

Микробная индикация почв, загрязненных промышленными эмиссиями

Н. Д. СОРОКИН, Е. Н. АФАНАСОВА*

Институт леса им. В. Н. Сукачева СО РАН
660036, Красноярск, Академгородок, 50
E-mail: microlab@ksc.krasn.ru

* Сибирский федеральный университет
660041, Красноярск, просп. Свободный, 79

АННОТАЦИЯ

Исследованы изменения в составе микробных комплексов и их биохимической активности в почвах вблизи сильного источника эмиссий HF. Выявлено резкое уменьшение биомассы, численности неспорных бактерий и актиномицетов, в меньшей степени микроскопических грибов, снижение ферментативной и дыхательной активности загрязненных почв при относительном увеличении доли спорных бактерий. На основе реакции интродуцированной популяции *Bacillus subtilis* на различные дозы HF, NaF, Na₂SO₃ проведено микробиологическое нормирование техногенных почвенных экосистем.

Ключевые слова: микробная индикация, биомасса микроорганизмов, ферментативная и дыхательная активность, микробиологическое нормирование.

Основными промышленными источниками загрязнения почв фтористыми соединениями являются предприятия алюминиевого производства, марганца и суперфосфата [1–4]. Наиболее токсичен для живых организмов газобразный фтористый водород [5, 6]. Соединения натрия с серой (Na₂SO₃) помимо металлургических производств выбрасываются ТЭЦ, работающими на углях [3].

Почва в силу своих сорбционных возможностей адгезирует вещества, поступающие в атмосферу в виде промышленных эмиссий, в том числе фтористые и натриевые компоненты. При этом вблизи предприятий формируются геохимические аномалии из техногенных почв [5, 6].

В техногенных почвах развиваются комплексы микроорганизмов, заметно отличаю-

щиеся от таковых “чистых” почв аналогичного типа. В литературе имеются сведения об изменении численности и структуры микробных сообществ некоторых типов почв при воздействии NaF [1, 3, 5] в природных условиях в процессе работы конкретных предприятий, в данном случае Красноярского алюминиевого завода КрАЗа [7–9].

Цель работы – исследование количественного состава и биохимической активности почвенных микроорганизмов в условиях влияния промышленных эмиссий HF, а также изучение реакции интродуцированной в загрязненную фторидами и сульфитом почву культуры *Bacillus subtilis*.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Отбор почвенных образцов на химический и микробиологический анализ проводили по

Сорокин Николай Дмитриевич
Афанасова Елена Николаевна

общепринятой методике [10] на расстоянии 3, 7, 20 км от источника загрязнения по розе ветров. В качестве условного контроля использовали почву, не испытывающую антропогенного воздействия. Тип почвы – темно-серая на карбонатных суглинках. Здесь же проведены опыты по химическому загрязнению фтористой кислотой HF опытных участков почвы в концентрациях 1,4–3,2 (условный контроль); 50, 200, 1000 мг кг⁻¹ почвы. Определяли влияние различных концентраций загрязнителя на численность вегетативных и споровых клеток культуры *Bacillus subtilis*, интродуцированной в техногенную почву в педоскопах. На опытных участках проведено нормирование техногенных нагрузок соединений HF, NaF, Na₂SO₃ на темно-серую почву по реакциям популяции *Bacillus subtilis*.

Анализ содержания кислоторастворимых форм фтора и сернистокислого натрия проводили в лаборатории Красноярского химико-аналитического центра.

В опыте определяли ферментативную активность по методикам [11, 12] и численность гетеротрофных микроорганизмов на питательной среде глюкозо-пептонно-дрожжевой агар (ГПДА).

Содержание микробной биомассы ($C_{\text{мик}}$) определяли методом субстрат-индуцированного дыхания (СИД) с использованием газового хроматографа ЛХМ80 (модификация “Хром-4”). $C_{\text{мик}}$ определяли путем пересчета скорости СИД по формуле [13, 14]:

$$C_{\text{мик}} (\text{мкгС-СО}_2 \text{ г}^{-1} \text{ почвы}) = \\ = (\text{мклСО}_2 \text{ г}^{-1} \text{ почвы ч}^{-1}) \times 40,04 + 0,37.$$

Базальное дыхание (БД) исследовали по скорости выделения СО_2 почвой за 4–5 сут ее инкубирования при температуре 22 °С и 60 % полной влагоемкости (ПВ). Скорость БД выражали в мг С- СО_2 г⁻¹ почвы ч⁻¹.

Микробный метаболический коэффициент рассчитывали как отношение скорости базального дыхания к микробной биомассе – $q\text{СО}_2$ (мкг СО_2 -С мг⁻¹ $C_{\text{мик}}$ ч⁻¹).

Почвенные образцы для микробиологического и биохимического анализа в зоне техногенного воздействия Красноярского алюминиевого завода и на модельных опытных участках отбирали 5 раз через 7 сут в июле 2007 г.

В качестве тестовой культуры использовали спороносную бактерию *Bacillus subtilis*, которую помещали в капиллярные педоскопы с питательной средой на основе пептона. После подсчета вегетативные и споровые клетки интродуцировали в почву с различным содержанием HF, NaF и Na₂SO₃. Через каждые сутки регистрировали количество клеток.

Статистическая обработка данных выполнена в программе Microsoft Excel 2000.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В индикации и диагностике состояния почвенных экосистем при разного рода антропогенных (техногенных) воздействиях микробные комплексы успешно применяются [15, 16]. В данном случае выявляли ответные реакции комплексов (на ценоотическом уровне) и отдельных видов (на популяционном уровне) микроорганизмов.

В зоне промышленных выбросов КраЗа наибольшему загрязнению подвержены участки восточного и северо-восточного направлений (концентрация фтористых соединений от 50 до 700 мг/кг почвы по сравнению с контролем – 1,4–3,2 мг/кг). Содержание общего фтора в почвах условно делится на недопустимое (более 800 мг/кг почвы), критическое (от 500 до 800 мг/кг) и допустимое (от 0 до 500 мг/кг) [8, 9]. В результате анализа установлено, что загрязнение фтором почв в летний период “критическое” и “недопустимое” подавляет развитие различных таксономических групп микроорганизмов, снижая их численность по сравнению с контрольными участками (табл. 1).

Наиболее чувствительна к загрязнению почв фтором бактериальная микрофлора, на которой проявляется максимальный ингибирующий эффект (число неспороносных форм на МПА снижается в 2–4 раза). Аналогичная закономерность уменьшения численности по мере приближения к источнику загрязнения наблюдается в группе актиномицетов.

Более устойчивы к повышению концентрации фтористого водорода микроскопические грибы и споровые формы бактерий (рост на МПА и МПА : СА), относительное содержание которых в микробном комплексе возрастает при более высоких концентрациях

Т а б л и ц а 1

Численность и соотношение групп микроорганизмов в верхнем горизонте (0–20 см) техногенных почв, n = 30, P – 95 %

Расстояние от КраЗа, км	Градации фтора, общий фтор, мг/кг почвы	Споровые на МПА : СА	Бактерии на МПА	Актиномицеты на КАА	Грибы на СА	Соотношение неспоровые: споровые
3	Недопустимое; более 800	920 + 84	1990 + 142 630 + 67	46,0 ± 3,6	52,0 ± 4,3	1,4
7	Критическое 500–800	730 + 79	4645 + 85 460 + 41	90,6 ± 10	47,4 ± 0,9	2,2
20	Условный контроль, 1,4–3,2	570 + 61	8787 + 691 350 + 37	128,6 + 13	45,1 + 1,3	15,4

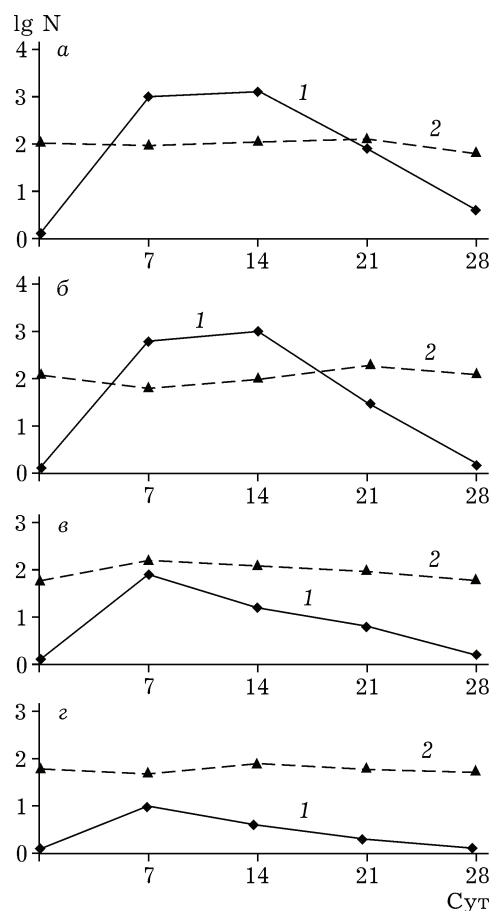
П р и м е ч а н и е. В числителе – общее число бактерий, в знаменателе – число споровых форм.

фтористых соединений в почве (см. табл. 1). При этом количественное соотношение неспоровых и спороносных бактерий уменьшается в 7–15 раз при повышении концентрации загрязнителя до критической и недопустимой и может быть адекватным показателем степени техногенного воздействия на почвенную экосистему.

Исследования реакций микроорганизмов на популяционном уровне свидетельствуют, что с ростом концентрации HF в модельных опытах количество прорастающих клеток *Bacillus subtilis* закономерно уменьшается. Чем выше концентрация загрязнителя, тем резче идет спад численности вегетативных клеток (см. рисунок). Число споровых форм при этом достоверно не меняется. Из морфологических изменений следует отметить увеличение средних размеров клеток в 1,5–2 раза.

Проведено микробиологическое нормирование техногенных загрязнений почвенных экосистем в модельных природных опытах. По реакциям тестовой культуры *Bacillus subtilis* выделено 4 уровня техногенного воздействия основных поллютантов (HF, NaF, Na₂SO₃): допустимый, предельно допустимый, критический и недопустимый [3].

Допустимое воздействие – отсутствие какого-либо изменения в росте популяции. Предельно допустимое – изменение численности популяции без других морфологических или ростовых реакций. Критическое воздействие – уменьшение численности попу-



Влияние различных концентраций HF (мг/кг) на численность интродуцированной популяции *B. subtilis* в техногенной почве: а – 1,4–3,2, б – 50, в – 200, г – 1000.

1 – вегетативные клетки, 2 – споры, N – численность

Т а б л и ц а 2

Нормирование техногенных нагрузок на темно-серую почву по реакциям популяции *Bacillus subtilis*, мг/кг почвы, n = 10

Загрязнитель	Уровень воздействия			
	допустимый	предельно допустимый	критический	недопустимый
Фтористый натрий	120	700	4200	12000
Фтористо-водородная кислота	25	50	200	550
Сернисто-кислый натрий	50	200	250	550
Совместное воздействие (NaF и Na ₂ SO ₃)	100	500	2000	8000

ляции, нарушение циклов развития, появление морфологических отклонений и инволюционных форм клеток. Недопустимый уровень воздействия – полное прекращение размножения клеток, резкий спад численности, ведущий к гибели популяции. Каждый уровень воздействия характеризовался строго определенными дозами техногенных веществ (табл. 2).

Предельно допустимая доза по NaF для популяции *B. subtilis* достигала 700 мг/кг почвы, в то время как по HF – 50 мг/кг почвы, т. е. превышение составило 14 раз. Предельно допустимая доза Na₂SO₃ для тестовой популяции не превышала 150 мг/кг, а при совместном действии NaF и Na₂SO₃ – 500 мг/кг – в 3 раза больше.

Рассчитывая разницу между дозами загрязнителя, вызывающими критическое и допустимое воздействия, получим данные, которые могут служить характеристикой устойчивости состояния экосистемы, ее экологического резерва [17]. Наименьшим резервом прочности в темно-серой почве обладали микробные популяции при воздействии на

них фтористого водорода – 175 мг/кг почвы, наибольшими – фтористого натрия (4080 мг/кг почвы).

Важным экологическим показателем, характеризующим биохимическую деятельность микробных ассоциаций, является их ферментативная активность [11, 12, 18].

Активность протеазы после внесения сульфита и фторида натрия в концентрациях 50 и 120 мг кг⁻¹ почвы увеличилась в 1,1–1,3 раза по сравнению с контролем. При внесении NaF и Na₂SO₃ в более высоких дозах активность всех ферментов снизилась в 1,3–2,2 раза (табл. 3). Влияние повышенных концентраций HF на активность протеаз незначительно.

Активность других ферментов (каталазы, уреазы, инвертазы) закономерно снижается с увеличением дозы всех используемых в опыте загрязнителей. Особенно сильное негативное воздействие оказывает высокая концентрация HF – 200 мг кг⁻¹ почвы.

Причиной снижения биохимической активности микробных ассоциаций могут служить образующиеся в почве не характерные для нее солевые комплексы [8, 9].

Т а б л и ц а 3

Влияние различных концентраций (мг кг⁻¹ почвы) NaF, Na₂SO₃, HF на ферментативную активность и дыхание загрязненных почв, n = 25, P – 95 %

Способ обработки участков	Фермент				Дыхание	
	Каталаза, мл KMnO ₄ на 1 г почвы за 20 мин	Инвертаза, мг глюкозы на 1 г почвы за 24 ч	Протеаза, мг NH ₂ на 10 г почвы за 24 ч	Уреаза, мг NH ₃ на 10 г почвы за 24 ч	БД CO ₂ , мг/(сут · г)	qCO ₂ , мкгC/(ч · г)
Контроль	0,31	97,7	0,75	22,8	55	2,8
NaF – 120	0,23	71,4	0,94	15,7	61	3,2
NaF – 700	0,21	60,6	0,69	14,4	67	3,7
NaF – 4200	0,17	55,2	0,56	12,6	87	8,4
Na ₂ SO ₃ – 50	0,32	61,5	0,89	16,8	62	4,1
Na ₂ SO ₃ – 200	0,28	60,1	0,52	14,3	77	7,4

Известно, что численность микроорганизмов далеко не всегда является показателем интенсивности происходящих в почве процессов. Нами не обнаружено прямой корреляции между численностью исследуемых групп микроорганизмов и величиной ферментативной активности. Этот эффект отмечен многими исследователями, в том числе и нами [7, 18]. Связан он, во-первых, с тем, что зависимость надо искать между определенными группами, популяциями и даже видами микроорганизмов и продуцируемыми ими ферментами. Во-вторых, фермент и субстрат, на который он действует в почве, часто разобщены пространственно [19].

К основным характеристикам экофизиологического статуса микробных комплексов можно отнести величину микробной биомассы ($C_{\text{мик}}$), показатель базального дыхания (БД) микроорганизмов и микробный метаболический коэффициент ($q\text{CO}_2$) [20, 21].

Изучение динамики микробной биомассы и базального дыхания в почвах при внесении различных доз загрязняющих соединений показало, что в первые дни (второй анализ на 7-е сут) величины $C_{\text{мик}}$ в опыте резко снижаются по сравнению с контролем при повышении дозы загрязнителя, а $q\text{CO}_2$, наоборот, возрастают (см. табл. 3). При третьем анализе (14-е сут) эти показатели остаются на прежнем уровне относительно второго анализа с некоторыми отклонениями в пределах ошибки опыта. В результате следующего анализа (21-е сут) обнаружено повышение $C_{\text{мик}}$ и БД до уровня контроля. Анализ микробной биомассы и базального дыхания на 28-й день опыта показал постепенное снижение уровней дыхательной активности и микробной биомассы как во всех вариантах опыта, так и на контроле.

Аналогичные тенденции выявлены при регистрации численности гетеротрофных микроорганизмов на питательной среде ГПДА. Первое резкое снижение величин микробной биомассы в 2–5 раз и рост базального дыхания в 1,5–2 раза на 7-е сут анализа связаны, очевидно, с ингибирующим воздействием загрязнителей на рост и функциональную активность гетеротрофных микроорганизмов по аналогии с эффектом “залпового выброса” поллютантов производственными предприятиями. Этим объясняется и существен-

ное снижение численности гетеротрофов, выявляющихся на питательной среде ГПДА. В дальнейшем происходит, с одной стороны, преадаптация микробных комплексов к повышенным дозам загрязнителей, а с другой – внесенные в почву соединения HF , NaF , Na_2SO_3 , вступая в химическое взаимодействие с почвенным поглощающим комплексом (ППК) и почвенным раствором, теряют свою первоначальную агрессивность при воздействии на микробные сообщества. При этом в почве могут образовываться новые соединения (Na_2SO_4 , NaNO_3 , H_2SO_4 и др.), способствующие росту и биохимической активности некоторых групп микроорганизмов, в частности микромицетов, которые тяготеют к кислой реакции среды. После всплеска численности и активности микроорганизмов вполне закономерным является их спад.

Для оценки функциональной активности микробных комплексов в химически загрязненных почвах использован показатель удельной дыхательной активности ($q\text{CO}_2$), который может служить интегральным выражением состояния и мерой устойчивости микробного сообщества почвы к различным нарушениям [21–23]. По изменению $q\text{CO}_2$ можно судить о нарушении гомеостатического состояния почвы. Поскольку содержание микробной массы в почве характеризует синтез, а эмиссия C-CO_2 – разложение органического вещества, отношение C-CO_2 к $C_{\text{мик}}$ пригодно также для оценки сбалансированности между процессами минерализации – иммобилизации [24].

Средние показатели микробного метаболического коэффициента в зависимости от дозы воздействия различных загрязнителей возросли в 1,5–3 раза по сравнению с контролем (см. табл. 3). Максимальные изменения $q\text{CO}_2$ зарегистрированы при воздействии на почву самых высоких концентраций Na_2SO_3 (200 мг кг^{-1}) и NaF (4200 мг кг^{-1}) почвы. Увеличение дыхательной активности при действии высоких доз загрязнителей можно объяснить преобладанием в микробных сукцессиях популяций с *R*-стратегией, нуждающихся в большом количестве энергии для поддержания своей биомассы в экстремальных условиях. Они очень активны при разложении доступной органики, но малопродуктивны в отношении биомассы [4, 25, 26]. Таким образом, снижение иммобилизации углеро-

да почв при сильном загрязнении в микробной массе приводит к потере его в виде эмиссии CO_2 . Микробный метаболический коэффициент при этом свидетельствует о значительных функциональных нарушениях в сообществе микроорганизмов почвы.

ВЫВОДЫ

1. При оценке состояния почв и процессов в них при техногенном загрязнении фторидами HF целесообразно использовать микробиологические показатели, по которым можно осуществлять индикацию на ценотическом (соотношение определенных групп микроорганизмов) и популяционном (интродуцированная культура спороносных бактерий) уровнях.

При этом наиболее адекватным показателем при возрастании дозы загрязнителя в первом случае является количественное соотношение неспоровых и споровых бактерий, во втором – резкое снижение численности вегетативных клеток *B. subtilis*.

2. На основе интродуцированной в загрязненные соединениями HF, NaF и Na_2SO_3 почвы культуры *B. subtilis* можно провести микробиологическое техногенное нормирование и рассчитать резерв прочности экосистемы. Наименьшим резервом прочности в темносерой почве обладали микробные популяции при воздействии на них фтористого водорода – 175 мг кг^{-1} почвы, наибольшим – фтористого натрия – 4080 мг кг^{-1} почвы.

3. Активность протеазы, каталазы, инвертазы и уреазы закономерно снижается в 1,3–2,2 раза с увеличением дозы внесенных в почву загрязнителей. Особенно сильное негативное воздействие оказывает высокая концентрация HF – 200 мг кг^{-1} почвы.

4. Содержание микробной биомассы и численность гетеротрофных микроорганизмов (на ГПДА) при внесении различных доз загрязнителей резко снижаются на 7, 14 и 28-е сут анализа. При этом средние значения коэффициента удельной дыхательной активности $q\text{CO}_2$ возрастают с ростом концентрации загрязняющих соединений в 1,5–3 раза по сравнению с контролем.

Исследования проведены при финансовой поддержке Программы РАН № 23, проект 1.3 “Сукцессионные изменения биоразнообразия в техногенно-нарушенных экосистемах Сибири”.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гапонюк Э. И., Кремленкова Н. П., Реут Р. М. Оценка токсического действия фторида натрия на микрофлору и биохимические процессы в дерново-подзолистой почве / Тр. ВНИИ с.-х. микроб. 1983. № 5. С. 105–106.
2. Кочуров Б. Н. Вещество и энергия в естественных и преобразуемых экосистемах. Иркутск, 1978. С. 3–10.
3. Никитина З. И. Микробиологический мониторинг наземных экосистем. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1991. 208 с.
4. Евдокимова Г. А. Эколого-микробиологические основы охраны почв Крайнего Севера. Апатиты, 1995. 268 с.
5. Гришко В. Н. Изменение агрохимических свойств почв, загрязненных фторидами // Агрохимия. 1996. № 1. С. 85–93.
6. Гришко В. Н. Микробоценоз почв, подверженных загрязнению фторсодержащими промышленными эмиссиями кислого характера // Микробиология. 1998. Т. 67, № 9. С. 416–421.
7. Сорокин Н. Д., Машанов А. И., Пашенова Н. В. и др. Микробиологическая индикация нарушенных лесных экосистем Сибири // Лесоведение. 2000. № 3. С. 37–41.
8. Сорокин Н. Д., Евграфова С. Ю. Микробиологическая индикация загрязнений наземных экосистем. Проблемы биоремедиации в XX веке. Красноярск, 2002. С. 80–84.
9. Сорокин Н. Д., Словик Е. В., Евграфова С. Ю. Микробиологическое нормирование техногенных почв. Там же. 2002. С. 75–79.
10. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: МГУ, 1991. 303 с.
11. Галстян А. Ш. Некоторые вопросы почвенной ферментологии // Почвоведение. 1995. № 2. С. 205–210.
12. Хазиев Ф. Х. Ферментативная активность почв. М.: Наука, 1976. 180 с.
13. Anderson I. P., Domsh K. H. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil // Soil Biol. and Biochem. 1978. N 10. P. 314–322.
14. Ананьева Н. Д. Микробиологические аспекты самоочищения и устойчивости почв. М.: Наука, 2003. 223 с.
15. Сорокин Н. Д. Микробиологический мониторинг лесных экосистем Сибири при различных антропогенных воздействиях // Успехи совр. биологии. 1993. Т. 113, вып. 4. С. 131–140.
16. Сорокин Н. Д., Евграфова С. Ю., Гродницкая И. Д. Микробиологическая индикация и мониторинг нарушенных лесных экосистем Сибири // Сиб. экол. журн. 2005. № 4. С. 687–692.
17. Израэль И. Д. Экология и контроль состояния природной среды. Л.: Гидрометеиздат, 1979. 375 с.
18. Сорокин Н. Д. Микрофлора таежных почв Средней Сибири. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1981. 141 с.
19. Звягинцев Д. Г. Почва и микроорганизмы. М.: Наука, 1987. 245 с.
20. Anderson T. H., Domsh K. H. The metabolic quotient for CO_2 as a specific activity parameter to assess the effects of environmental condition on the microbial biomass of forest soil // Soil Biol. and Biochem. 1993. N 25. P. 393–395.
21. Ананьева Н. Д., Благодатская Е. В., Ораипский Д. Б. Методические аспекты применения скорости суб-

- страт-индуцированного дыхания почвенных микроорганизмов // Почвоведение. 1993. № 11. С. 72–77.
22. Благодатская Е. В., Ананьева Н. Д., Мякишина Г. Н. Характеристика состояния микробного сообщества по величине метаболического коэффициента // Там же. 1995. № 2. С. 205–210.
23. Insam H. Are the soil microbial biomass and respiration governed by the climatic regime // Soil Biol. and Biochem. 1990. Vol. 22. P. 525–532.
24. Помазкина Л. В., Котова Л. Г., Лубнина Е. В. Биогеохимический мониторинг и оценка режимов функционирования агроэкосистем на техногенно загрязненных почвах. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1999. 208 с.
25. Baath E., Frostegard A., Pennanen T. Microbial community structure and pH responses in relation to soil organic matter quality in wood-ash fertilized, clear-cut or burned coniferous forest soils // Soil Biol. and Biochem. 1995. N 25. P. 229–240.
26. Wuthrich C., Schaub L., Weber M. et al. Soil respiration and soil microbial biomass after fire in a sweet chestnut forest in southern Switzerland // Catena. 2002. N 48. С. 201–215.

Microbial Indication of Soil Polluted with Industrial Emissions

N. D. SOROKIN, E. N. AFANASOVA

*V. N. Sukachev Institute of Forest SB RAS
660036, Krasnoyarsk, Akademgorodok, 50
E-mail: microlab@ksc.krasn.ru*

** Siberian Federal University
660041, Krasnoyarsk, Svobodnyi ave., 79*

Changes in the composition of microbial complexes and their biochemical activity in soil in the vicinity of a strong source of HF emission HF were studied. A sharp decrease of the biomass, the number of asporous bacteria and actinomycetes, and a smaller decrease of the number of microscopic fungi was revealed, along with a decrease in the enzymatic and respiratory activity of polluted soil with the relative increase in the fraction of sporiferous bacteria. On the basis of the response of introduced population of *Bacillus subtilis* to different doses of HF, NaF, Na₂SO₃ microbiological norm-fixing for technogenic soil ecosystems was carried out.

Key words: microbial indication, biomass of microorganisms, enzymatic and respiratory activity, microbiological norm fixing.