

© 2008 Т.А. Овчинникова, Т.А. Панкратов*

НЕКОТОРЫЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОЧВЕННОГО ПОКРОВА ГОРОДА НОВОКУЙБЫШЕВСКА В ОСЕННИЙ ПЕРИОД

В системе многоуровневого мониторинга почв, включающей долговременные и краткосрочные наблюдения, показатели состояния почвенной микрофлоры относятся к наиболее чувствительным. Именно они определяют, так называемую, раннюю диагностику почв. Для этой цели используются такие показатели как общая численность микроорганизмов, видовой состав, биомасса, интенсивность дыхания почв. Определение этих параметров позволяет обнаружить тенденции и скорость происходящих в почве изменений. Однако микробиологические показатели сильно варьируют, и поэтому для более надежной диагностики почв по состоянию микрофлоры необходим предварительный отбор показателей из разряда ее количественных и качественных характеристик, которые обладают большей стабильностью в условиях конкретных экосистем.

Ключевые слова: почвенный покров, микробиология.

Ovchinnikova T.A., Pankratov T.A.

SOME MICROBIOLOGICAL FEATURES OF A SOIL COVER OF CITY NOVOKUIBYSHEVSK IN THE AUTUMN PERIOD

As a result of microbiological researches 10 soil samples in territory of Novokuibyshevs in 6-km radius from the centre on a direction on north, south, southwest and east the laws of a soil cover were revealed.

Key words: a soil cover, microbiology.

МЕТОДИКА

Наши исследования осуществлялись на территории г. Новокуйбышевска, в зоне, ограниченной радиусом 6 км от центра города. На данной территории были отобраны 10 почвенных образцов в 4 радиальных направлениях: на север, юг, восток, юго-запад. Точки отбора представлены на схеме (рис. 1).

1). Бактериальный питательный агар – это питательная смесь для выявления общей численности организмов и видового состава бактериального комплекса.

Состав бактериальной среды.

на 1 л водопроводной воды:

сухой питательный агар – 1 г,

глюкоза – 1г,

* Самарский государственный университет, г. Самара

пептон – 1 г,

агар – 15 г.

2) Агар Чапека – питательная среда для выявления общей численности микроорганизмов и характеристики грибного компонента микрофлоры.

Состав агара Чапека.

на 1 л. водопроводной воды:

глюкозы – 20 г,

KCl – 0,5 г,

MgSO₄ – 0,5 г,

K₂HPO₄ – 1 г,

NaNO₃ – 2 г,

FeSO₄ – 0,01 г,

CaCO₃ – 3 г,

агар – 15 г.

Анализ микробиологических посевов из исследуемых почвенных образцов проводился с целью:

- оценить общую численность микроорганизмов;
- оценить качественный состав микрофлоры.

Отбор проб, согласно правилам микробиологического анализа почв, находящихся под прямым аэротехногенным воздействием, проводили путем отбора пластов почвы площадью 10 x 10 см и глубиной 5-10 см с 5-10 участков на исследуемой территории (рис. 1). При отборе проб следует избегать зон с резким воздействием стока, корневых систем растений и других факторов, влияющих на биологическую активность почв. Верхний слой почвы толщиной 0,5-1 см следует срезать и отбрасывать. Почвенные пробы, отобранные таким образом, объединяют в средний образец и высушивают до воздушно-сухого состояния. Сухая почва просеивается через сито с диаметром отверстий 2 мм. В качестве питательной среды для посева почвенной суспензии использовался универсальный питательный агар (Добровольская, Скворцова, Лысак, 1989).

Методика посева: к навески 1 г почвы добавляется 10 мл стерильной дистиллированной воды, смесь ставится на 3 мин. на магнитную мешалку в режиме максимального перемешивания. Это необходимо для более полного высвобождения микроорганизмов от почвенных частичек и от их связей с друг другом. От правильности проведения диспергирования зависят показатели количества микроорганизмов и «микробиологическая чистота КОЕ», выросших на питательных средах. Затем в условиях стерильного бокса производится разведение полученной суспензии в 1000 раз путем 3-х кратного разведения 1:10 (каждый раз используется новая стерильная пипетка). Из последнего разведения производится посев в количестве 0,1 мл на 1 чашку Петри. На каждую из питательных сред – ПБА (бактериальная среда) и на среду Чапека – посев производится в 5-ти повторностях.

Инкубирование посевов ведется при 28°C. Подсчет общей численности микроорганизмов производили на 5-ый день инкубации. При этом подсчитывали общее число колоний, относящихся к бактериям, актиномицетам и грибам. Численность грибов на агаре Чапека определяли на 7-ой день инкубации. На 4-ый и 5-ый день инкубации посевов проводилось выделение морфотипов колоний по следующим морфологическим признакам: форма колонии, поверхность и профиль колонии, прозрачность колонии, блеск колонии, край колонии. По совокупности морфологических признаков в исследуемых посевах с 50 чашек Петри (10 исследуемых участков на территории г. Новокуйбышевска) было выделено 26 морфотипов колоний, образованных бактериями и актиномицетами.

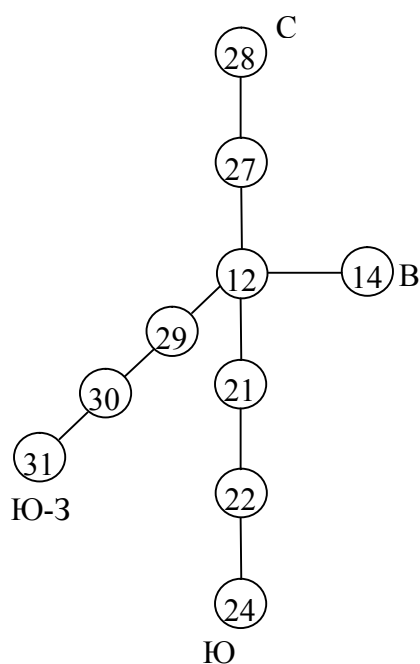


Рис. 1. Схема расположения точек отбора образцов почвы для микробиологического анализа

Для наиболее многочисленных морфотипов колоний (их было 11) была проведена таксономическая идентификация. Анализ каждого визуально выделяемого типа колонии проводили путем тестирования нескольких однотипных колоний. Каждый из исследуемых морфотипов колоний был пересеян на ту же питательную среду на скошенном агаре. Полученные изоляты исследовались в динамике на 3, 5 и 7 дни их инкубации. Для этого проводилось микроскопирование, окрашивание по Граму и наблюдение за изменением формы и размеров вегетативных клеток бактерий и динамики образования спор и других форм возрастной модификации клеток бактерий и мицелия актиномицетов.

Анализ совокупной картины микроскопии изолятов колоний и их макроскопической картины позволил провести частичную крупноранговую

идентификацию микроорганизмов, результаты которой представлены в табл. 2.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ПОЧВЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ

Отбор проб для микробиологических исследований проводился в середине сентября 2005 г. Сроку отбора предшествовала 2-х месячная засуха. По нашим данным, общая численность микроорганизмов в разных точках оказалась достаточно низкой и колебалась на бактериальной питательной среде от 4×10^6 до 58×10^6 КОЕ на 1 г почвы, а на среде Чапека – от 1×10^6 КОЕ до 42×10^6 КОЕ на 1 г почвы (рис. 2, 3).

Согласно диагностической шкале Д.Г. Звягинцева (Звягинцев, 1978), полученные нами данные по общей численности организмов характеризуют исследуемые почвы как почвы, обладающие средним и низким уровнем биологической активности. Исследования микробиологической активности почв, проведенные в агроландшафтах Самарской области методом чашечных посевов, обнаружили гораздо более высокий уровень численности микроорганизмов, который колебался в пределах $n \times 10^8$ – $n \times 10^{10}$ КОЕ на 1 г почвы.

Достаточно низкая численность микроорганизмов в почвах г. Новокуйбышевска закономерна, так как известно, что данный показатель прямо коррелирует с содержанием органического вещества в почве и падает с уплотнением почвы и снижением ее влажности (Бабьева И.П., Зенова Г.М. 1989., Усачева А.Н., Сиганова Н.В. 2004). На фоне существенного техногенного загрязнения городской среды, городские почвы характеризовались относительно высоким уровнем содержания органики (гумуса), были сильно уплотнены и пересушены в результате длительной засухи.

На схеме (рис. 2) представлены данные по общей численности микроорганизмов, обнаруженные при исследовании почвенных образцов из 10 точек г. Новокуйбышевска. Довольно хорошо прослеживается увеличение общей численности от центра города к периферии на север, юг, юго-запад. На основании данных общей численности можно выделить центральную зону, радиусом до 3 км, где характерна низкая численность микроорганизмов от 4×10^6 до 28×10^6 КОЕ на 1 г почвы, и вторую зону с большими показателями численности – от 27×10^6 до 56×10^6 на 1 г почвы.

Показатели общей численности микроорганизмов чаще всего используются для характеристики биологической активности почв, но ряд авторов отмечает нестабильность этого показателя, получение противоречивых данных (Воробейчик и др., 1991). Так, при исследовании почвенной микрофлоры в модельных экспериментах с одноразовым внесением загрязняющих веществ отмечается увеличение общей численности микроорганизмов или численности отдельных физиологических групп (Воробейчик и др. 1991; Медведева, Яковлев, 2004; Колесников 2005). Исследование почв городских территорий, находящихся в условиях постоянного комплексно-

го антропогенного загрязнения, также обнаруживает разноречивые данные (Усачева, Сиганова, 2004; Артамонова, Сысо, 2005).

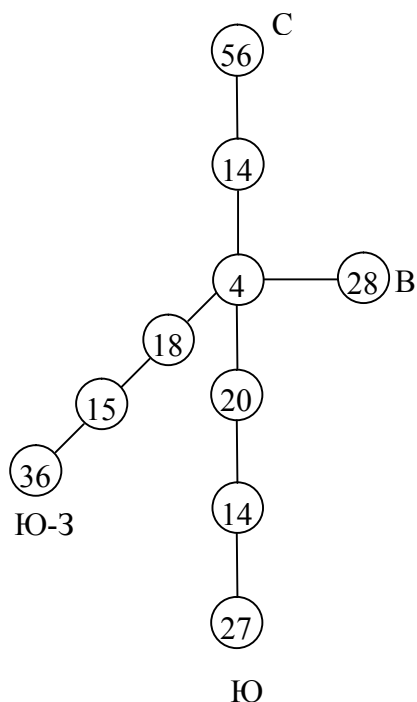


Рис. 2. Показатели общей численности почвенных микроорганизмов на исследуемой территории г. Новокуйбышевска, $n \times 10^6$ КОЕ на 1 г почвы

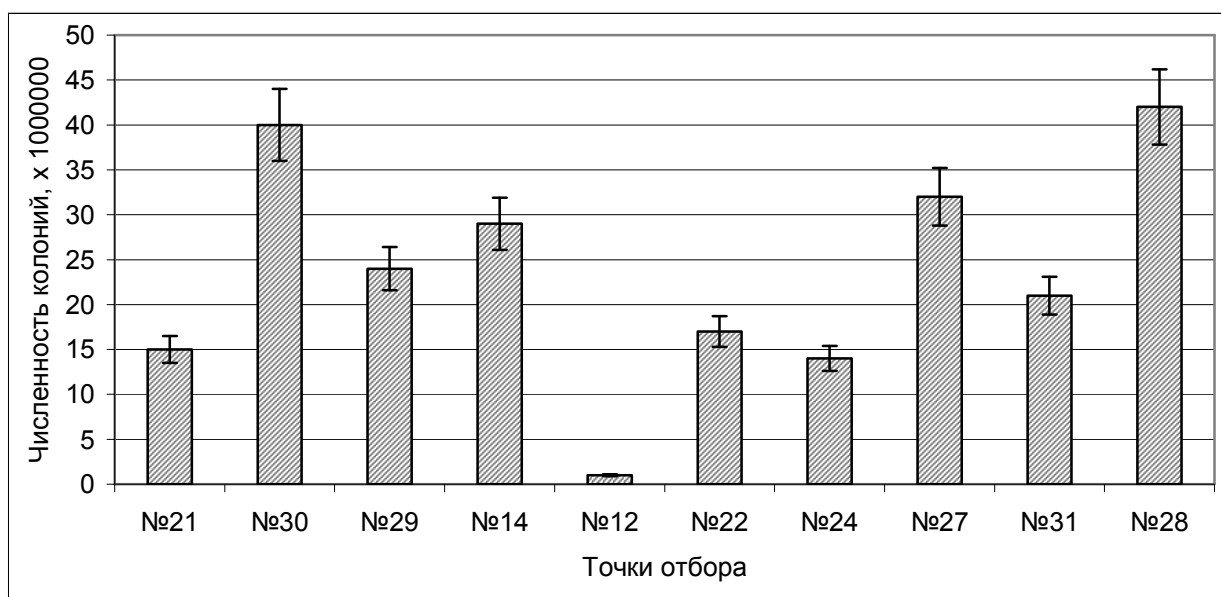


Рис. 3. Общая численность колоний микроорганизмов на среде Чапека

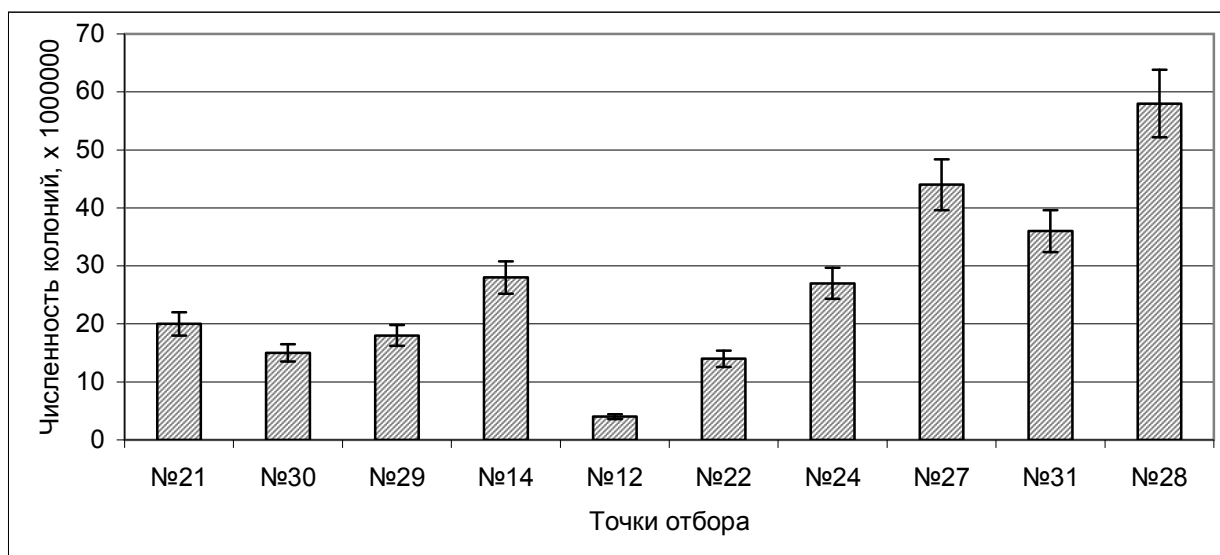


Рис. 4. Общая численность колоний микроорганизмов на бактериальной среде

Анализ литературы показал, что более надежными индикаторами изменения состояния почвенной микрофлоры являются показатели, полученные на основе анализа качественного состава микрофлоры (Воробейчик, 1991; Медведев, Яковлев, 2004; Колесников, 2005; Марфенина 1994). Почвенный микробокомплекс - достаточно устойчивая адаптивная живая система. Упругая устойчивость микробных сообществ к аэротехническому загрязнению проявляется в смещении фокуса функционирования в сторону адаптивных по отношению к загрязнителям форм (Медведева, Яковлев; 2004). Адаптация микробокомплекса урбаноземов диагностируется в основном на уровне крупноранговых таксонов, а иногда и на уровне видового состава (грибы, водоросли), а в случае исследования бактериальной флоры, идентификация ведется до рода и более крупных таксонов (Добровольская, 1989; Колесников, 2005).

Исследования показали, что большая часть выявленных колоний микроорганизмов относится к группе грамположительных бактерий и варьирует в разных точках отбора от 62 до 100%. Эта группа микроорганизмов более устойчива к засухе, хорошо переносит неблагоприятные условия за счет образования спор, способных долго сохраняться в почве. Обнаруженные нами грамотрицательные бактерии также отличает относительно высокая устойчивость к неблагоприятным условиям. Грамотрицательные миксобактерии являются обычными обитателями почв степей и полупустынь. Столь высокий крен в сторону грамположительных бактерий в исследуемых почвах связан, видимо, с продолжительным периодом засухи, предшествующему сентябрьскому отбору почв (табл. 2).

Анализ соотношения численности бактерий и грибов в исследуемых почвах проводили по соотношению колоний данных групп микроорганизмов в посевах на бактериальной питательной среде и на среде Чапека, преимущественно поддерживающий развитие грибов. Грибные колонии на

обеих средах достоверно не учитывались, но и там, и там обнаруживались единичные колонии грибов одного рода – *Penicillium*. Из почв точек отбора № 12, 28, 31 грибные колонии не высевались даже на агар Чапека. Снижение грибного представительства в почвенной микрофлоре урбаноземов отмечается рядом авторов (Марфенина, 1994; Марфенина, 2005; Полянская, 2001).

Согласно литературным данным качественные показатели почвенной микрофлоры, в частности, показатели разнообразия бактериальной микрофлоры почв, оцениваемой по числу морфотипов колоний, надежней характеризуют состояние биологической активности почв в условиях загрязнения. Для почв с более высоким уровнем загрязнения отмечается большее разнообразие микроорганизмов (Медведева, Яковлев 2004; Колесников 2005; Марфенина 1994).

Полученные нами данные по разнообразию бактериальной флоры обнаруживает отсутствие связи между показателем общим численности микроорганизмов и показателями бактериального разнообразия (табл. 2).

Более 50% колоний на агаре из каждого исследуемого почвенного образца являются представителями 3-х групп грамположительных микроорганизмов. Это представители родов *Rhodococcus* (от 0 до 75,4%), *Bacillus* (от 5,5 до 75%), *Actinomycetes* (от 2,7 до 40,7%). Схемы их долевого участия в почвах всех рассматриваемых точек отбора представлены на рис. 3,4,5.

Долевое участие колоний (%) рода *Rhodococcus*, *Bacillus* и *Actinomycetes* в исследуемых почвенных образцах характеризуется прямой или обратной корреляционной связью с показателями общей численностью микроорганизмов (рис. 5, 6, 7).

Представители родов *Rhodococcus* и *Bacillus* относятся к разряду наиболее обильных и динамичных, именно они определяют уровень показателя общей численности микроорганизмов (табл. 2).

Доля колоний рода *Rhodococcus* падает от периферии к центру исследуемой территории в северном, южном и юго-западном направлении. Максимальное значение долевого участия *Rhodococcus* приходится на самые периферийные участки и составляет соответственно в северном направлении 67,0%, в южном - 75,4%, в юго-западном – 61,2%. В городской черте этот показатель колебался от 0 до 25,0% (рис. 5). Для представителей родов *Bacillus* и *Actinomycetes* характерно обратное по отношению к общей численности микроорганизмов распределение и удаленности от центра города распределение. Минимальная величина доли колоний этих родов отмечается в посевах, произведенных из периферических точек (№ 28, 24, 31) (рис. 5 А, Б).

При сопоставлении показателя общей численности микроорганизмов и представительства *Actinomycetes* в исследуемых точках территории города была обнаружена более строгая почти линейная связь (рис. 5). В центральной части территории города с радиусом до 3 км долевого участие *Actinomycetes* оказывается достаточно высоким и колеблется в пределах от

11,4 до 40,7%, в то время как на расстоянии до 6 км этот показатель падает по всем рассматриваемым направлениям (рис. 5 В).

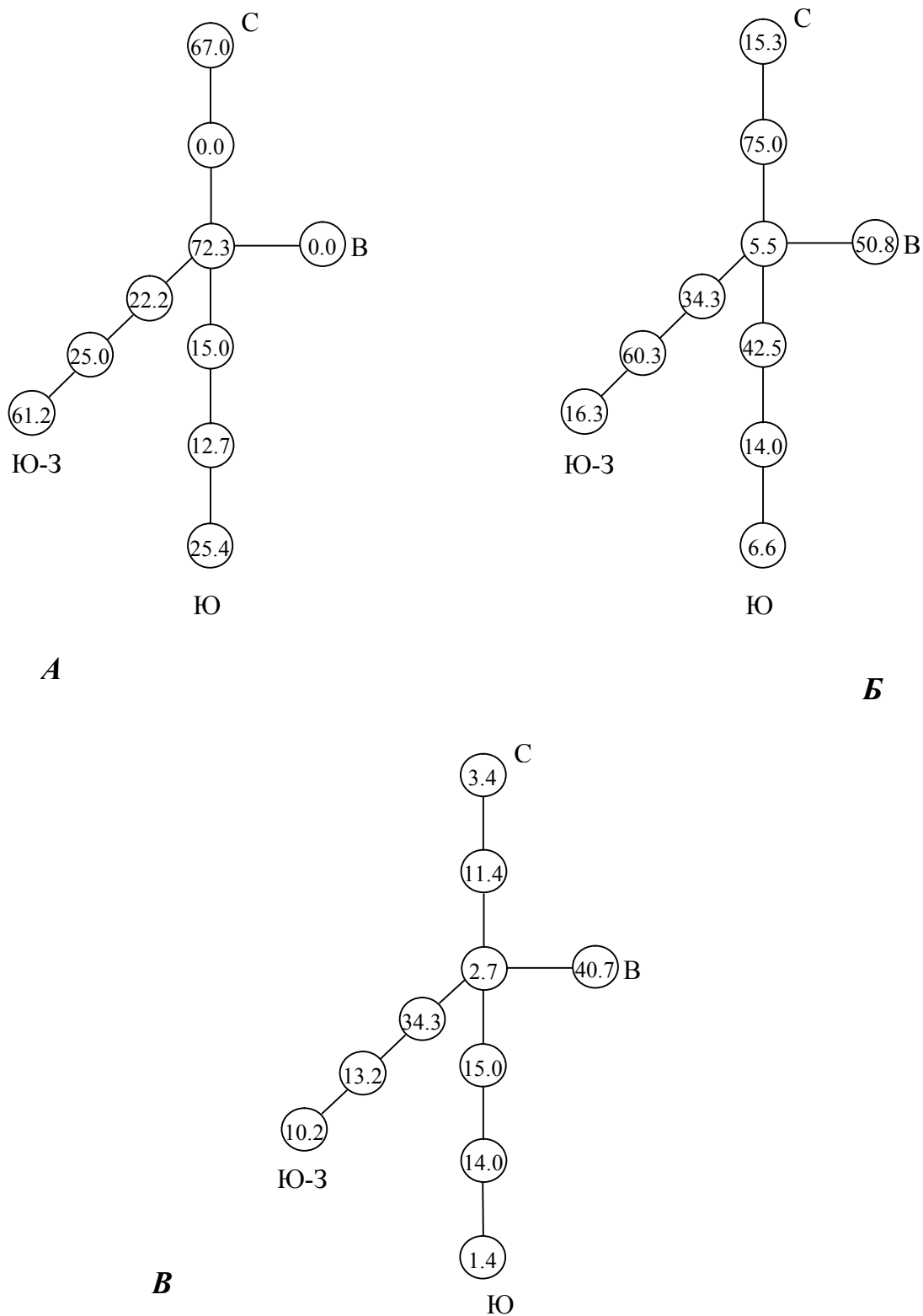


Рис. 5. Представительство микроорганизмов в почвах г. Новокуйбышевска, %: А - рода *Rhodococcus*, Б – *Bacillus*, В – *Streptomyces*.

Ряд авторов, характеризуя загрязнение почв, также отмечают увеличение доли актиномицетов в системе почвенного микробокомплекса под влиянием техногенного загрязнения (Колесников 2005, Артамонова, Сысо 2005). Среди *Streptomyces*, выделенных нами на бактериальной среде, основная масса колоний имела хорошо выраженную пигментацию. Часть из этих колоний выделяла пигмент в агар. Внутриклеточная пигментация (окраска колоний) и внеклеточная пигментация (окраска агара) варьировала в широкой цветовой гамме: от коричнево-зеленых до синих.

Одной из функций микробиальных пигментов является антибиотическая функция, позволяющая им защищаться и эффективно бороться за субстрат (Егоров 1994, Звягинцев, Зенова, 2001). Известно, что наиболее эффективными продуцентами антибиотиков в почве являются представители *Actinomycetes* и рода *Bacillus* (Егоров 1994, Звенигородский и др. 2004.). Вероятно, что в условиях города в урбаноземах максимальное преимущество получают микроорганизмы, обладающие высокой биохимической агрессивностью. Исследуемые почвенные образцы характеризуются высокой гумусностью (более 7%) и высоким значением pH (от 7,0 до 8,5), что создает преимущества для развития бактериальной микрофлоры, среди которой в черте г. Новокуйбышевска преобладают *Actinomycetes* и *Bacillus*.

В картину описанных выше закономерностей изменения исследуемых показателей не укладывается одна точка (№ 12) - газон на пл. Ленина с существенно трансформированной и переуплотненной почвой. Соотношение индикаторных родов бактерий в этой точке сходны с таковыми, полученными для периферийной зоны города. Одновременно можно отметить, что для данного почвенного образца выявлена высокая аммонифицирующая активность почв (табл. 3). Возможно, что причиной этого являются особые микроклиматические условия среды, защищенность древесной растительностью, снижающие уровень антропогенного воздействия на почвы. Возможно также, что анализ переуплотненных почв по показателям микробиологической активности, проведенный на насыпных разрыхленных образцах, ведет к некоторому сдвигу состояния образца, отражением чего является активация микрофлоры.

ВЫВОДЫ

В результате микробиологических исследований 10 почвенных образцов на территории г. Новокуйбышевска в 6-км радиусе от центра по направлению на север, юг, юго-запад и восток были обнаружены следующие закономерности:

Показатели общей численности микроорганизмов имеют среднее значение для почв нашей зоны, согласно с диагностической шкалой Звягинцева;

Показатели общей численности микроорганизмов обнаруживают некоторую тенденцию к увеличению от центра города к его периферии;

Показатель разнообразия бактериальной микрофлоры не обнаружил закономерных изменений при удалении от центра к периферии города;

Наиболее многочисленными оказались бактерии, принадлежащие группе грамположительных бактерий. Это представители родов *Rhodococcus* и *Bacillus* и *Actinomycetes*. Их количество превышает 50% от общего числа колоний в посевах;

Наиболее информативными и стабильными в отношении диагностики почв оказались показатели обилия (%) в микрофлоре исследуемых почвенных образцов оказались представители рода *Actinomycetes*. Отмечается четкое снижение доли *Actinomycetes* от центра к периферии города по всем трем исследованным направлениям 6-км зоны города.

Полученные результаты вполне закономерны, учитывая то, что представители всех доминирующих групп бактерий являются устойчивыми к комплексу неблагоприятных условий среды. Представители рода *Bacillus* и *Actinomycetes* известны как продуценты антибиотиков, что дает им преимущество в борьбе за органический субстрат и позволяет доминировать. Именно представители родов *Rhodococcus* и *Actinomycetes* обладают способностью использовать в качестве субстрата разнообразные органические соединения, в том числе алифатические углеводороды и ароматические соединения разнообразной структуры.

Сдвиги от нормы существенны, но данных по городским почвам мало. *Streptomyces* Недостаточно данных одного сезона.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Артамонова В.С., Сысо А.И. Городская среда обитания микроорганизмов // Экология и биология почв. Матер. междунар. науч. конф. Ростов-на-Дону, 2005. С. 33-36.

Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв. М.: Наука, 1989. 289 с.

Воробейчик Е.Л., Садиков О.Ф., Фарафонов М.Г. Экологическое нормирование техногенных загрязнений наземных экосистем. – Екатеринбург: УИФ «Наука», 1991. 277 с.

Добровольская Т.Г., Скворцова И.Н., Лысак Л.М. Методы выделения и идентификации почвенных бактерий. Учебное пособие. – М.: МГУ, 1989. 72с.

Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М.: МГУ, 1994. 512 с.

Звенигородский В.И. и др. Микробы-антагонисты (стрептомицеты и бациллы) выделенные из почв разных типов. Почвоведение, 2004. № 7. С. 860-866. - **Звягинцев Д.Г.** Биологическая активность почв и шкала для оценки некоторых ее показателей // Почвоведение, 1978. № 6. С. 48-54. - **Звягинцев Д.Г., Зенова Г.М.** Экология актиномицетов. М.: ГЕОС, 2001. 257 с.

Колесников С.И. Использование показателей биологической активности в целях мониторинга диагностики и нормирования нефтезагрязненных почв // Экология и биология почв. Матер. междунар. науч. конф. Ростов-на-Дону, 2005. С. 218-223.

Марфенина О.Е. Микологический мониторинг почв: возможности и перспективы. Почвоведение, 1994. №1. С. 75-80. - **Марфенина О.Е.** Микроскопические грибы в антропогенно нарушенных почвах: результаты исследования и перспективы // Экология и биология почв. Матер. междунар. науч. конф. Ростов-на-Дону, 2005. С. 304-306. - **Медведева М.В., Яковлев А.С.** Микробиально-биохимическая индикация состояния антропогенно нарушенных почв восточной фенноскандии // Экология и биология почв. Матер. междунар. науч. конф. Ростов –на-Дону, 2004. С. 177-178.

Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта и др. М.: Мир, 1997. Т. 1, 2.

Полянская Л.М., Никонов В.В., Лукина И.В., Паникова А.Н., Звягинцев В.Г. Микроорганизмы Al-Fe-гуминовых подзолов сосняков лишайниковых в условиях аэротехногенного загрязнения // Почвоведение, 2001. № 2. С. 215-226.

Усачова А.Н., Сиганова Н.В., Полещук О.Е. Влияние процессов почвенной деградации на количественный состав бактерий, актиномицетов и грибов // Экология и биология почв. Матер. междунар. науч. конф. Ростов-на-Дону, 2004. С. 308-312.

Поступила в редакцию
21 января 2008 г.