ПОЧВОВЕДЕНИЕ

1982 № 11

КОЖЕВИН П. А., КОЧКИНА Г. А., КИРИЛЛОВА Н. П.,
ГРАДОВА Н. Б., ЗАЙЦЕВ С. А., ГАДЖИЕВА В. И.

ЗАГРЯЗНЕНИЕ ПОЧВ ДРОЖЖАМИ CANDIDA GUILLIERMONDII

В работе рассмотрены особенности микробного загрязнения почв дрожжами Candida guilliermondii. Численность популяции после внесения в образцы почв разных типов непрерывно убывает во времени. Отсутствие выраженной стабилизации численности указывает на неприспособленность дрожжей к автономному обитанию в почвах, ризоплане и ризосфере растений.

Показано, что отходы и продукты микробиологической промышленности могут выступать в качестве одного из видов загрязнения окружающей среды, что делает необходимым изучение соответствующих микроорганизмов или продуктов их жизнедеятельности в различных объектах внешней среды.

В настоящем сообщении приведены результаты изучения загрязнения почв дрожжами Candida guilliermondii — популяцией, используемой в качестве продуцента на крупнотоннажных заводах БВК при получении кормовых дрожжей из *н*-парафинов нефти. Анализ динамики численности в нестерильных местообитаниях служил основным подходом при изучении конкретного микробного загрязнения почв.

Количественный учет исследуемой популяции проводили как с помощью микроскопии на основе прямого метода иммунофлуоресценции [4], так и при посеве на агаризованное сусло с добавлением стрептомицина (100 мкг/мл) для подавления почвенных бактерий. Постоянным контролем во всех случаях служили соответствующие увлажненные почвенные образцы без внесения дрожжевой популяции. Спектр специфичности реакции иммунофлуоресцентного окрашивания оказался широким, что соответствует литературным данным для мицелиальных грибов и дрожжей [5, 6]. Однако перекрестные реакции не служили помехой при выявлении клеток C. guilliermondii, если начальный уровень внесения данной популяции превышал 10^8 клеток/г почвы. Поэтому количественный учет с помощью люминесцентной микроскопии (микроскоп МЛ-4, объектив 90×) использовали для изучения динамики популяции при ее высокой популяционной плотности. Учет с помощью посева оказался приемлемым и при весьма низких значениях популяционной плотности: лишь в некоторых единичных случаях возникала необходимость в корректировке полученного показателя с вычетом кандидоподобных дрожжевых колоний, выросших в контрольном варианте без внесения исследуемой популяции.

Во всех основных опытах количественному учету предшествовала предварительная обработка суспензий на низкочастотном ультразвуковом диспергаторе типа УЗДН-1 (22 кГц; 0,40 А; 2 мин). Биомассу дрожжей для внесения в почву выращивали на агаризованном сусле (28°, 5 сут), трижды отмывали от остатков среды стерильной водой, подсчитывали число клеток в полученной суспензии и устанавливали требуемый в конкретном эксперименте уровень внесения.

Основная часть работы выполнена при исследовании чернозема типичного, мощного, среднесуглинистого на легком покровном суглинке (Воронежская обл.) — верхний горизонт ($А_{дерн.}$, 0—10 см) и дерново-слабоподзолистой сильноокультуренной почвы (глубина 0—20 см на территории почвенного стационара МГУ). В варианте с дерново-подзолистой почвой проводили также дифференциальное исследование в системе ячмень — почва для зон ризосферы и ризопланы ячменя Hordeum vulgare, сорт Факел.

Увлажненные до 60% от полной влагоемкости (ПВ) почвенные образцы инкубировали при 20° с отбором проб для анализа через определенные промежутки времени. В опытах с растениями семена ячменя (20 семян на сосуд емкостью 1 л) высевали сразу же после внесения популяции дрожжей. Дифференциацию зон ризосферы и ризопланы проводили с помощью специальных манипуляций [1].

Динамику почвенных бактерий и грибов в связи с рассматриваемым микробным загрязнением исследовали в отдельных опытах с помощью микроскопических методов [3].

В серии опытов, непосредственно связанных с анализом почв вблизи заводов БВК, были проанализированы 174 выделенные дрожжевые культуры. Анализ проведен по списку основных морфологических, культуральных, биохимических и других признаков [7] вне зависимости от произвола в систематике: задача состояла не в определении, а в отборе из всего массива тех культур, которые по обширному набору характеристик максимально соответствовали бы штамму ВСБ-569, выступающему в роли своеобразного эталона. Была сделана также попытка иммунофлюоресцентного изучения динамики популяции производственной культуры в мелкоделяночных опытах с внесением биомассы в почвы непосредственно в районе заводов БВК.

Последовательная выбраковка культур на основе практически всего используемого в определителях списка признаков в конечном счете позволила обособить группу из пяти культур, характеристики которых близки к таковым производственного штамма. Отобранная группировка к тому же давала максимальное специфическое свечение при иммунофлюоресцентном окрашивании меченой сывороткой производственного штамма. Таким образом, доля дрожжевых культур, претендующих на максимальное сходство с производственным штаммом, не превышает 3% среди комплекса дрожжей, выделенных из разных почв и, в частности, из почв вблизи заводов БВК. Изучение препаратов, приготовленных из почвенных образцов с моделированием загрязнения в мелкоделяночных опытах непосредственно вблизи предприятий показало, что при начальном уровне, равном 10^8 клеток/г почвы, уже через неделю после внесения не удается выявить и количественно учесть с помощью иммунофлюоресценции первоначально достаточно обильную популяцию. Учитывая возможности метода, можно считать, что за указанный срок популяционная плотность снизилась по крайней мере на порядок. Указанные результаты делают вероятным предположение о гибели привносимых в почву дрожжей, что соответствует данным опытов как по анализу дрожжевого комплекса, так и по иммунофлюоресцентному учету в условиях, максимально приближенных к реальным.

Проверку такого предположения с детальным анализом динамики популяции проводили в модельных лабораторных экспериментах. В этом случае можно вычленять действие конкретного фактора при сохранении относительного постоянства остальных параметров. К тому же в таких условиях можно компенсировать ограничения и недостатки разных методов количественного учета при их комбинированном применении.

Динамика численности популяции C. guilliermondii после внесения в чернозем (рис. 1) характеризуется ясной тенденцией к снижению популяционной плотности во всех вариантах. Снижению популяционной плотности может предшествовать поддержание численности на уровне внесения, но такое явление наблюдается в той или иной степени только первые 10 сут после внесения. Наиболее показательной является зависимость процессов выживания от уровня внесения: более обильному внесению соответствуют более выраженные процессы гибели. Это правило оказывается справедливым для всего рассматриваемого временнóго интервала (до 60 сут), но наиболее ярко проявляется относительное возрастание процессов гибели при увеличении начальной популяционной плотности в промежутке от 10 до 20 сут.

Действительно, при обильном внесении популяции (10^9 клеток/г почвы) численность популяции к 20-м сут снижается почти на 4 порядка,

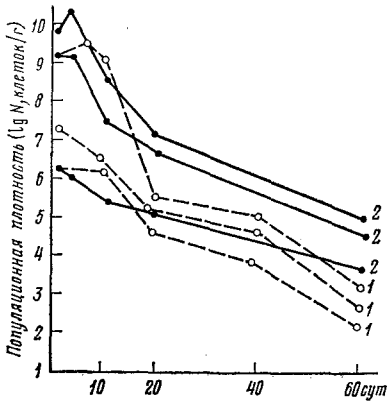

Рис. 1

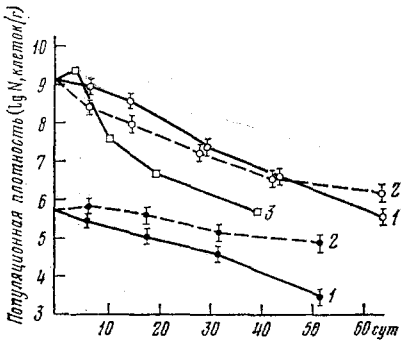

Рис. 2

Рис. 1. Динамика численности популяции C. guilliermondii в черноземе (*1*) и в дерново-подзолистой почве (*2*)

Рис. 2. Динамика численности популяции C. guilliermondii в ризоплане (*1*), ризосфере (*2*) и почве без растения (*3*)

Рис. 3. Схема предполагаемых механизмов регуляции численности популяции C. guilliermondii

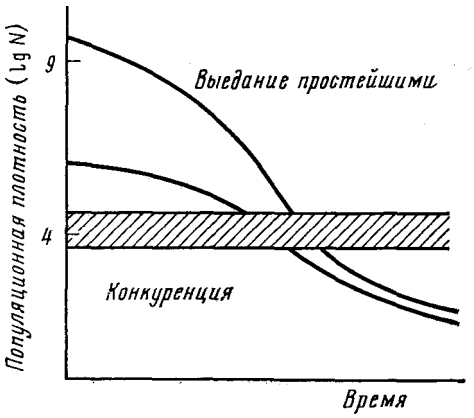

Рис. 3

тогда как в варианте с наименьшей начальной плотностью популяции (10^6 клеток/г почвы) численность популяции уменьшилась не более чем на 2 порядка. После снижения популяционной плотности примерно до уровня 10^5 клеток/г почвы, динамика во всех трех вариантах в принципиальном отношении не различалась, т. е. кривые имели одинаковый наклон и их можно совместить при перемещении по вертикали.

Отмеченная закономерность в основном наблюдается и на дерново-подзолистой почве: к 60-м сут и здесь в варианте с обильным внесением численность популяции убывает на 4 порядка, тогда как при наиболее низкой начальной популяционной плотности популяция уменьшается только на 2 порядка (рис. 1). Таким образом, детерминация динамики популяции уровнем начального внесения — существенное свойство, которое в первом приближении можно охарактеризовать как увеличение способности почв к самоочищению при увеличении масштаба данного микробного загрязнения. Вместе с тем динамика популяции в дерново-подзолистой почве имеет и свои особенности. В первые 3 сут на высоких уровнях внесения зарегистрированы процессы размножения, тогда как убывание численности с самого начала опыта наблюдалось в варианте с наименьшей популяционной плотностью. Тем не менее такая особенность является наименее существенной, если ее сравнивать с рассмотренной выше детерминацией динамики уровней внесения. Если же сравнивать две почвы с точки зрения выживания данной культуры, то для этого необходимо рассмотреть поведение популяции в разных почвах при условии совпадения начального уровня (рис. 1). Такой анализ показывает, что в конечном счете к 60-м сут опыта чернозем оказался наиболее неблагоприятной средой для выживания C. guilliermondii по сравнению с дерново-подзолистой почвой.

При обильном внесении дрожжевой популяции в почву в структуре комплекса почвенных микроорганизмов происходят весьма ощутимые изменения: длина мицелия грибов через 2 недели опыта превышает исходный и контрольный показатели в 3—4 раза, достигая 300—500 м в 1 г почв. Увеличивается также в 2—3 раза общая численность почвенных бактерий. Можно предположить, что причины развития бактерий и грибов могут быть связаны с утилизацией отмирающей дрожжевой биомассы.

Динамику численности C. guilliermondii в ризосфере (почва вблизи корней) и ризоплане (корневая поверхность) изучали при двух начальных уровнях внесения популяции (10^9 и 10^6 клеток/г почвы, рис. 2). И в этом случае отмечена детерминация динамики уровня внесения — более обильному внесению отвечает более заметный процесс гибели. Численность популяции постепенно снижалась как в ризосфере, так и в ризоплане, однако при высоких значениях численности ризоплана представляется более благоприятной средой для выживания, чем ризосфера. Наоборот, при низких плотностях популяции ризосфера становится относительно более благоприятной зоной для поддержания дрожжей. В целом сравнение динамики популяции в ризоплане, ризосфере и контрольной почве без растения, выполненное для одного и того же уровня внесения, показывает, что ризоплана и ризосфера — местообитания более благоприятные для C. guilliermondii, чем почва без растения (рис. 2). Значения популяционной плотности вблизи растения на порядок и более могут превышать таковые в контрольной почве, что ставит вопрос о возможности преимущественного сохранения данного микробного загрязнения в местах контакта с растительностью.

Во всех изученных вариантах опытов не удалось зарегистрировать стабилизацию численности популяции C. guilliermondii. Ситуация с отсутствием стабилизации после внесения популяции в различные местообитания (нестерильные почвы, ризоплана и ризосфера) — признак неприспособленности данных микроорганизмов к обитанию в этих средах, что позволяет рассматривать C. guilliermondii как аллохтонную популяцию, не свойственную почве и привнесенную в нее извне.

Вместе с тем скорость отмирания при низкой популяционной плотности невелика во всех случаях, и соответственно даже небольшое постоянное или периодическое поступление клеток C. guilliermondii в рассматриваемые местообитания может способствовать стабилизации численности на определенном уровне. Крайне существенно, что при обильном внесении популяции в почву, ризоплану и ризосферу скорость гибели существенно возрастает. Таким образом, при высокой «нагрузке» на рассматриваемые нестерильные местообитания их способность к самоочищению увеличивается. Обычным же является стойкое представление о том что, чем больше внесено клеток в ту или иную среду, тем успешнее популяция начинает размножаться и тем медленнее отмирает в силу так называемого «группового», или «кооперативного», эффекта. Поскольку в наших опытах такой автопопуляционный механизм не проявился, следует рассмотреть причины, которые могли бы определять ускоренную гибель при высокой численности клеток.

Популяция C. guilliermondii прекрасно сохраняется в условиях достаточно продолжительного голодания в фосфатном буфере: за 2 недели опыта ее численность снижается не более чем в 1,5—2 раза. Поэтому реально фиксируемые в нестерильных местообитаниях процессы гибели практически не связаны с популяционными потерями в результате голодания — здесь действует другой механизм элиминации. Примечательно, что такой механизм регуляции сравнительно быстро понижает численность до некоторого уровня (около 10^4—10^5 клеток/г почвы), а затем оказывается неэффективным, и популяция отмирает с более низкими скоростями, т. е. гибель идет существенно медленнее.

Это означает, что рассматриваемый для высоких уровней численности механизм регуляции имеет пороговое значение популяционной плотности дрожжей. При уменьшении размеров популяции ниже этого порога дан-

ный механизм регуляции заменяется другим. Такое проявление элиминации хорошо согласуется, например, с действием механизма хищник — жертва [2]: почвенные простейшие могут регулировать численность жертвы лишь при ее высокой численности. Можно высказать предположение относительно механизма регуляции численности данной популяции при низких уровнях популяционной плотности, где заведомо отсутствует выедание. Для этого целесообразно обратить внимание на сходный характер динамики в этом случае в разных опытах и различных местообитаниях. Поскольку в этих зонах (почвы, ризосфера, ризоплана) условия различаются [1], то очевидно, что сходство наблюдаемой удельной скорости роста во многом определяется внутрипопуляционным механизмом — конкуренцией за питание, т. е. в условиях отсутствия выедания популяция медленно отмирает благодаря присущей ей способности длительно сохраняться в условиях голодания (рис. 3).

Выводы

1. Динамика популяции C. guilliermondii определяется условиями конкретного местообитания и начальным уровнем внесения. Во всех местообитаниях более обильному внесению соответствует более высокая скорость гибели.

2. Численность популяции после внесения в образцы почв различных типов непрерывно убывает во времени. Наиболее неблагоприятной средой для сохранения популяции оказался чернозем, относительно благоприятные условия отмечены в ризосфере растений.

Литература

1. *Кириллова Н. П., Стасевич Г. А., Кожевин П. А., Звягинцев Д. Г.* Динамика популяций бактерий в системе почва — растение.— Микробиология, т. 50, 1981, с. 128.
2. *Кожевин П. А.* Люминесцентно-микроскопическое изучение комплекса микроорганизмов и отдельных микробных популяций в почве: Дис. на соискание уч. ст. канд. биол. наук. МГУ, 1976.
3. *Кожевин П. А., Полянская Л. М., Звягинцев Д. Г.* Динамика развития различных микроорганизмов в почве.— Микробиология, 1979, т. 48, с. 490.
4. Люминесцирующие антитела/Под ред. Мейсель М. Н. М.: Медицина, 1972.
5. *Силуянова Н. А.* Иммунолюминесцентная диагностика кандидозов. Л.: Медицина, 1971.
6. *Aries V.* An immunofluorescent technique for rapid control of the purity of yeasts cultures.— Europ. J. Appl. Microbiol., 1976, v. 2, № 2, p. 113.
7. The yeasts (a taxonomic study)/Ed. Lodder J. Amsterdam — London: North-Holland publ. comp., 1970.

Факультет почвоведения МГУ

Поступила в редакцию
19.IX.1981

KOZHEVINA P. A., KOCHKINA G. A., KIRILLOVA N. P., GRADOVA N. B., ZAITSEV S. A., GADZHIYEVA V. I.

SOIL POLLUTION BY CANDIDA GUILLIERMONDII YEASTS

Some aspects of the soil microbial pollution by Candida guilliermondii yeasts are discussed. The yeast population continuously decreased ater being introduced in soil samples of various soil types. The absence of a distinct stabilization of the population amount testifies to the disability of yeasts to survive autonomously in soils, rhizoplane and rhizosphere of plants.