образование мощной складчатой плёнки и помутнение среды у всех видов висеянных видов бацилл, за исключением *Bac. mycoides*, образующей паутинную плёнку, которая в пробирке располагается в форме конуса основанием вверх.

Все выделенные представители дают обильный рост на используемых в экспериментальной работе питательных средах.

В таблице 1 проведён сравнительный анализ морфологических, тинкториальных, культуральных, физиолого-биохимических свойств бактерий рода *Bacillus*, выделенных с поверхностей филлоплана: Берёзы повислой (*Betula pendula*), Берёзы белой (*Betula alba*), Ольхи мелкопильчатой (*Alnus serrulata*).

Количественные показатели идентифицированных представителей рода *Bacillus* с поверхности филлоплана растений Берёзы повислой (*Betula pendula*), Берёзы белой (*Betula alba*), Ольхи мелкопильчатой (*Alnus serrulata*) варьировали в период наблюдений.

Отмечено, что в филлосфере хорошо развитых растений количество микроорганизмов было меньше, чем на поверхности слабых растений. Это объясняется тем, что мощное растение вырабатывает больше бактерицидных и бактериостатических веществ, приводящих к снижению численности микробоценоза.

Эпифитная микрофлора растений характеризуется большой вариабельностью как по численности, так и составу, в зависимости от сезонного развития растений, метеорологических условий, вегетационного периода, вида растений, возраста, типа почвы, условий произрастания, их высоты и целостности [11].

Таблица 1
Сравнительная характеристика морфологических, культуральных, тинкториальных, биохимических свойств некоторых видов рода *Bacillus*, высеянных с поверхностей филлоплана

Виды рода <i>Bacillus</i>	Морфология клеток	Вид колонии	Условия роста	T, °C max/min	Подвижность	Лецитиназа	Каталаза	Гидролиз крахмала	Маннит	Глюкоза	Гемолитическая активность	Форма спор	Раздутость спорангия
<i>B. cereus</i>	Гр+ палочки 1,0-1,2/3-5 мкм	Сероватые, плёчатые, со слегка изрежанными краями	Аэроб или факультативный анаэроб	45/10°	+	+	+	+	-	+	+	Эллипсо-видные	-
<i>B. laterosporus</i>	Гр+ палочки 0,5-0,8/2-5 мкм	Гладкая маслянистая	Аэроб	50/15°	+	-	+	-	+	-	+	Эллипсо-видные	+
<i>B. mycoides</i>	Гр+ палочки 0,8-1,2/2-4 мкм	Сочный беловатосерый плёчатый рост с ветвистыми выростами	Аэроб или факультативный анаэроб	42/10°	+	-	+	+	-	+	+	Эллипсо-видные	-
<i>B. megaterium</i>	Гр+ палочки 1,2-1,5/2-5 мкм	Кожистые складчатые	Аэроб	45/3°	+	-	+	+	+	+	+	Эллипсо-видные	-
<i>B. subtilis</i>	Гр+ палочки 0,7-0,8/2-3 мкм	Сухие, морщинистые с волнистыми краями	Аэроб	55/5°	+	-	+	+	+	+	+	Эллипсо-видные	-
<i>B. mesentericus</i>	Гр+ палочки, тонкие 0,5-0,6/3-10 мкм	Желтовато-бурые, сухие морщинистые	Аэроб	45/10°	+	-	+	+	+	+	+	Эллипсо-видные	-

Квантитативные показатели микроорганизмов рода *Bacillus*, выделенные с представителей растений семейства Берёзовые (*Betulaceae*), ($\text{КОЕ} \times 10^6 / \text{г}$)

Названия растений	2008 г.		2009 г.	
	весенний период	летний период	весенний период	летний период
<i>Betula pendula</i>	15,4±0,22	9,2±0,24	18,6±0,15	6,6±0,09
<i>Betula alba</i>	14,1±0,19	7,6±0,13	16,2±0,07	8,1±0,06
<i>Alnus serrulata</i>	13,5±0,16	6,4±0,11	15,5±0,19	7,3±0,07

В начале вегетации листья растений были заселены главным образом бактериальным сообществом *Bacillus spp*, *Pseudomonas spp*, *Bact. Herbicola aureum*, *Erwinia sp.* и др.). На стареющих листьях повышается содержание беспоровых молочнокислых бактерий *E. coli*, плесневых и дрожжеподобных грибов.

В таблице 2 отражены квантитативные показатели идентифицированных видов бацилл на исследуемых растениях за 2008-2009 гг. Анализируя табличные данные, можно сделать вывод, что в весенний период количество микроорганизмов рода *Bacillus*, выделенных с поверхностей филлоплана, примерно в 2 раза выше, чем в летний период. Это объясняется воздействием солнечной инсоляции и достаточным увлажнением листовых пластинок. Наибольшей бациллярной обсемененностью обладает *Betula pendula* (15,4±0,22 и 18,6±0,15), а наименьшей – *Alnus serrulata* (13,5±0,16 и 15,5±0,19) в весенние периоды.

Сравнивая динамику количественных колебаний эпифитной микрофлоры, в том числе и представителей рода *Bacillus* за 2005-2007 гг., следует отметить, что в весенний период 2005 г. поверхность филлоплана растений г. Ставрополя подверглась воздействию кислотных осадков (рН 4,5-5,0), что привело к уменьшению количества эпифитной микрофлоры, в том числе представителей рода *Bacillus*. В 2006-2007 гг. отмечалось увеличение количества эпифитной микрофлоры на поверхностях филлоплана.

Заключение

В ходе экспериментальной работы выделены, идентифицированы и изучены морфофизиологические, культуральные, тинкториальные и биохимические свойства видов *Bacillus*, выделенных с поверхностей филлоплана Берёзы повислой (*Betula pendula*), Берёзы белой (*Betula alba*), Ольхи мелкопильчатой (*Alnus serrulata*).

Проанализирован рост выделенных представителей рода *Bacillus* на различных питательных средах.

Установлено, что на твёрдых питательных средах консистенция колоний различна. Культуры *Bac. subtilis* и *Bac. mesentericus* образуют плотные, выросшие в агар, сухие морщинистые колонии, а *Bac. mycoides*, *Bac. laterosporus*, *Bac. cereus* – пастообразные, слизеобразующие, гладкие колонии.

Важным диагностическим признаком для определения видов спорозоносных бактерий является строение края колонии. У *Bac. cereus* края колонии изрезанные; *Bac. mycoides* – ветвистые выросты; *Bac. subtilis*, *Bac. megaterium*, *Bac. mesentericus* – волнистые; *Bac. laterosporus* – гладкие.

В ходе исследования выявлено увеличение идентифицированных представителей рода *Bacillus* в весенний период 2008-2009 гг.

В данной работе дан сравнительный анализ идентифицированных микроорганизмов рода *Bacillus*, высеванных с поверхности филлоплана: *Bac. laterosporus*, *Bac. mesentericus*, *Bac. mycoides*, *Bac. subtilis*, *Bac. cereus*, *Bac. megaterium*.

В связи с переходом к биологическому земледелию и интенсивно разрабатываемым методам биологической защиты растений данная тема имеет теоретическое значение и подлежит дальнейшему экспериментальному исследованию.

Библиографический список

- Новикова Н.С. Бактериальная флора надземных органов растений / Н.С. Новикова. – Киев: Наука Думка, 1983. – 86 с.
- Громов Б.В. Экология бактерий / Б.В. Громов, Г.В. Павленко. – Л.: Наука. – 22 с.
- Межидов М.М. Справочник по микробиологическим питательным средам / М.М. Межидов. – М.: Медицина, 2003. – 202 с.
- Пивоваров Ю.П. Пищевые отравления, вызываемые *Bac. cereus*, и их диагностика: метод. ук. № 06-5476 от 22.10.70 / Ю.П. Пивоваров.
- Патент № 2201965. Питательная среда для выделения *Bac. cereus* / З.З. Султанов, Л.С. Кулакова.

6. Султанов З.З. Селективная питательная среда для выделения *Bacillus cereus* / З.З. Султанов, Л.С. Кулакова, Л.Г. Перепелица, С.К. Абдуганиева; ред. М.В. Иванов // Микробиология. – 2004. – № 4. – С. 74-76.

7. Ушакова Н.А. Прикладная биохимия и микробиология / Н.А. Ушакова, Е.В. Котенкова, А.А. Козлова, А.В. Нифатов. – М.: Наука, 2006. – Т. 52. – 322 с.

8. Быков А.С. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии / А.С. Быков, А.А. Воробьев, Ю.С. Кривошеин. – М.: ACADEMIA, 2001. – 85 с.

9. Хоулт Дж. Определитель бактерий Берджи / Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снит. – М., 1997. – 652 с.

10. Леванова Г.Ф. Молекулярно-биологические способы идентификации и дифференциации бактерий / Г.Ф. Леванова, О.В. Парфёнова, С.Ю. Кашников. – М.: ACADEMIA, 1995. – 158 с.

11. Заикина И.А. Экологическая роль бактериального сообщества эпифитов филлосферы в жизнедеятельности растений: автореф. дис. ... канд. биол. наук / И.А. Заикина. – Ставрополь: СГУ, 2008. – 21 с.



УДК 574:631.452.622.342

С.Е. Низкий

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ САМОВОССТАНОВЛЕНИЯ ФИТОЦЕНОЗОВ НА МЕСТАХ КАРЬЕРНЫХ РАЗРАБОТОК В УСЛОВИЯХ ХВОЙНО-ТАЕЖНЫХ ЛЕСОВ СЕВЕРНОЙ ЗОНЫ АМУРСКОЙ ОБЛАСТИ

Ключевые слова: карьер, БАМ, хвойные таежные леса, ложе, терраса, склон, водоем, растительность, лиственница, береза.

Введение

Карьеры (фр. *carriere* – совокупность горных выработок, образованных при добыче полезного ископаемого открытым способом [1]) в настоящее время стали неотъемлемым элементом современного техногенного ландшафта. Карьеров достаточно много вокруг городов и других населенных пунктов, вдоль строящихся железных и шоссейных дорог. В Амурской области велось строительство Байкало-Амурской магистрали (БАМ) и автомобильной дороги Чита – Хабаровск. Общая протяженность каждой из этих дорог более 3 тыс. км. В настоящее время по территории области прокладывается нефтепроводная система [2]. Вдоль этих объектов открыто большое количество карьеров.

Карьеры наносят большой ущерб биоценозам. На месте самого карьера они просто уничтожаются. Лес сводится, почва разрушается. Создание карьеров отражается и на ландшафтах, прилегающих

к нему территорий. Изменяется рельеф. Если это гора или возвышенность, то они исчезают, на равнинных участках образуются глубокие котлованы, которые впоследствии заполняются водой, возникают искусственные водоемы. Рекультивационные работы после прекращения их эксплуатации, особенно при строительстве дорог, как правило, не проводятся.

С целью изучения процессов самовосстановления разрушенных биоценозов при строительстве БАМа были обследованы заброшенные карьеры в окрестностях железнодорожной станции «Февральск» Амурской области.

Объект и методы исследования

Эксплуатация исследуемых карьеров завершилась с окончанием строительства железной дороги, т.е. в 1985 г. Исследования проведены в 2005-2006 гг. Период восстановления на момент проведения исследований можно оценить в 20-25 лет. Всего было обследовано 5 карьеров. Все карьеры отличаются друг от друга по глубине и размерам (объемам выбранного грунта). Объединяет их то, что все они имеют высокие и обрывистые склоны. Учитывая рельеф местности в данном