

УДК 579.64:631.811.98

## МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ СОСТАВЛЯЮЩАЯ ПРЕПАРАТА ГУМИПИТ

С.А. ДОБРЫНИН<sup>1</sup>,  
Л.С. НАЗАРОВА<sup>2</sup>, В.А. НАЗАРОВ<sup>2</sup>,  
А.В. НАЗАРОВ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ООО «АДМ»,

<sup>2</sup>САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАР-  
НЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. Н.И. ВАВИЛОВА

Гумипит содержит споровые формы бактерий, нитчатых грибов и дрожжей, обладающих протеазной, целлюлазной и нитрифицирующей активностью, липомицетов, а также неспорные формы бактерий, растущие на средах для нитрификаторов. Препарат стимулировал развитие эпифитных дрожжей зерна овса с одновременным исчезновением плесневых грибов.

**Ключевые слова:** Гумипит, микрофлора, эпифиты зерна.

В настоящее время для получения экологически безопасной продукции растениеводства все чаще стали использовать в земледелии гуминовые удобрения, которые вырабатываются из природного сырья. В их состав входят легкодоступные для питания растений макро- и микроэлементы. Помимо этого они содержат полезные для почвы и роста растений микроорганизмы. В настоящее время имеется большой выбор различных гуминовых препаратов, полученных из относительно дешевого природного сырья – в основном из угля, меньше – из торфа, хотя последний богат неорганическими и органическими веществами. Он привносит в почву целый ряд питательных элементов. Особенно их много имеется в низинном торфе, на долю гуминовых веществ в котором приходится от 20 до 70% [2].

Цель работы: изучение микрофлоры гуминового препарата гумипит и его влияние на эпифиты зерна злаковых культур.

В задачи исследования входило определение микроорганизмов, использующих органический азот, нитрификаторов, азотфиксаторов и целлюлозоразрушающих микроорганизмов, а также эпифитов зерна овса до и после инокуляции семян гумипитом.

## MICROBIOLOGICAL COMPOSITION OF PREPARATION HUMIPIT

S.D. DOBRYNIN, L.S. NAZAROVA,  
V.A. NAZAROV, A.V. NAZAROV

Humipit contains spore forming bacteria, mycelia fungi and yeast, possessing protease, cellulase and nitrifying activities, as well as Lypomyces and non spore forming bacteria, growing on the media for nitrifying. The preparation stimulated the development of yeast epiphytes on the oats grain with simultaneous disappearance of mould fungi.

**KEYWORDS:** Humipit, microflora, grain epiphytes.

## МЕТОДИКА

Промышленно выпускаемую питательную среду – мясо-пептонный агар (МПА) готовили согласно инструкции. Голодный агар, среду Эшби, среду для выявления целлюлозоразрушающих микроорганизмов, среды для выявления бактерий первой и второй фазы нитрификации, готовили согласно [9]. Протеазную активность определяли, помещая фотобумагу в неразведенный препарат, и при его разведении в  $10^{-2}$ -  $10^{-4}$  степени.

Приготовление суспензии из гумипита, методы его посева на питательные среды и обнаружение эпифитов на зерне осуществляли согласно методикам [9]. Для посева на МПА готовили суспензию, разводя исходный препарат до  $10^{-2}$ ;  $10^{-3}$ ;  $10^{-4}$ ;  $10^{-5}$ ;  $10^{-6}$ . Посев из каждого разведения гумипита проводили на три параллельные чашки Петри, которые инкубировали в течение трех суток при  $37^{\circ}$  С. Посев на другие среды проводили методом обрастания комочков почвы по Виноградскому. После истечения сроков инкубации вычисляли количество обросших комочков (% от исходного числа). Метод обработки зерна овса гумипитом: препарат разводили стерильной водой до различных концентраций: от  $10^{-2}$  до  $10^{-6}$  степени и намачивали в этих растворах зерно овса в течение 1

часа. После этого проводили посев зерна на МПБ, инкубировали при 30° С. В контроле зерно намачивали водой. Через трое суток проводили количественный учет КОЕ на зерне. Из выросших на всех средах колоний готовили мазки с окрашиванием их по Граму или по Гинсу.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Было установлено, что в Гумипите имелось небольшое количество мезофиллов (в среднем 1200), которые выросли на мясо-пептонном агаре, инкубированном при 37° С. Они были представлены в основном аэробными спорообразующими грамположительными палочками, относящимися к роду *Bacillus*, меньше было нитчатых грибов и дрожжей (рис. 1).

Колонии имели типичный для указанных выше микроорганизмов вид.

Бациллы образовывали колонии крупных размеров, плоские, с неровными краями белого цвета. В мазках из этих колоний обнаружены грамположительные довольно крупные палочки с закругленными концами, имевшие споры. При окраске по Граму споры выглядели в виде пустот в центре клеток, не превышающих диаметр последних.

Колонии нитчатых грибов были пушистыми, меньших размеров, компактными, белого цвета, вращались в агар. При окраске по Граму обнаружены длинные толстые нити, грамположительные.

Колонии дрожжей были беловато-кремового цвета мелкими, гладкими, легко снимались с поверхности агара. В мазках обнаружены грамположительные округлые клетки крупных размеров, часть из них в стадии почкования.



РИС. 1.  
Колонии микроорганизмов, содержащиеся в гумипите

С.А. ДОБРЫНИН, А.С. НАЗАРОВА,  
В.А. НАЗАРОВ, А.В. НАЗАРОВ  
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ  
СОСТАВЛЯЮЩАЯ ПРЕПАРАТА ГУМИПИТ

На среде Эшби в 37% случаев обнаружены дрожжи, по морфологическим и культуральным признакам относящиеся к роду *Lypotusces* [10].

В частности, при окраске по методу Гинса были обнаружены в мазках крупные округлой формы клетки, окруженные капсулой (рис. 2).

Кроме того, гумипит содержал 34% целлюлозоразрушающих нитчатых грибов и дрожжей (рис. 3).

На рис. 3 видно, что колонии грибов выросли вокруг комочков гумипита. Колонии разного вида и окраски. Некоторые белые, пушистые, репродуктивный мицелий имеет вид нитей, что особенно четко видно под лупой, наложенной на поверхность чашки. Другие колонии более компактные, белой окраски бархатистые. По краю чашки видны колонии зеленого цвета, мелкие. Между колониями грибов имеются более мелкие, белого цвета, гладкие с ровными краями. В мазках из этих колоний найдены дрожжи.

На средах для нитрификаторов вокруг комочков гумипита видны зоны растворения мела, что характерно для роста данных микроорганизмов. Это четко видно на рис. 4. Однако в мазках не обнаружены типичные представители грамотрицательных нитрификаторов первой и второй фаз, а имелись палочковидные грамположительные микроорганизмы разного размера и формы.

Среди микроорганизмов первой фазы нитрификации, количество которых составляло 12%, обнаружены различные по форме и тинкториальным признакам микробы: грамположительные толстые, средних размеров и очень крупные палочки, грамположительные тонкие палочки, мелкие грамположительные и грамотрицательные кокки, очень крупные шаровидной формы дрожжи. Обнаружены также споры. При окраске

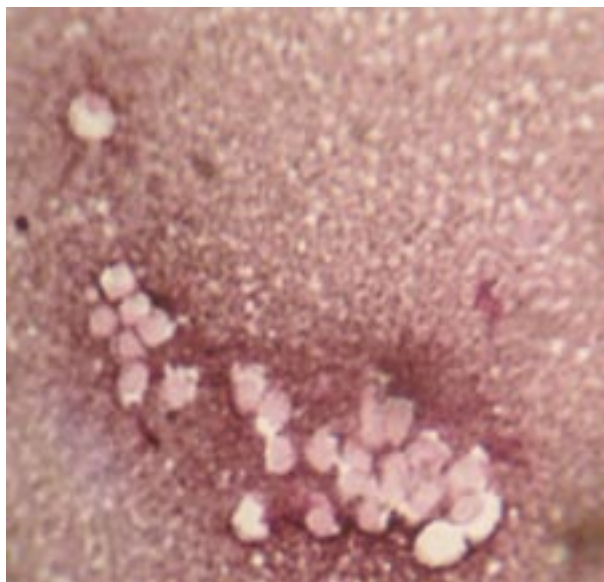


РИС. 2.  
Липомицеты, выросшие на среде Эшби. Окраска по Гинсу; × 900



Рис. 3.

Колонии микроорганизмов, выросшие на среде для определения целлюлозоразрушающих микробов



Рис. 4.

Колонии микроорганизмов, выросших на среде для нитрификаторов первой фазы

мазков из зоны обрастания комочков гумипита на среде для второй фазы нитрификации микроорганизмы были менее разнообразными и все окрашены по Граму положительно. Обнаружены пухлые и короткие палочки. Имелись палочки с биполярным окрашиванием, а также тонкие и короткие, окруженные толстой капсулой, и дрожжи. Количество всех микроорганизмов составило 20%. Рисунки некоторых микроорганизмов, выросших на средах для первой и второй фаз нитрификации, представлены ниже (рис. 5 и 6).

При исследовании эпифитов зерна установлено, что на необработанном гумипитом зерне присутствовали микроорганизмы в количестве  $8 \times 10^2$  м.к./г, среди которых доминировали плесневые грибы, могущие быть источником микотоксинов, опасных для здоровья человека и животных, было небольшое количество грамотрицательных и грамположительных палочковидных бактерий, последние образовывали споры.

Имелись единичные колонии желтого цвета, прозрачные, растекающиеся, сливающиеся друг с другом, напоминающие капли меда, в мазках из которых обнаружены дрожжи (рис. 7).

После намачивания зерна гумипитом количество эпифитов резко возросло, подчас их невозможно было сосчитать на пластине питательного агара, поскольку их уровень был выше  $8,4 \times 10^4$  колониеобразующих единиц/г. Изменялся микробный профиль. Чем больше было разведение гумипита, в котором намачивали зерно, тем больше среди колониеобразующих единиц были представлены колонии дрожжей, и практически исчезали плесневые грибы (рис. 8). При разведении гумипита до  $10^{-6}$  степени все колонии были представлены только дрожжевыми формами. По обитанию на поверхности зерна, по культуральным и морфологическим признакам их можно отнести к *Cryptococcus laurentii* [1].

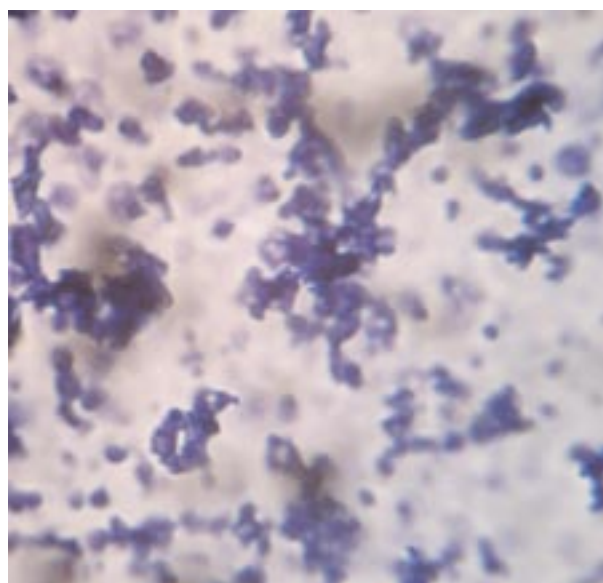


Рис. 5.

Мазок из зоны обрастания комочков гумипита на среде для нитрификаторов первой фазы. Окраска по Граму; X 900

При исследовании протеазной активности микроорганизмов гумипита установлено, что в маточном растворе препарата она отсутствовала, однако при его разведении проявилась, но в низком проценте случаев: от 5 до 2%.

Таким образом, результаты работы по исследованию гумипита – препарата, полученного из низинного торфа при ультразвуковой его обработке, показывают, что она привела к разрушению микроорганизмов в вегетативной форме с сохранением в препарате спор. В наших исследованиях на питательных средах, пред-



назначенных для культивирования микроорганизмов, разлагающих органические формы азота, были найдены спорообразующие формы аэробных мезофильных грамположительных бактерий – бацилл и грибов. На других средах, за исключением используемых для выращивания нитрификаторов первой и второй фаз, также обнаружены микроорганизмы, образующие споры (грибы и дрожжеподобные, в том числе дрожжи липомицеты).

На минеральных средах для выявления нитрификаторов нами обнаружены спорообразующие дрожжи и в основном грамположительные неспорообразующие бактерии, имеющие различную форму. Можно предположить, что на этих средах были культивированы нанобактерии. Известно, что наноразмеры имеются в атмосфере, почве, воде, телах людей и животных.

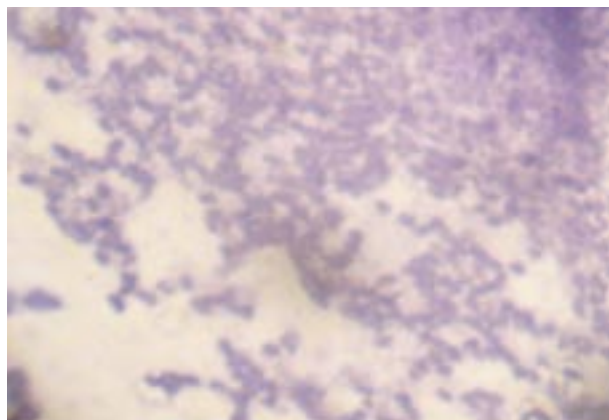


Рис. 6.

Мазок из зоны обрастания комочков гумипита на среде для нитрификаторов второй фазы. Окраска по Граму;  $\times 900$

С.А. ДОБРЫНИН, Л.С. НАЗАРОВА,  
В.А. НАЗАРОВ, А.В. НАЗАРОВ  
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ  
СОСТАВЛЯЮЩАЯ ПРЕПАРАТА ГУМИПИТ

Их суммарная масса превышает биомассу всех живых существ на планете. Они образуются как ответная реакция на неблагоприятные условия. Их сохранению способствует наличие утолщенной клеточной стенки и капсулы. Вместе с тем их можно культивировать на питательных средах. При этом они возвращаются к исходным формам [7, 8]. То есть можно заключить, что ультразвуковая обработка низинного торфа в процессе приготовления гумипита не была губительной и для части неспорообразующих олиготрофов, защищенных клеточной стенкой или капсулой.

Выявленные нами микроорганизмы в гумипите можно отнести к полезной микрофлоре, поскольку бациллы известны как антагонисты фикомицетов и агенты, высвобождающие доступный для растений фосфор [5, 10], почвенные аскомицеты рода *Lypomyces*



Рис. 8.

Эпифиты зерна овса после намачивания в растворе гумипита, разведенного в  $10^{-4}$  степени

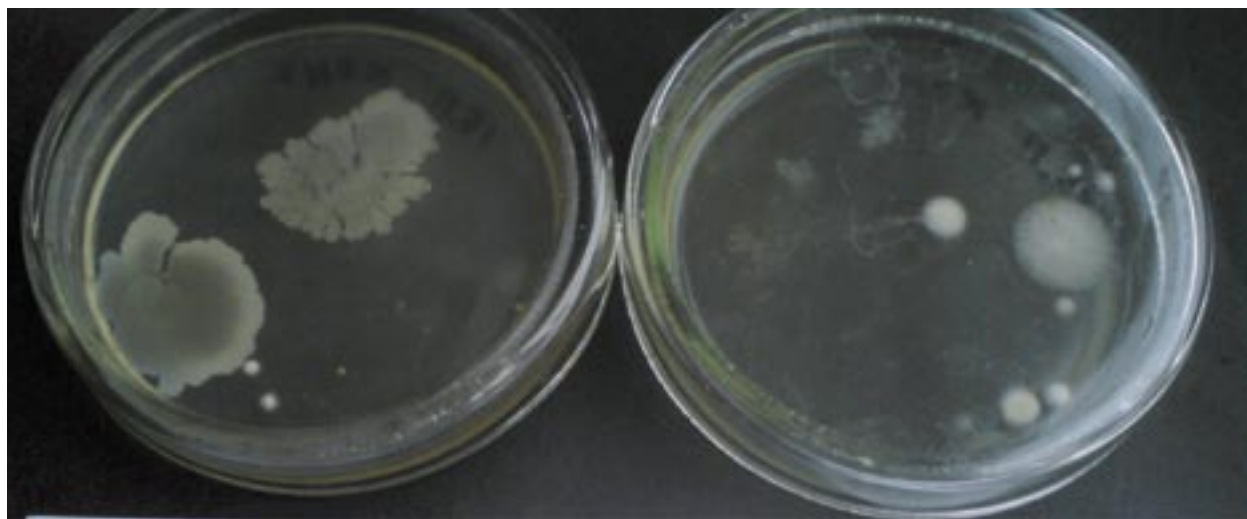


Рис. 7.

Колонии эпифитов зерна после замачивания в воде

являются спутниками бактерий – азотфиксаторов [1]. Гумипит содержит также нитрификаторы и разрушающие клетчатку грибы. Все выделенные нами микроорганизмы входят в состав микрофлоры, обеспечивающей почвенное плодородие [3, 4].

При обработке гумипитом зерна овса отмечено, что на его поверхности практически исчезают все другие микроорганизмы, в том числе плесени, но одновременно происходит размножение пигментообразующих дрожжей. По характерным признакам колоний: слизистая, стекающая консистенция, желтовато-оранжевая окраска эти дрожжи отнесены к роду *Cryptococcus* (*C. laurentii*). Они сапрофиты и присутствуют среди эпифитов зерна. Считается, что среди дрожжей нет видов, образующих токсические вещества для людей и животных [6]. То есть гумипит можно использовать для освобождения зерна овса от плесневых грибов перед его высевом.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. БАБЬЕВА И.П., ЧЕРНОВ И.Ю. Биология дрожжей, М., 2004. 239 с.
2. ВАСИЛЬЕВ В.А. и др. Органические удобрения в интенсивном земледелии. М.: Колос, 1984. С. 156–173.
3. ГОЛОВЧЕНКО А.В., ТИХОНОВА Е.Ю., ЗВЯГИНЦЕВ Д.Г. Численность, биомасса, структура и активность микробных комплексов низинных и верховых торфяников // Микробиология. 2007. Т. 76, № 5. С. 711–719.
4. ДОБРОВОЛЬСКАЯ Т.Г., ГОЛОВЧЕНКО А.В., КУХАРЕНКО О.С., ЯКУШЕВ А.В., СЕМЕНОВА Т.А., ИНИШЕВА Л.И. Структура микробных сообществ верховых и низинных торфяников Томской области // Почвоведение. 2012. № 3. С. 317–326.
5. ЖИГЛЕЦОВА С.К., ДУНАЙЦЕВ И.А., БЕСАЕВА С.Г. Возможности применения микроорганизмов для решения задач экологической и продовольственной безопасности // Агрохимия. 2010. № 6. С. 83–96.
6. Жизнь растений. В 6 томах. Т. 2. Грибы. Под ред. Н.В. Горленко. М.: Просвещение, 1976. С. 91–106.
7. ПОЛЯНСКАЯ Л.М. и др. Размеры бактерий в черноземе в ходе микробной сукцессии при инкубировании в аэробных и анаэробных условиях // Почвоведение. 2012. №11. С. 1181–1187.
8. СОИНА В.С. и др. Электронно-микроскопическое изучение ультрамикробактерий (наноформ в почвах и подпочвенных отложениях) // Почвоведение. 2010. №11. С. 83–86.
9. ТЕППЕР Е.З., ШИЛЬНИКОВА В.К., ПЕРЕВЕРЗЕВА Г.И. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для вузов. Под ред. В.К. Шильниковой. 5-е изд., перераб. и доп. М.: Дрофа, 2004. 256 с.
10. ТИХОНОВИЧ И.А., ПРОВОТОРОВ Н.А. Симбиозы растений и микроорганизмов // Молекулярная генетика агроэкосистем будущего. СПб., 2009. 210 с.

#### Добрынин Сергей Дмитриевич,

к.э.н., доцент, генеральный директор ООО «АДМ»,

☎ 410078, г. Саратов, ул. Университетская, д. 45/51,  
тел.: +7 (8452) 50-69-43

#### Назарова Лариса Степановна,

д.м.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии и биотехнологии Саратовского государственного аграрного университета им. Н.И. Вавилова,

☎ тел.: +7 (8452) 69-27-03

#### Назаров Виктор Алексеевич,

д.с.-х.н., профессор кафедры химии, агрохимии и почвоведения Саратовского государственного аграрного университета им. Н.И. Вавилова»

#### Назаров Андрей Викторович,

ассистент кафедры экономики АПК Саратовского государственного аграрного университета им. Н.И. Вавилова,

☎ 410012, г. Саратов, ул. Театральная пл., д. 1,  
тел.: +7 (89603) 422836