

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра биохимии и биофизики

**ВЛИЯНИЕ НА ПОЧВЕННУЮ МИКРОБИОТУ ЖЕЛЕЗА, МЕДИ
И НИКЕЛЯ, ВНЕСЕННЫХ В ПОЧВУ ОТДЕЛЬНО И В РАЗЛИЧНЫХ
КОМБИНАЦИЯХ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Зеленовой Надежды Алексеевны

Научный руководитель:

профессор кафедры биохимии

и биофизики, д.б.н., доцент

Е.В. Плешакова

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,

д.б.н., профессор

С.А. Коннова

Саратов 2020

Введение. В наше время стремительной индустриализации общества большую угрозу для биосферы представляет накопление различных загрязняющих веществ в окружающей среде, в особенности – тяжелых металлов (ТМ). Среди разнообразных загрязняющих веществ ТМ и их соединения выделяются распространенностью, высокой токсичностью, многие из них – также способностью к накоплению в живых организмах. ТМ широко применяются в различных промышленных производствах, поэтому, несмотря на очистительные мероприятия, содержание соединений ТМ в промышленных сточных водах довольно высокое. Они также поступают в окружающую среду с бытовыми стоками, с дымом и пылью промышленных предприятий. Многие металлы образуют стойкие органические соединения, хорошая растворимость таких комплексов способствует миграции ТМ в природных водах.

В последние десятилетия ведущим процессом, определяющим формирование эколого-геохимического состояния территорий, стал техногенез. Интенсивное промышленное использование природных ресурсов вызвало существенные изменения распределения ТМ в поверхностном слое зоны аэрации. Выбросы и сбросы техногенных объектов способствуют аккумуляции ТМ в почвах, которые в значительной степени подвержены влиянию, обусловленному промышленной деятельностью человека.

Почва – это сложная и динамичная система. Она состоит из нескольких слоев, которые различаются по своему физическому, химическому, минералогическому и биологическому характеру, на которые влияет климат и активность живых организмов. Кроме того, способствуя сохранению всех форм жизни, образующихся на земной поверхности, почва играет важную роль в защите грунтовых вод, действующих как коллекторный фильтр органических и неорганических остатков, способствуя связыванию возможных токсичных соединений.

Актуальность проблемы воздействия ТМ на почвенные микроорганизмы определяется тем, что именно в почве сосредоточена

большая часть всех процессов минерализации органических остатков, обеспечивающих сопряжение биологического и геологического круговорота. Почва является экологическим узлом связей биосферы, в котором наиболее интенсивно протекает взаимодействие живой и неживой материи. На почве замыкаются процессы обмена веществ между земной корой, гидросферой, атмосферой, обитающими на суше организмами, важное место среди которых занимают почвенные микроорганизмы.

Цель настоящей работы: изучить динамику численности почвенных микроорганизмов при загрязнении почвы железом, никелем и медью в разных концентрациях и комбинациях в ходе длительного модельного эксперимента.

Для реализации поставленной цели решались следующие задачи:

1. Оценить общую численность гетеротрофных микроорганизмов в почвенных микробоценозах через 30, 90 и 210 сут после внесения в почву железа, никеля и меди в разных концентрациях и комбинациях.

2. Проанализировать численность железooksисляющих микроорганизмов в почвенных микробоценозах через 30, 90 и 210 сут после внесения в почву железа, никеля и меди в разных концентрациях и комбинациях.

3. Осуществить сравнительную оценку долевой части гетеротрофных и железooksисляющих микроорганизмов в почвенных микробоценозах через 30, 90 и 210 сут эксперимента.

В модельном лабораторном длительном эксперименте использовали почву (южный чернозем, Саратовская область), которую высушивали до воздушно-сухого состояния, удаляли крупные корешки и включения, просеивали через сито с диаметром отверстий 5 мм и по 1 кг почвы помещали в пластиковые емкости. В начале эксперимента почву увлажняли до 15 % влажности и загрязняли растворами солей ТМ ($\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; CuSO_4) в различных концентрациях по отдельности и в разных комбинациях. Fe_2O_3 (гематит) вносили в почву в сухом виде. Расчет внесенных концентраций ТМ

производили по металлу (таблица 1). При выборе концентраций ТМ для экспериментального исследования руководствовались следующим: для Ni (II) и Cu (II) ориентировались на ПДК в почвах подвижных форм этих металлов (4,0 и 3,0 мг/кг почвы соответственно) [1]. При выборе концентраций Fe (II) принимали во внимание значения регионального геохимического фона (РГФ) для Башкортостана (2,3 мг/кг почвы) [2], в связи с тем, что ПДК Fe (II) в почве не разработаны, а РГФ Fe (II) для Саратовской области не установлен. В качестве контроля использовали чистую незагрязненную почву.

Таблица 1 – Варианты модельного эксперимента

№ п/п	Варианты	Содержание ТМ (ПДК/РГФ) в почве	Концентрация ТМ в почве, мг/кг почвы
1-2	контроль	-	-
3-4	Fe (II)	10РГФ	23 Fe (II)
5-6	Fe (II)	50РГФ	115Fe (II)
7-8	Ni (II)	10ПДК	40 Ni (II)
9-10	Ni (II)	50ПДК	200 Ni (II)
11-12	Fe (II)+Ni (II)	10РГФ+10ПДК	23 Fe (II)+40 Ni (II)
13-14	Fe (II)+Ni (II)	50РГФ+50ПДК	115 Fe (II)+200 Ni (II)
15-16	Cu (II)	10ПДК	30 Cu (II)
17-18	Cu (II)	50ПДК	150 Cu (II)
19-20	Fe (II)+Cu (II)	10РГФ+10ПДК	23 Fe (II)+30 Cu (II)
21-22	Fe (II)+Cu (II)	50РГФ+50ПДК	115 Fe (II)+150 Cu (II)
23-24	Fe (II)+Cu (II)+Ni (II)	10РГФ+10ПД+10ПДК	23 Fe (II)+30 Cu (II)+40 Ni (II)
25-26	Fe (II)+Cu (II)+Ni (II)	50РГФ+ 50ПДК+50ПДК	115 Fe (II)+150 Cu (II)+200 Ni (II)

Всего в эксперименте было изучено 13 вариантов почвы в двух повторностях (26 микробоценозов) (таблица 1). Длительность эксперимента составила семь месяцев. В процессе эксперимента регулярно проводили рыхление почвы (один/два раза в неделю), влажность поддерживали на уровне ~ 10-15 % для моделирования естественного водного баланса и аэрации в лабораторных условиях. Микробиологические показатели почвы оценивали перед внесением загрязнителей в почву (0 сут), а также в динамике: через 30, 90 и 210 сут после внесения ТМ.

Учет численности микроорганизмов в почве проводили методом предельных разведений путем посева почвенных суспензий на агаризованные питательные среды и подсчета выросших колоний через 2-7 сут культивирования при температуре 28-30 °С. Оценку общей численности культивируемых гетеротрофных микроорганизмов (ОЧГМ) производили на мясо-пептонном агаре (МПА) (Difco). Учет численности культивируемых нейтрофильных микроорганизмов, окисляющих железо, проводили на агаризованной селективной среде следующего состава, г/л: $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 5,9; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5; NaNO_3 – 0,5; K_2HPO_4 – 0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; лимонная кислота – 10,0, сахароза – 2,0, пептон – 1,0; pH 7,0.

Бакалаврская работа состоит из введения, трех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение), заключения, выводов, списка использованных источников, включающего шестьдесят три источника на русском и английском языках.

Основное содержание работы. В ходе хронического модельного лабораторного эксперимента мы определяли в разных вариантах почвенных проб показатель ОЧГМ, т.к. он является надежным чувствительным мониторинговым показателем биологического состояния почвы [3]. Результаты оценки ОЧГМ через 30 сут после внесения в почву загрязнителей (индивидуальных ТМ и их комбинаций в различных концентрациях) представлены на рисунке 1. Вариант К – это исходная чистая почва, К1 – та же почва через 30 сут эксперимента. При сравнении состояния почвенных микробоценозов по показателю ОЧГМ было обнаружено, что достоверная стимуляция развития гетеротрофных микроорганизмов по сравнению с контрольной незагрязненной почвой наблюдалась через 30 сут после внесения в почву 10 и 50РГФ Fe (II), 50ПДК Cu (II) и совместного внесения в почву Fe (II) и Cu (II) в повышенных концентрациях. Внесение Ni (II) оказывало стимулирующий эффект только в концентрации 10ПДК, повышенная концентрация Ni (II), равная 50ПДК, также как и его совместное

внесение в почву с другими ТМ: с Fe (II); с Fe (II) и Cu (II) одновременно, не оказывала стимулирующего действия.

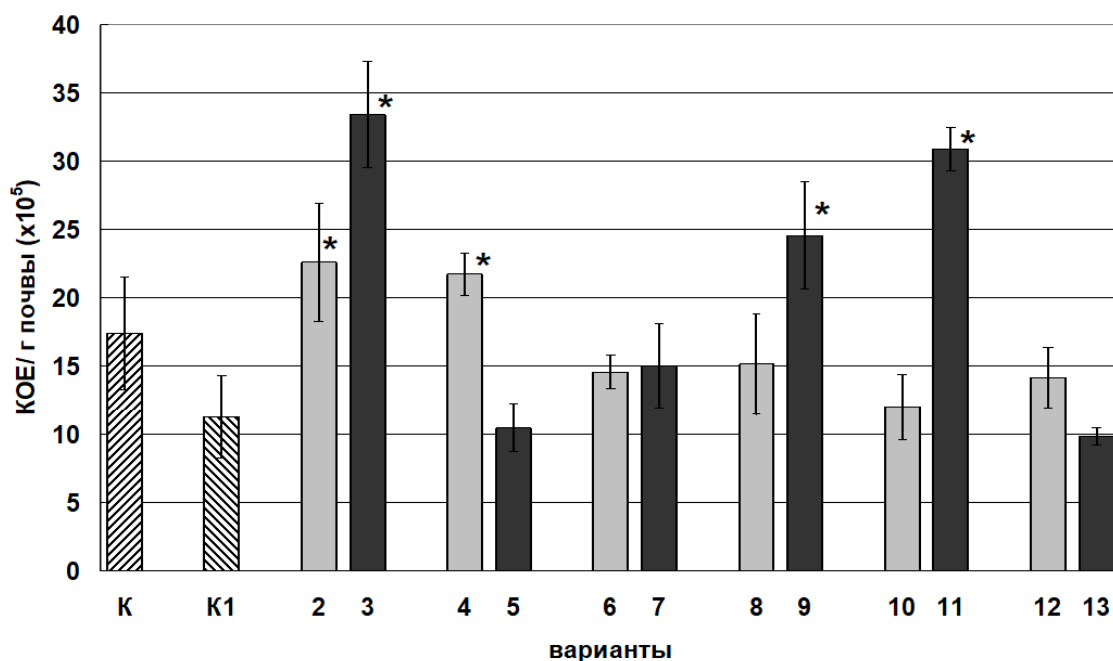


Рисунок 1 – Общая численность культивируемых гетеротрофных микроорганизмов через 30 сут эксперимента

Примечание: Доверительный интервал рассчитан с вероятностью 95 % ($n=12$); * – статистически значимые различия по сравнению с контролем К1 (чистая почва через 30 сут) при $p \leq 0,05$.

Через 90 сут эксперимента, за исключением вариантов с 10РГФ Fe (II), 10 и 50ПДК Ni (II), обнаружено подавление развития гетеротрофных микроорганизмов в почвенных микробоценозах по сравнению с контролем (рисунок 2). Во многих вариантах отмечено заметное снижение ОЧГМ по сравнению с результатами анализа через 30 сут. Через 210 сут эксперимента обнаружено достоверное ингибирование развития гетеротрофных микроорганизмов, связанное с внесением в почву двух комбинаций: 10РГФ Fe (II) и 10ПДК Ni (II); 50РГФ Fe (II) и 50ПДК Cu (II) (рисунок 3). Достоверная стимуляция роста по сравнению с контролем выявлена в варианте с тремя ТМ: 10РГФ Fe (II)+10ПДК Ni (II)+10ПДК Cu (II), умеренная стимуляция наблюдалась в почвенном микробоценозе с 50ПДК Ni (II) и при его комбинации с 50РГФ Fe (II). В остальных микробоценозах существенной разницы по сравнению с контрольной почвой через 210 сут не наблюдалось.

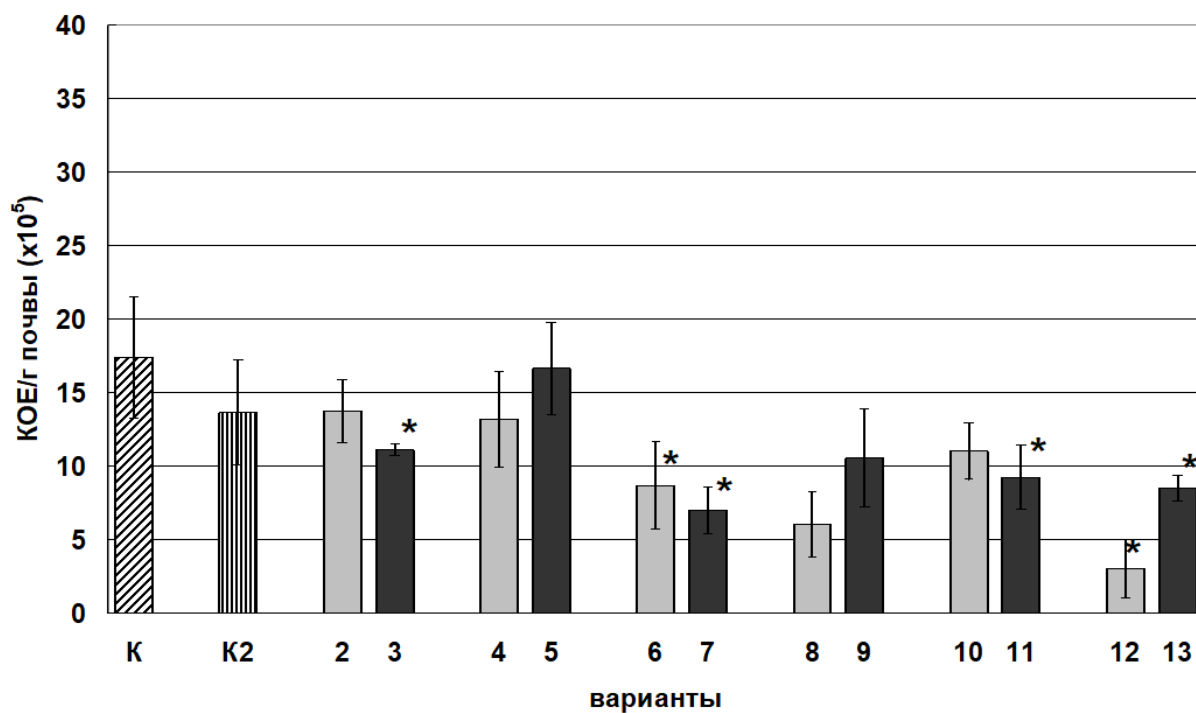


Рисунок 2 – Общая численность культивируемых гетеротрофных микроорганизмов через 90 сут эксперимента

Примечание: Доверительный интервал рассчитан с вероятностью 95 % ($n=12$); * – статистически значимые различия по сравнению с контролем K2 (чистая почва через 90 сут) при $p \leq 0,05$.

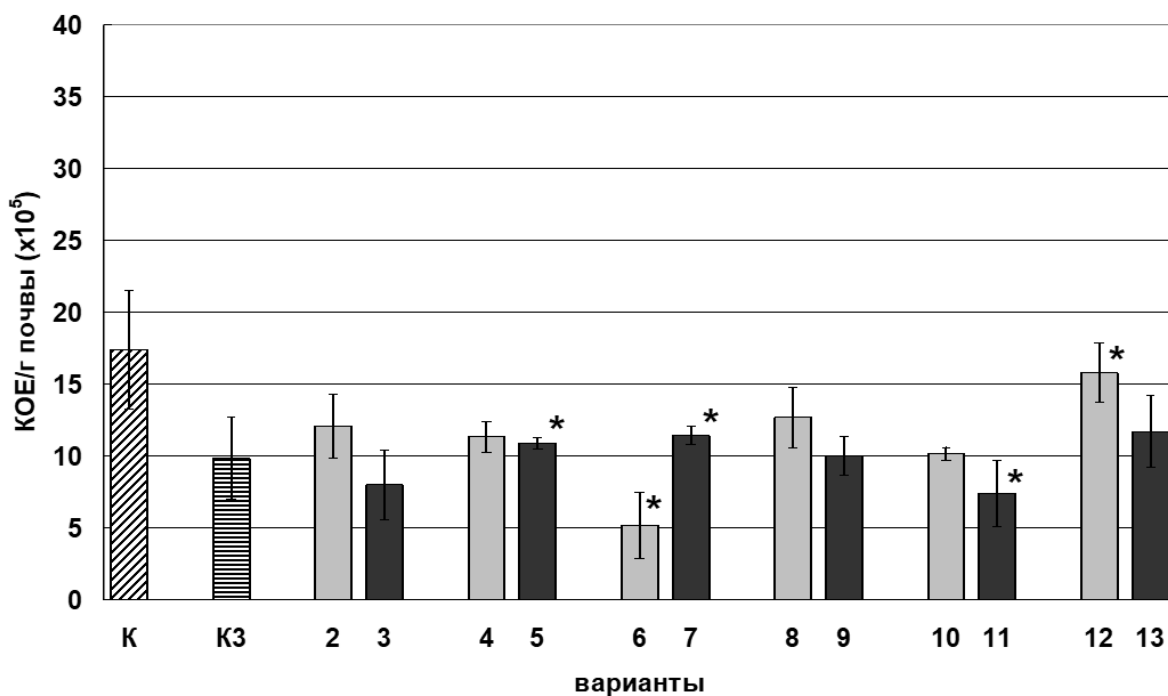


Рисунок 3 – Общая численность культивируемых гетеротрофных микроорганизмов через 210 сут эксперимента

Примечание: Доверительный интервал рассчитан с вероятностью 95 % ($n=12$); * – статистически значимые различия по сравнению с контролем K3 (чистая почва через 210 сут) при $p \leq 0,05$.

Учитывая, что мы вносили в почву железо (II), которое, как известно, может сорбировать на себе другие ТМ [4], в ходе эксперимента определяли в почве численность железooksисляющих микроорганизмов. Для микробиологического анализа нами были выбраны железooksисляющие организмы, которые развиваются в нейтральной среде. Для таких бактерий процесс окисления железа является побочным и идет без использования ими энергии этого окисления [5]. На рисунке 4 представлены результаты оценки численности нейтрофильных железooksисляющих микроорганизмов через 30 сут после внесения в почву загрязнителей.

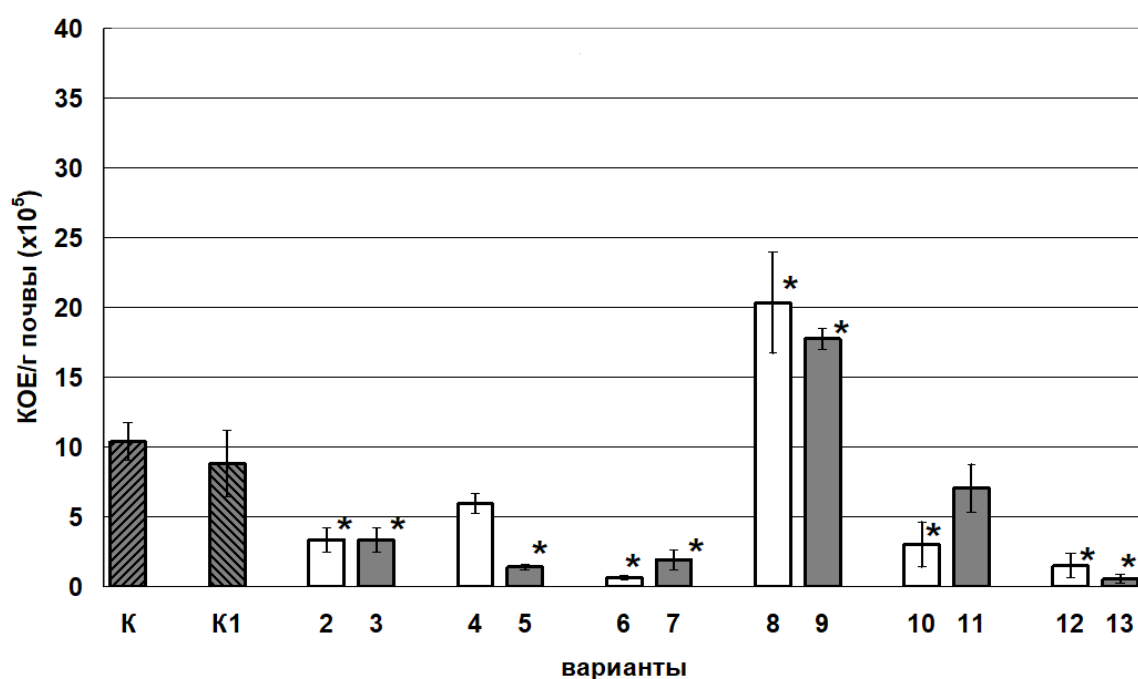


Рисунок 4 – Численность культивируемых железooksисляющих микроорганизмов через 30 сут эксперимента

Примечание: Доверительный интервал рассчитан с вероятностью 95 % ($n=12$); * – статистически значимые различия по сравнению с контролем К1 (чистая почва через 30 сут) при $p \leq 0,05$.

Анализ почвенных микробоценозов по показателю численности железooksисляющих микроорганизмов показал, что стимуляция развития железooksисляющих микроорганизмов по сравнению с контрольной незагрязненной почвой через 30 сут эксперимента происходила только при внесении в почву 10 и 50ПДК Cu (II) (рисунок 4). Все остальные ТМ и их комбинации в разных концентрациях оказывали ингибирующее действие.

Наблюдаемое через 30 сут подавление жизнедеятельности железоокисляющих микроорганизмов усиливается через 90 сут (рисунок 5).

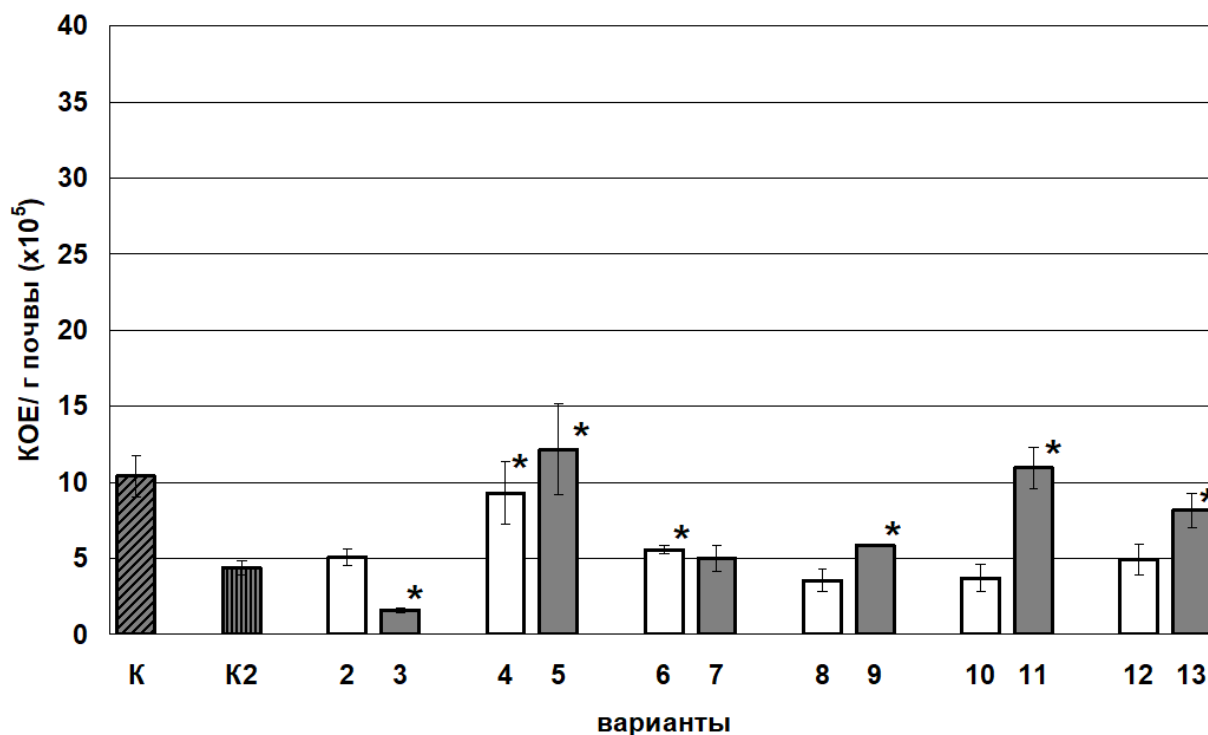


Рисунок 5 – Численность культивируемых железоокисляющих микроорганизмов через 90 сут эксперимента

Примечание: Доверительный интервал рассчитан с вероятностью 95 % ($n=12$); * – статистически значимые различия по сравнению с контролем К2 (чистая почва через 90 сут) при $p \leq 0,05$.

Стимуляция развития железоокисляющих микроорганизмов по сравнению с контрольной почвой через 90 сут была связана с внесением в почву 10 и 50ПДК Ni (II); 50ПДК Cu (II), а также нескольких комбинаций: 10РГФ Fe (II)+10ПДК Ni (II); 50РГФ Fe (II)+50ПДК Cu (II) и 50РГФ Fe (II)+50ПДК Ni (II)+50ПДК Cu (II) (рисунок 5). Через 210 сут модельного эксперимента во всех почвенных микробоценозах, за исключением варианта №2, отмечено подавление развития железоокисляющих микроорганизмов по сравнению с результатами содержания микроорганизмов этой группы через 90 сут (рисунок 6). По сравнению с численностью железоокисляющих микроорганизмов в контрольной почве через 210 сут в большинстве ценозов обнаружено сниженное количество железоокисляющих микроорганизмов.

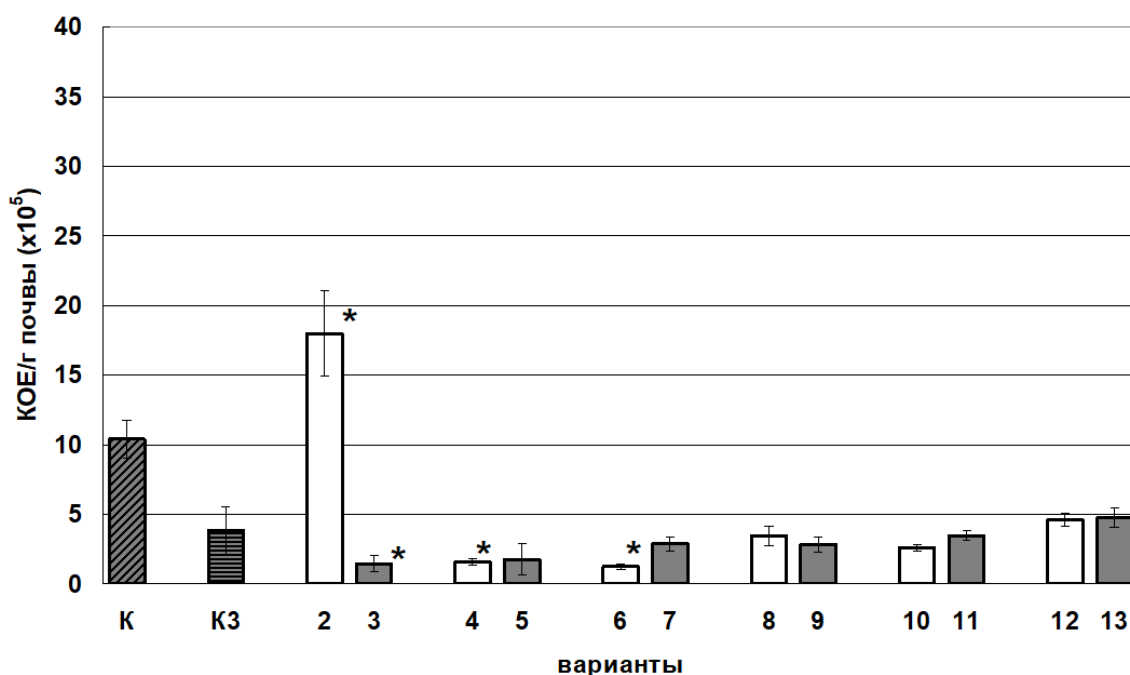


Рисунок 6 – Численность культивируемых железooksисляющих микроорганизмов через 210 сут эксперимента

Примечание: Доверительный интервал рассчитан с вероятностью 95 % (n=12); * – статистически значимые различия по сравнению с контролем К3 (чистая почва через 210 сут) при $p \leq 0.05$.

Нами была проведена сравнительная оценка долевой части гетеротрофных и железooksисляющих микроорганизмов в почвенных микробоценозах через 30, 90 и 210 сут эксперимента. Результаты этой оценки представлены на рисунке 7. Из данного рисунка видно, что в контрольной чистой почве доля железooksисляющих микроорганизмов уменьшалась с течением времени. Напротив, во многих вариантах почвы, загрязненной ТМ, доля железooksисляющих микроорганизмов заметно увеличилась через 90 сут эксперимента. Исключение составили микробоценозы с 10 и 50 ПДК Cu (II), в которых доля железooksисляющих микроорганизмов значительно увеличилась уже через 30 сут, а к 90 сут снизилась. Через 210 сут эксперимента долевая часть железooksисляющих организмов в микробоценозах с добавлением ТМ снизилась за исключением варианта с 10 ПДК Fe (II).

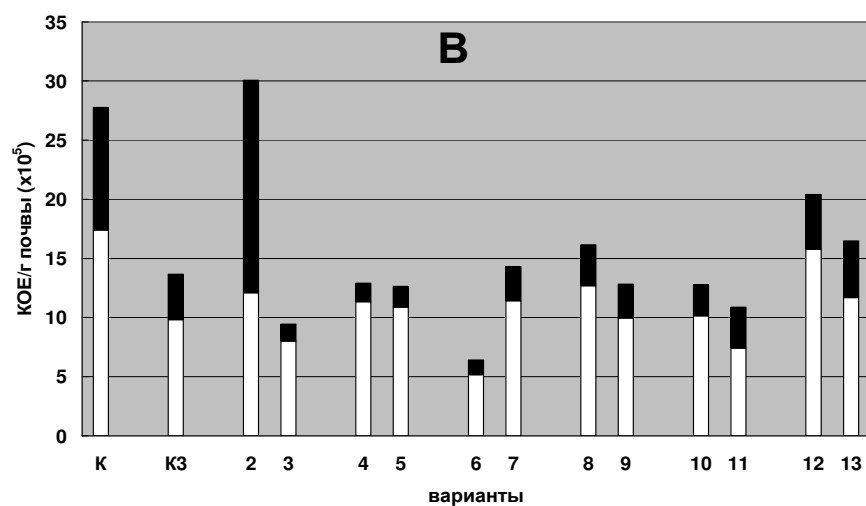
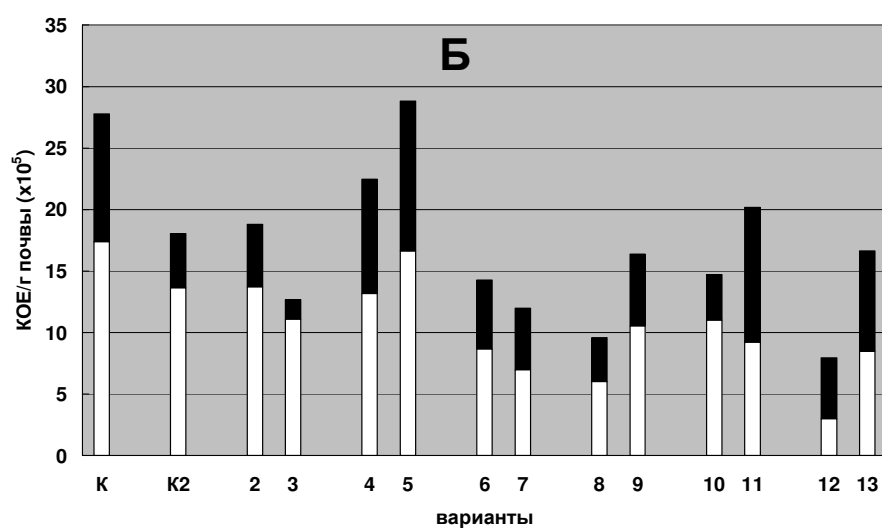
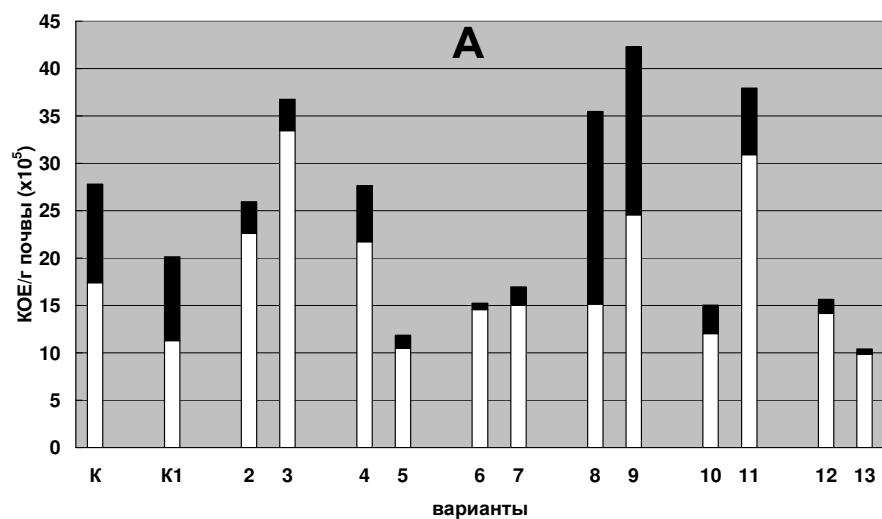


Рисунок 7 – Долевая часть гетеротрофных и железоокисляющих микроорганизмов в почвенных микробоценозах через 30 (А), 90 (Б) и 210 (В) сут эксперимента

Выводы:

1. При загрязнении почвы железом и медью в концентрациях 10 и 50РГФ/ПДК по отдельности и в сочетаниях, в отличие от загрязнения никелем, в почвенных микробоценозах через 30 сут обнаружена стимуляция развития гетеротрофных микроорганизмов, через 90 сут – соответствие значению в контрольной незагрязненной почве или ингибирование под действием ТМ, особенно выраженное при комбинации загрязнителей. Через 210 сут выявлена стабилизация численности гетеротрофных микроорганизмов.

2. При загрязнении почвы железом и никелем в концентрациях 10 и 50РГФ/ПДК по отдельности и в сочетаниях, в отличие от загрязнения медью, в почвенных микробоценозах через 30 сут обнаружено ингибирование развития железоокисляющих микроорганизмов, особенно выраженное при комбинации загрязнителей, через 90 сут – соответствие значению в контрольной незагрязненной почве или стимуляция под действием ТМ. Через 210 сут выявлено ингибирование численности железоокисляющих микроорганизмов или соответствие значению в контрольной почве.

3. Установлено, что в контрольной незагрязненной почве доля железоокисляющих микроорганизмов в микробоценозах равномерно уменьшалась с течением времени. В почве, загрязненной ТМ, доля железоокисляющих микроорганизмов в микробоценозах заметно увеличилась через 90 сут эксперимента.

Список использованных источников:

1. ГН 2.1.7.2041-06. Гигиенические нормативы. Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в почве. Утв. Главным санитарным врачом РФ 23 января 2006 г. – М.: Госкомсанэпиднадзор России, 2006. – 6 с.
2. Серегина, Ю. Ю. Комплексная оценка загрязнения тяжелыми металлами почвенного покрова прибрежной зоны р. Белая Белорецкого района Республики Башкортостан [Электронный ресурс] / Ю.Ю.

- Серегина, И.Н. Семенова, Г.Ш. Кужина // Живые и биокосные системы [Электронный ресурс] – 2013. – № 3. – URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-3/article-4> (дата обращения: 19.04.2019) – Загл. с экрана – Яз. рус.
3. Foght, J. Enumeration of soil microorganisms / J. Foght, J. Aislabie // Manual for soil analysis – monitoring and assessing soil bioremediation / Eds: R. Margesin, F. Schinner. – Berlin: Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 2005. – P. 261–280.
 4. Водяницкий, Ю. Н. Магнитная восприимчивость как индикатор загрязнения тяжелыми металлами городских почв / Ю.Н. Водяницкий, С.А. Шоба // Почвоведение. – 2015. – № 1. – С. 13–20.
 5. Васильев, А. А. Тяжелые металлы в почвах города Чусового: оценка и диагностика загрязнения: монография / А.А. Васильев, А.Н. Чашин. – Пермь: ФГБОУ ВПО «Пермская ГСХА», 2011. – 197 с.