

УДК 631.46.631.445.41:631.84

И. М. Малиновская, доктор сельскохозяйственных наук
ННЦ «ИНСТИТУТ ЗЕМЛЕДЕЛИЯ НААН»

ФОРМИРОВАНИЕ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ СЕРОЙ ЛЕСНОЙ ПОЧВЫ В УСЛОВИЯХ ПОВЫШЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ

Исследовали состояние микробных сообществ серой лесной почвы, загрязненной тяжелыми металлами в дозе 5, 10, 100 ГДК, при наличии и отсутствии вегетирующего фитоценоза (кукуруза). Показана протекторная функция фитоценоза относительно нескольких групп микроорганизмов, в частности, азотобактера и полисахаридсинтезирующих бактерий. На примере микромицетов подтверждена большая устойчивость к загрязнению тяжелыми металлами мицелиальных форм микроорганизмов. Показано, что с увеличением дозы загрязнителя в почве замедляется минерализация органических и органо-минеральных комплексов, в том числе гумуса.

Ключевые слова: микробиоценоз, серая лесная почва, тяжелые металлы, азотобактер, полисахаридсинтезирующие бактерии, микромицеты, минерализация, фитотоксичность.

Проблема загрязнения окружающей среды, почв и продуктов питания тяжелыми металлами – одна из самых актуальных на сегодняшний день. Количество публикаций в научной литературе на эту тему лишь немногим уступает самой изучаемой проблеме – фиксации атмосферного азота прокариотными организмами. В последнее время актуализировались исследования сложных систем, которые включают не только почву и живущих в ней микроорганизмов, но также и растения, которые непосредственно влияют на формирование микробных сообществ в условиях загрязнения почвы тяжелыми металлами [15,17]. Для оценки реакции микроорганизмов на загрязнение тяжелыми металлами используют такие современные методы как измерение уровня базального дыхания, субстрат-индуцированного дыхания, изучение структуры сообществ методами ПЦР-анализа, распределения функциональных генов. Задачей нашего исследования явилось изучение изменений функциональной структуры микробного сообщества серой лесной почвы под влиянием возрастающих концентраций тяжелых металлов. Предметом исследования были агрономически значимые процессы и группы микроорганизмов, которые их осуществляют.

Методы исследования. Модельный опыт был заложен с использованием серой лесной крупнопылевато-легкосуглинистой почвы стационарного опыта Национального научного центра «Институт земледелия НААН» (опытное хозяйство «Чабаны», Киево-Святошинский район Киевской области). Использовалась почва варианта «интенсивный агрозем», который включает полевой севооборот с насыщенностью минеральными удобрениями $N_{96}P_{108}K_{112,5}$ по фону запахивания побочной продукции растениеводства. В 0-20 см слое почвы содержится: гумуса – 1,75%, щелочного гидролизованного азота (по Корнфилду) – 6,86 мг, нитратного азота – 6,46, аммонийного азота – 0,20, подвижного фосфора – 60,0 мг и обменного калия – 25,4 мг на 100 г воздушно сухой почвы, $pH_{(КС1)}$ – 4,9. Почву отбирали осенью и перед проведением модельного опыта восстанавливали ее биологическую активность путем увлажнения и термостатирования при 25°C на протяжении 21 суток. Исследовали варианты с искусственно созданными

фонами цинка и свинца: №3,4 – превышение ГДК в 5 раз; № 5,6 – превышение ГДК в 10 раз; № 7,8 – превышение ГДК в 100 раз. В качестве контрольного образца выступала почва с природной концентрацией тяжелых металлов. При создании фонов загрязнения концентрации металлов рассчитывали по кислоторастворимой фракции, поскольку именно она считается основной техногенной составляющей запаса тяжелых металлов в почве. В контрольные сосуды для выравнивания содержания азота вносили раствор KNO_3 в соответствующей концентрации.

За 8 суток до внесения тяжелых металлов в почву в сосуды высевали семена кукурузы. К моменту внесения тяжелых металлов растения кукурузы находились в фазе 3-4 листьев.

Состояние микробных сообществ изучали через 32 суток после внесения тяжелых металлов. Численность микроорганизмов отдельных экологических и функциональных групп оценивали методом посева почвенной суспензии на соответствующие питательные среды [11]. Показатели интенсивности процессов минерализации азот- и углеродсодержащих соединений, фитотоксические свойства почвы определяли соответственно описанному ранее [4]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программ *Microsoft Excel*.

Результаты и их обсуждение. В результате проведенных исследований установлено, что растения с их корневыми выделениями выступают в роли протекторов относительно микроорганизмов нескольких эколого-трофических групп, в частности, азотобактера, численность которого в ризосфере растений превышает показатели почвы без растений: в контроле на 3,33%, при 5 ГДК – 36,6, при 10 ГДК – на 95,6% (табл.1). Чем выше уровень загрязнения почвы тяжелыми металлами, тем более выражена протекторная функция растений относительно азотобактера. С нашей точки зрения, азотобактер относится к микроорганизмам – индикаторам экологической чистоты почвы, его численность уменьшается при загрязнении почвы как нефтепродуктами, так и тяжелыми металлами [4,5]. В представленных данных численность азотобактера снижается с увеличением дозы поллютанта в почве без растений: при 5 ГДК – в 2,64 раза, при

Таблица 1.

Влияние тяжелых металлов на численность микроорганизмов в серой лесной почве, загрязненной на протяжении 32 суток, млн. КОЕ*/г абсолютно сухой почвы

Вариант	Аммонификаторы	Иммобилизаторы минерального азота	Олигонитрофилы	Азотообразующие почвенные комочки	Денитрификаторы	Нитрификаторы	Педотрофы	Целлюлозоразрушающие	Полисахаридсинтезирующие	Автохтонные	Актиномицеты	Микромицеты	Мобилизаторы минеральных фосфатов	Кислотообразующие
Контроль без фитоценоза	445,0	127,0	50,4	60,0	124,0	0,094	145,1	170,2	5,64	16,8	16,2	0,169	18,4	3,38
Контроль + фитоценоз	658,9	123,4	68,3	62,0	167,7	0,048	174,9	111,8	7,99	18,2	15,6	0,671	36,3	10,0
5 ГДК** без фитоценоза	397,0	145,9	40,1	22,7	51,0	0,049	125,5	231,0	1,89	12,5	12,5	0,174	7,56	2,65
5 ГДК + фитоценоз	669,0	103,3	54,0	31,0	152,3	0,102	154,9	90,3	8,99	14,1	10,2	0,859	9,06	21,8
10 ГДК без фитоценоза	410,0	130,0	33,3	9,00	123,6	0,041	102,3	163,0	1,50	10,5	9,37	0,127	9,37	1,50
10 ГДК + фитоценоз	430,2	130,5	53,4	17,6	148,5	0,113	125,2	170,1	10,6	12,0	4,95	0,336	15,6	14,1
100 ГДК без фитоценоза	403,7	131,8	33,3	0	0,010	0,042	89,5	213,5	0,761	5,94	26,8	0,388	52,1	0,381
100 ГДК + фитоценоз	842,3	144,1	150,3	0	0,799	0,032	147,4	212,3	3,21	6,85	8,41	0,865	10,8	4,81
НСР ₀₅	6,20	4,00	2,54	1,95	2,10	0,005	9,15	6,55	0,72	1,65	0,58	0,115	0,30	0,15

Примечание: КОЕ* - колониеобразующая единица, ГДК** - гранично допустимая концентрация.

10 ГДК – в 6,67 раз, соответствующие показатели для ризосферы растений составляют 2,05 и 3,52 раза. При максимальном уровне загрязнения почвы тяжелыми металлами (100 ГДК) азотобактер методом обрастания почвенных комочков не выявляется. Ранее при исследовании серой лесной почвы, находящейся в состоянии залежи, нами было показано, что не только численность азотобактера изменяется под влиянием дозы тяжелых металлов, но и физиолого-биохимическая активность его клеток существенно уменьшается под влиянием возрастающих доз тяжелых металлов [5]. Таким образом, в серии модельных экспериментов показано, что численность и физиолого-биохимическая активность клеток азотобактера являются диагностическими показателями на интенсивность загрязнения серой лесной почвы тяжелыми металлами [5-7].

Численность кислотообразующих микроорганизмов намного выше в ризосфере растений по сравнению с почвой без фитотеноза: без загрязнения – в 2,96 раза, при 5ГДК – 8,23, при 10 ГДК – 9,40, при 100 ГДК – в 12,7 раз (табл.1).

Поскольку органические и минеральные кислоты принимают активное участие в растворении минеральных элементов из их трудно-растворимых форм, то можно считать указанный факт доказательством регулирования численности кислотообразующих микроорганизмов со стороны растений и, следовательно, интенсификации процесса перевода минеральных элементов в доступное растениям состояние. Загрязнение почвы тяжелыми металлами по неизвестной пока причине усиливает этот процесс, что подтверждается также исследованиями, проведенными нами с использованием серой лесной почвы, находящейся в состоянии залежи [5]. Ранее, на примере залежи серой лесной почвы было показано, что численность и физиолого-биохимическая активность полисахарид-синтезирующих бактерий зависят от уровня загрязненности почвы тяжелыми металлами, в частности, количество полисахаридсинтезирующих бактерий увеличивается в ризосфере растений при 5 ГДК – в 2,24 раза, при 10 ГДК – 6,89, при 100 ГДК – в 1,67 раза [5]. Мы объясняли это протекторной функцией бактериальных полисахаридов относительно клеток продуцентов. При изучении загрязнения серой лесной почвы тяжелыми металлами при таком же сроке (32 суток), однако, используя почву, которая находится в интенсивном сельскохозяйственном севообороте (см. методы исследования), мы получили несколько иные закономерности: в почве без растений количество полисахаридсинтезирующих бактерий уменьшается пропорционально дозе тяжелых металлов: при 5 ГДК – в 2,98 раза, при 10 ГДК – 3,76, при 100 ГДК – в 7,41 раза (табл. 1). Однако, в ризосфере растений количество полисахаридсинтезирующих бактерий возрастает с увеличением дозы поллютанта так же, как и в случае залежи. Вместе с тем, четко прослеживается закономерность влияния выращивания растений: количество полисахаридсинтезирующих бактерий всегда больше в ризосфере, чем в почве без растений, причем, чем

выше уровень загрязнения тяжелыми металлами, тем значительнее степень влияния растений на численность бактерий. Ранее также было установлено, что при краткосрочных сроках загрязнения почвы (1 сутки) количество полисахаридсинтезирующих бактерий уменьшается с увеличением дозы тяжелых металлов, поскольку синтез экзополисахаридов еще не становится селективным преимуществом бактерий этой группы [6]. Таким образом, количество полисахаридсинтезирующих бактерий зависит от срока загрязнения почвы, дозы тяжелых металлов, наличия или отсутствия растений, а также способа использования (залежь, агрозем экстенсивный или интенсивный) и агрохимических особенностей загрязненной почвы. Бактериальные полисахариды обладают протекторными функциями относительно действия тяжелых металлов на бактериальные клетки [13], однако степень проявления этой функции зависит от особенностей почвы, подвергшейся загрязнению.

Данные, публикуемые в научной литературе относительно влияния тяжелых металлов на почвенные микроорганизмы, зачастую носят противоречивый характер. Несовпадение закономерностей, выявляемых исследователями, может быть обусловлено разными методами, различными дозами тяжелых металлов и составом сред для культивирования той или иной группы микроорганизмов, и даже разной терминологией. Так, Звягинцев с соавт. [3] пришли к выводу, что загрязнение тяжелыми металлами существенно уменьшает численность олигонитрофилов в дерново-подзолистой почве. При этом, для определения количества олигонитрофилов использовали среду МПА, разведенную в 100 раз, тогда как общепринятой средой для культивирования олигонитрофилов является среда Мишустина с выщелоченным агаром (для удаления остатков соединений азота). Полученные нами данные свидетельствуют о том, что олигонитрофилы не относятся к чувствительным относительно тяжелых металлов микроорганизмам как при кратко-, так и среднесрочном загрязнении [5-7]. Согласно Чугуновой [12], наиболее чувствительными к ингибирующему действию тяжелых металлов являются нитрификаторы и целлюлолитики. Полученные нами данные свидетельствуют, что численность нитрификаторов существенно уменьшается только при самой высокой из исследованных доз тяжелых металлов – 100 ГДК (табл. 1). Численность целлюлолитиков также в большей мере зависит от наличия растений или остатков их корней, чем от дозы тяжелых металлов.

Некоторые исследователи считают мицелиальные формы микроорганизмов более устойчивыми к действию тяжелых металлов [3, 9]. Результатами проведенных нами исследований этот вывод подтверждается как для вариантов без растений, так и при выращивании кукурузы (табл. 1). Особенно сильно численность КУО микромицетов увеличивается при 100 ГДК, она превышает численность грибов в контроле без растений в 2,3 раза, с растениями – в 1,29 раза. Численность же представителей другой мицелиальной формы – актиномицетов –

снижается с возрастанием дозы тяжелых металлов, максимально – в 2-3 раза. При этом количество актиномицетов уменьшается более резко, чем общее количество прокариотов, которое снижается при 5 ГДК на 12,5%, при 10 ГДК – 17,8, при 100 ГДК – на 23,4% (без растений).

Согласно устоявшимся представлениям и результатам собственных исследований [5,14,16], тяжелые металлы замедляют (угнетают) минерализацию органических веществ в почве. Полученные данные подтверждают эту закономерность: в почве без растений индекс педотрофности уменьшается при 5 ГДК на 3,16%, при 10 ГДК – 30,9, при 100 ГДК – на 46,8% (табл.2). Аналогичные цифры для вариантов с растениями колеблются между 14,2 и 105,4%.

Степановой М.Я. [10] показано, что содержание в почвах тяжелых металлов коррелирует с содержанием гумуса, возможно, из-за образования комплексов между ионами тяжелых металлов и молекулами гуминовых кислот, которые в меньшей степени подвержены минерализации, чем молекулы гуминовых кислот вне комплексов. Увеличение содержания гумуса в почвах, загрязненных тяжелыми металлами, отмечено в работах Безугловой с соавт.

[1], что авторы объясняют негативным влиянием поллютантов на состояние микробного ценоза и снижением общей биологической активности почвы. Гамалею с соавт. [2] также подтвержден этот вывод на примере светло-серой и черноземной почв придорожных полос автомагистралей. Они показали качественные отличия гумуса загрязненных и относительно чистых почв: в почвах придорожных полос формируется гумус, обогащенный более растворимыми гумусовыми соединениями, имеющими большую подвижность и более выраженные кислотные свойства.

Полученные нами данные подтверждают вывод о меньшей подверженности комплексов гуминовых кислот и тяжелых металлов микробной минерализации (табл. 2). С увеличением дозы загрязнителя активность минерализации гумуса понижалась в почве без растений: при 5 ГДК – на 16,7%, при 10 ГДК – 12,6, при 100 ГДК – на 74,7%; с растениями: при 5 ГДК – на 14,3%, при 10 ГДК – 8,33, при 100 ГДК – на 113,7%. Обращает на себя внимание также тот факт, что в ризосферной почве активность минерализации гумуса ниже, чем в почве без растений. На наш взгляд, причиной этого является наличие

Таблица 2.

Показатели интенсивности минерализационных процессов и фитотоксические свойства серой лесной почвы (интенсивный агрозем) при разных уровнях загрязнения тяжелыми металлами

Вариант	Индекс педотрофности	Коэффициент олиготрофности	Коэффициент минерализации азота	Активность минерализации гумуса, %	Интенсивность респирации почвы, мг СО ₂ /кг почвы	Масса 100 растений тест-культуры – пшеницы озимой, абсолютно-сухой вес, г		
						стебли	корни	общая масса
Контроль без фитоценоза	0,326	0,113	0,285	11,6	99,2	14,3	5,26	19,6
Контроль + фитоценоз	0,265	0,104	0,187	10,4	777,6	14,7	6,86	21,6
5 ГДК без фитоценоза	0,316	0,101	0,368	9,94	87,3	11,7	5,00	16,7
5 ГДК + фитоценоз	0,232	0,081	0,154	9,10	406,8	11,5	6,69	18,2
10 ГДК без фитоценоза	0,249	0,081	0,317	10,3	91,3	12,4	4,73	17,1
10 ГДК + фитоценоз	0,291	0,124	0,303	9,60	431,8	10,9	7,12	18,0
100 ГДК без фитоценоза	0,222	0,082	0,327	6,64	87,9	Вследствие большой токсичности семена тест-культуры не проросли		
100 ГДК + фитоценоз	0,175	0,178	0,171	4,65	290,9			
НСР ₀₅	0,010	0,008	0,011	0,120	3,14	0,40	0,52	

легкоутилизуемых субстратов в составе корневых выделений растений, что делает минерализацию труднодоступных молекул гумуса нецелесообразной. Полученные нами данные не согласуются с результатами исследований Постниковой М.А. [8], согласно которым процесс дегумификации, связанный с деятельностью бактериального комплекса, более интенсивно проходит в почве, загрязненной легкодоступными органическими соединениями (явление кометаболизма). Вероятно, интенсивность процесса минерализации гумуса определяется, прежде всего, причиной этого процесса, и закономерности его минерализации как следствия недостатка минеральных элементов (прежде всего азота) будут отличаться от закономерностей минерализации гумуса как субстрата, т.е. источника углерода и энергии, как это имело место в модельных экспериментах Постниковой М.А. [8].

Загрязнение тяжелыми металлами в дозе 5-10 ГДК приводит к существенному увеличению фитотоксичности почвы без фитоценоза (на 14,6-17,4%), с фитоценозом – на 18,7-20,0% (табл. 2). Доза тяжелых металлов в 100 ГДК оказалась настолько токсичной, что семена тест-культуры не проросли.

Таким образом, при среднесрочном загрязнении серой лесной почвы тяжелыми металлами в дозах 5-100 ГДК наблюдаются существенные изменения состояния микробных сообществ, замедляется большинство минерализационных процессов, интенсифицируется накопление токсичных веществ. Масштабы и направленность таких изменений зависят от уровня загрязнения почвы, наличия растительного покрова и способа использования почвы.

Литература

1. Безуглова О.С., Вальков В.Ф., Казанцев К.Ш., Колесников С.И., Морозов И.В. Влияние высоких концентраций металлов на гумусное состояние и биологическую активность чернозема обыкновенного // *Изв. вузов. Сев. Кавказ. регион. Естественные науки.* – 1999. – №2. – С.65-71.
2. Гамалей В.І., Шевченко І.П. Екологічний стан ґрунтів придорожніх смуг/ *Вісник аграрної науки.* – 2008. – №12. – С.44-51.
3. Звягинцев Д.Г., Кураков А.В., Умаров М.М., Филипп З. Микробиологические и биохимические показатели загрязнения свинцом дерново-подзолистой почвы // *Почвоведение.* – 1997. – №9. – С.1124-1131.
4. Малиновская И.М., Зиновьева Н.А. Микробиологические процессы в ризосфере растений в загрязненной нефтепродуктами почве // *Мікробіологія і біотехнологія.* – 2011. – №2. – С.83-91.
5. Малиновская И.М., Литвин Ю.И. Микробные сообщества серой лесной почвы, загрязненной возрастающими дозами тяжелых металлов // *Грунтознавство.* – 2012. – Т13, №1-2 (20) – С.84-91.
6. Малиновская И.М., Домбровская И.В., Литвин Ю.И. Микробиологические процессы в загрязненной тяжелыми металлами серой лесной почве // *Агроекологічний журн.* – 2013. – №1. – С.48-53.
7. Малиновская И.М., Литвин Ю.И. Протекание микробиологических процессов в серой лесной почве при краткосрочном загрязнении тяжелыми металлами // *Вісник Харківського нац. аграр. унів. Сер «Біологія».* – 2013. – вип.1 – С.95-102.
8. Постникова М.А. Использование гуминовых кислот почвенными бактериями / Автореф. дис. канд...биол. наук. – М.: Изд-во МГУ, 2007. – 25с.
9. Селивановская С.Ю. Влияние осадков сточных вод, содержащих металлы, на микробные сообщества серой лесной почвы / С.Ю. Селивановская, С.Н. Киямова, В.З. Латыпова, Ф.К. Алимova // *Почвоведение.* – 2002. – №5. – С.588-594.
10. Степанова М.Я. Микроэлементы в органическом веществе почв / Новосибирск: Наука. Сиб. отделение. – 1976. – 272с.
11. Теннер, Е.З. Практикум по микробиологии / Е.З. Теннер, В.К. Шильникова, Г.И.Переверзева. – М.: Дрофа, 2004. – 256 с.
12. Чугунова М.В. Влияние тяжелых металлов на почвенные микробиоценозы и их функционирование: Автореф. дис....канд.биол.наук. – Л.,1990. – 17с.
13. Dudman W.F. The role of surface polysaccharides in natural environments // *Surface carbohydrates of the procarotic cell* / Ed. I.W. Sutherland. – New York: Acad.Press, 1977. – P. 357–414.
14. El-Shinnawi M.M, Omran M.S. Effect of different levels of a trace element nutritional mixture on organic matter decomposition and the number of certain heterotrophs in soil // *Rostl. Vyroba.* – 1976. – vol. 22, N 1. – P. 11–17.
15. Epelede Lur, Becceerril Jose M., Kowalcuk George A., Deng Ye et al. Impact of metal pollution and *Thlaspi caerulescens* growth on soil microbial communities // *Appl. and Environ. Microbiol.* – 2010. – 76, N 23. – P. 7843-7853.
16. Landa E.R., Frank S.C. Effect of mercuric chloride on carbon mineralization in soils // *Plant and Soil.* – 1978. – vol. 49, N 1. – P. 179–183.
17. Xiong Jinbo, Wu Liyon, Tu Shuxin, Van Nostrand Joy D. Microbial communities and functional genes associated with soil arsenic contamination and the rhizosphere of the arsenic-hyperaccumulating plant *Pteris vittata* L. // *Appl. and Environ. Microbiol.* – 2010. – 76, N 21. – P. 7277-7284.

Малиновська І.М.

Формування мікробних угруповань сірого лісового ґрунту за умов підвищеного забруднення важкими металами

Досліджено стан мікробних угруповань сірого лісового ґрунту, забрудненого важкими металами у дозах 5, 10, 100 ГДК, за відсутності і наявності вегетуючого фітоценозу (кукурудза). Виявлено протекторну функцію фітоценозу щодо декількох груп мікроорганізмів, зокрема, азотобактера і полісахаридсинтезуючих бактерій. На прикладі мікроміцетів підтверджено більшу стійкість до забруднення важкими металами міцеліальних форм мікроорганізмів. Показано, що із збільшенням дози поллютанту у ґрунті уповільнюється мінералізація органічних і орґано-мінеральних комплексів, у тому числі гумусу.

Ключові слова: мікробіоценоз, сірий лісовий ґрунт, важкі метали, азотобактер, полісахаридсинтезуючі бактерії, мікроміцети, мінералізація, фітотоксичність.

Malynovskaya I. M.

Formation of microbial communities of grey forest soil at the conditions of increased level of heavy metals

It is researched the state of microbial communities of grey forest soil which is contaminated by heavy metals in doses of 5, 10, 100 MPC in the absence and presence of vegetative phytocenosis (maize). The protective function of phytocenosis of several groups of microorganisms, especially azotobacter and polysaccharide synthesizing bacteria, is discovered. The greater resistance to contamination of heavy metals of mycelium forms of microorganisms is confirmed by example of micromycetes. It is shown that mineralization of organic and organic-mineral complexes, including humus, is slowed down with the increasing of doses of pollutants in the soil.

Keywords: microbiocenosis, grey forest soils, heavy metals, azotobacter, polysaccharide synthesizing bacteria, micromycetes, mineralization, phytotoxicity.

Рецензенти

Курґак В.Г. – д. с.-г. н.

Степура О.Г. – к. с.-г. н.

Стаття надійшла до редакції 02.06.2015 р.