

УДК 574.24

**ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ
БИОТЕСТИРОВАНИЯ ЗАГРЯЗНЕННЫХ ТЯЖЁЛЫМИ
МЕТАЛЛАМИ ПОЧВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
АЗОТФИКСИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ**

Бойченко Артём Александрович, Виловская Анна Александровна

Автономная некоммерческая организация дополнительного образования

"Детский технопарк "Кванториум" в городе Невинномысске"

г. Невинномыссск, Ставропольский край, loez3012@gmail.com

Аннотация: В работе затрагивается важная тема влияния тяжёлых металлов на бактериальную флору почвы, и азотфиксирующие бактерии в частности. Проведены исследования по определению реакции микроорганизмов на тяжёлые металлы, в качестве биоиндикаторов выбраны азотфиксирующие бактерии. Доказано, что при высоких уровнях загрязнения тяжёлыми металлами происходит снижение численности бактерий.

Ключевые слова: азотфиксирующие бактерии; тяжёлые металлы; культивирование; биотестирование.

Boychenko Artem, Vilovskaya Anna (Russia). EVALUATION OF THE POSSIBILITY OF IMPLEMENTING BIOTESTING OF SOIL POLLUTED WITH HEAVY METALS USING NITROGEN-FIXING BACTERIA

Abstract: The paper touches upon the important topic of the influence of heavy metals on the bacterial flora of the soil, and nitrogen-fixing bacteria in particular. Conducted studies to determine the reaction of microorganisms to heavy metals, nitrogen-fixing bacteria were selected as bioindicators. It has been proven that at high levels of contamination with heavy metals, a decrease in the number of bacteria occurs.

Key words: nitrogen-fixing bacteria; heavy metals; cultivation; biotesting.

Почва – естественная среда обитания для миллиардов самых различных микроорганизмов. Почвы, находящиеся в границах крупных и промышленных городов, испытывают мощное воздействие антропогенного фактора, приводящее к нарушениям состава почв и попаданию в неё различных загрязнителей. В результате возникает совершенно особый «тип» почвы – городская почва или урбанозём. В почве протекают различные процессы, которые в результате загрязнения нарушаются [5]. На первый план в загрязнении химическими веществами выступают тяжёлые металлы и их соединения. Основной причиной загрязнения почв тяжелыми металлами (ТМ) является деятельность человека. Источники техногенных эмиссий поллютантов: горно-металлургические, химические, машиностроительные, топливно-энергетические предприятия и т.д. [4,8]. Тяжёлые металлы, выбрасываемые в атмосферу в результате технологических процессов от промышленных предприятий, в последствии оседают на земной поверхности в непосредственной близости от предприятий .

Микроорганизмы по-разному реагируют на тяжёлые металлы [6]. Некоторые из них способны осуществлять активный транспорт тяжёлых металлов внутрь клеток. Из бактерий наиболее чувствительны к повышенным концентрациям меди и никеля в почве азотфиксирующие и нитрифицирующие бактерии. Из почв, подверженных воздействию выбросов производственных предприятий в течение нескольких десятков лет (40-50 лет), на расстоянии 7-10 км по розе ветров выпали целые физиологические группы бактерий: азотфиксирующие, нитрифицирующие, целлюлозолитические бактерии, цианобактерии [10]. Биотестирование востребовано в разных сферах мониторинга качества почв, воды и других составляющих экосистемы [7]. Биоиндикаторы – организмы, присутствие, количество или особенности развития которых служат показателями естественных процессов, условий или антропогенных изменений среды обитания. Для оценки токсичности почвы планируется использовать в качестве тест-объектов азотфиксирующие бактерии.

Цель представленных исследований – в течение года оценить устойчивость бактерий рода *Azotobacter* к различным концентрациям свинца, никеля, меди и цинка при моделировании загрязненных сред для дальнейшего использования бактерий рода *Azotobacter* в качестве биоиндикаторов.

Задачи:

1. Изучить и проанализировать литературные источники по теме исследования.
2. Исследовать образцы почвы на механический состав, наличие карбонатов, кислотность, содержание нитратов.
3. Определить реакцию жизнеспособности азотфиксирующих бактерий в зависимости от количества тяжёлых металлов в среде.
4. Оценить азотфиксирующие бактерии как тест-объект при биоиндикации загрязнённых тяжёлыми металлами почв.

Гипотеза: увеличение концентрации тяжёлых металлов в почве приводит к снижению числа азотфиксирующих бактерий, следовательно, азотфиксирующие бактерии могут использоваться как биоиндикаторы при биотестировании почв.

Объект: урбаноцём

Предмет: влияние тяжелых металлов на почвенные бактерии рода *Azotobacter*.

Азотфиксирующие бактерии могут использоваться как биоиндикаторы при биотестировании почв. Уменьшение содержания их в почве может сигнализировать о повышенном содержании меди, никеля, цинка, свинца. Несомненно, что такая разбалансировка равновесия в почвенном микробиоценозе, должна рассматриваться как отрицательное явление.

Почва отбиралась методом конверта в разной степени отдалённости от источников загрязнения, на глубине 20 и 40 см соответственно. Эксперимент проводился весной и осенью 2022 года в трёх повторностях. Весной было взято 3 образца почвы на одной глубине (20см). Осенью мы решили продолжить

наше исследование, но взять уже 5 образцов на разной глубине 20 и 40 см соответственно по ГОСТ 17.4.4.02-2017 [2].

Чтобы оценить воздействие промышленных выбросов на состав микробиоты, мы взяли образцы почвы вблизи химического предприятия АО «Невинномысский Азот». Для оценки воздействия выбросов автотранспорта - на обочине федеральной трассы «Кавказ» - выбросы автотранспорта. Третье место отбора выбрано, потому что находится в непосредственной близости и к предприятию и к трассе, а значит, совмещает в себе оба вида загрязнений. Четвертый образец почвы брали из села Кочубеевского, так как по розе ветров выбросы переносятся именно туда, но там нет крупных дорог [10]. В качестве контроля использовали почву, взятую из лесополосы села Прогресс максимально удалённого от химических предприятий и дорог, то есть без техногенных загрязнений.

Отбор почв происходил в октябре 2022, в один и тот же день, чтобы исключить различия в абиотических факторах. Отбор проб почвы производили в почвенных разрезах на глубине 20 и 40 см.

В 2022 году была проведена серия экспериментов на базе АНО ДО «Кванториум».

Пробы, отобранные для анализа, высушили, затем рассыпали на бумаге, пинцетом удалили включения (неразложившиеся корни и растительные остатки, камни, новообразования), измельчили и пропускают через сито. Измельченные пробы поместили в полиэтиленовые пакеты по ГОСТ 29269-91.

Каждый образец почвы исследовали по механическому составу, на наличие карбонатов, нитратов и определили рН почвенной вытяжки по ГОСТ Р 56157-2014 [3].

Результаты экспериментов представлены в таблице №1.

Таблица 1 - Исследование почв по механическому составу, на наличие карбонатов, нитратов и рН почвенной вытяжки

Место отбора почвенной Пробы	Слой	Содержание NO3	Механический состав почвы	Наличие карбонатов	рН
------------------------------	------	----------------	---------------------------	--------------------	----

Лесополоса с.Прогресс(контроль)	верхний	66±13	Легкосуглинистый	Нет	7,6
	нижний	25±5	Среднесуглинистый	Нет	8,0
Необрабатываемый Земельный участок в с. Кочубеевском	верхний	200±4	Легкосуглинистый	Нет	7,3
	нижний	81±16	Тяжелосуглинистый	Нет	7,4
Придорожная территория у ОАО «Невинномысский Азот»	верхний	99±20	Среднесуглинистый	Нет	7,3
	нижний	55±11	Тяжелосуглинистый	Нет	7,3
Обочина трассы «Кавказ»	верхний	7,1±1,4	Тяжелосуглинистый	Нет	7,3
	нижний	25±5	Среднесуглинистый	Нет	7,1
Придорожная территория у трассы «Кавказ» вблизи ОАО «Невинномысский Азот»	верхний	363±73	Легкосуглинистый	Нет	7,2
	нижний	230±46	Среднесуглинистый	Нет	7,2

Для обнаружения азотфиксирующих бактерий мы приготовили микробиологические препараты и провели их окрашивание фуксином Циля и тушью и изучили его с помощью светового микроскопа при увеличении *400.

Клетки бактерий рода *Azotobacter* крупные (1-2 мкм в диаметре) овальной или палочковидной формы. Клетки могут располагаться одиночно, парами, так же формируют особые покоящиеся формы – цисты.

Для исследования содержания азотобактеров мы сравнили количество обростаний в 10 чашках Петри. Для этого, мы приготовили питательную среду Эшби. Среду разлили в стерильные чашки Петри. Сформировали из образцов почвы комочки и поместили в чашки по всей поверхности питательной среды. Подсчитали через 3, 7, 10 суток комочки почвы, обросшие микроорганизмами. Определили процент обростаний. Обрастания наблюдались во всех образцах почвы в разных количествах.

Сравнили результаты на 3, 7 и 10 день. Больше всего колоний микроорганизмов наблюдалось в почве села Прогресс, при этом экспериментальная и контрольная группа почти не отличались. Обростаний в почвах из села Кочубеевского, обочины трассы «Кавказ» и придорожной территории ОАО «Невинномысский Азот» было в половину меньше. Обростаний в почве придорожной территории у трассы «Кавказ» вблизи ОАО

«Невинномысский Азот» было меньше всего. Их число составляло четвертую часть от общего числа комочков почвы образца.

Таблица 2 - Количество обрастаний

Образец почвы		3 день		7 день		10 день	
		Кол-во обрастаний	%	Кол-во обрастаний	%	Кол-во обрастаний	%
Лесополоса с.Прогресс (контроль)	верхний	57	100	57	100	57	100
	нижний	47	79,6	59	100	59	100
Необрабатываемый земельный участок в с. Кочубеевском	верхний	22	33,8	27	41,5	28	43
	нижний	26	40	26	40	30	46,1
Придорожная территория у ОАО «Невинномысский Азот»	верхний	17	30,3	23	41	25	44,6
	нижний	16	29,6	19	35,1	23	42,5
Обочина трассы «Кавказ»	верхний	12	20,3	19	32,2	23	38,9
	нижний	17	28,8	19	32,2	25	42,3
Придорожная территория у трассы «Кавказ» вблизи ОАО «Невинномысский Азот»	верхний	13	20,6	15	23,8	16	25,3
	нижний	15	23,8	17	26,9	17	26,9

Опыты с обрастанием комочков почвы показали, что во всех образцах азотфиксирующие бактерии содержатся в разных количествах. Проведённый анализ почвы на содержание ТМ в ФГБУ Центре лабораторного анализа и технических измерений по Южному Федеральному округу ЦЛАТИ по Ставропольскому краю выявил обратную зависимость числа колоний азотфиксирующих бактерий от содержащихся в почве ТМ [9].

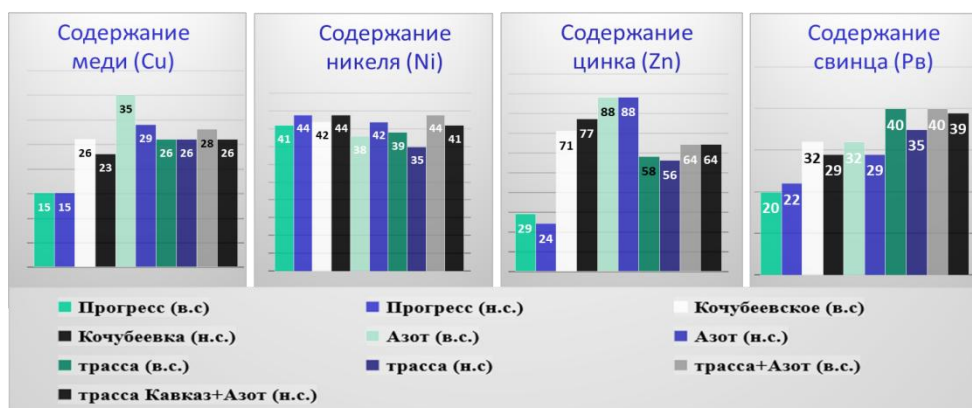


Рисунок №1. Содержание тяжёлых металлов в почвах

Таблица 3 - Содержание тяжёлых металлов в почве

Проба почвы	Слой	Cu	Pb	Zn	Ni
Лесополосас. Прогресс (контроль)	верхний	<20(15)	20±6	29±9	<50 (41)
	нижний	<20(15)	22±7	24±7	<50 (44)
Необрабатываемый земельный участок в с. Кочубеевском	верхний	26±8	32±11	71±23	<50 (42)
	нижний	23±8	29±12	77±26	<50 (44)
Придорожная территория у ОАО «Невинномысский Азот»	верхний	35±8	32±12	88±21	<50 (38)
	нижний	29±9	29±12	88±26	<50 (42)
Обочина трассы «Кавказ»	верхний	26±8	40±10	58±19	<50 (39)
	нижний	26±8	35±9	56±17	<50 (35)
Придорожная территория у трассы Кавказ вблизи ОАО «Невинномысский Азот»	верхний	28±11	40±8	64±17	<50 (44)
	нижний	26±7	39±7	64±19	<50 (41)

В связи с этим, мы решили найти, какое количество тяжёлых металлов ингибируют рост и развитие азотобактеров.

Для этого мы провели ещё один эксперимент. В одну часть чашек Петри со средой Эшби мы добавили нижнее значение предельно допустимая концентрация (ПДК), а в другую верхнее значение ПДК цинка, свинца, меди и никеля. Значения ПДК закреплены законодательно в ГОСТ, гигиенических и санитарных нормах и выступают основными критериями при оценке состояния окружающей среды. СанПиН 1.2.3685-21 "Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания" [1].

Бактерии выращивались в лабораторных условиях при температуре 26°C. Посев производили в чашки Петри при десятикратном разбавлении на плотной питательной агаризованной среде Эшби, обогащенной солями тяжелых металлов. Для моделирования загрязненной тяжелыми металлами среды использовали соли: свинца ацетат, меди (II) сульфат безводный, цинка хлорид, никеля сульфат.

В одну часть чашек было добавлено нижнее значение ПДК меди 0,06 мг/кг, никеля 0,08мг/кг, свинца 0,12мг/кг и цинка 0,46мг/кг. В другую часть чашек

верхнее значение ПДК: медь 0,6мг/кг, никель 0,8 мг/кг, свинец 1,2мг/кг, цинк 4,6мг/кг. Для чистоты эксперимента, в каждую чашку Петри добавили только по одной соли ТМ, затем культивировали чистую культуру азотфиксирующих бактерий, выделенных из полученных образцов. Контролем служили чашки Петри с питательной средой без солей тяжелых металлов.

Определили через 7 суток степень роста микроорганизмов. Выявили, какую часть они составляют.

Результаты

В чашке Петри с нижним и верхним значением предельно допустимой концентрацией (ПДК) меди и никеля наблюдался равный рост колоний азотбактеров. В чашке Петри с меньшим содержанием свинца культивирование происходит интенсивнее, чем в чашке с максимальным значением ПДК этого элемента. В чашках Петри с добавлением верхнего значения ПДК цинка наблюдалось меньшее число колоний по сравнению с контролем. Увеличение концентрации цинка приводит к ингибированию роста микроорганизмов.

Проведенные эксперименты доказали, что увеличение концентрации тяжёлых металлов в почве приводит к снижению числа азотфиксирующих бактерий.

Выводы

Препятствием при экологических исследованиях часто становится сложность применения методов анализа, труднодоступность и дороговизна оборудования, значительные затраты времени, необходимого для получения достоверных данных. В связи с этим в современных экологических исследованиях все чаще используются методы биоиндикации и биотестирования.

В отличие от биоиндикации, биотестирование является экспериментальным методом, суть которого в быстром и обобщённом определении качества среды при ее действии на лабораторные культуры биоиндикаторов.

В ходе проведённых опытов установлено, что все образцы почвы глинистые, хорошо задерживают воду и богаты питательными веществами. Карбонаты

отсутствуют во всех образцах, а нитратов больше в верхних слоях почвы, максимальное количество NO₃ обнаружено в придорожной территории у трассы «Кавказ» вблизи ОАО «Невинномысский Азот».

Также было выяснено, что разные почвенные слои обладают неравномерной степенью загрязнённости. Это обусловлено различной миграционной способностью каждого металла, взаимодействием с другими веществами, химическими и природными процессами, характеристикой почв, а также продолжительностью загрязнения территории.

Вся исследуемая почва имеет щелочную реакцию (при pH > 7 почва считается щелочной). Сильнощелочная почва в лесополосе села Прогресс, а почва, взятая у обочины трассы «Кавказ» близкая к нейтральной.

Проведенные эксперименты доказали, что увеличение концентрации тяжёлых металлов в почве приводит к снижению числа азотфиксирующих бактерий.

При небольшом содержании тяжелых металлов в почвах не наблюдается отчетливого изменения микробиологической активности. Это можно объяснить тем, что медь, цинк, кобальт, железо и некоторые другие элементы, относящиеся к тяжелым металлам, входят в состав ферментов и добавка их в среды в малых количествах стимулирует рост и метаболическую активность микроорганизмов. При более высоких уровнях загрязнения тяжелыми металлами происходит снижение численности бактерий.

Таким образом мы считаем, что азотфиксирующие бактерии могут использоваться как способ биоиндикации почв для оценки степени загрязнения почвы свинцом и цинком. Исследования по определению чувствительности азотфиксаторов к содержанию в среде тяжёлых металлов проводились нами дважды, в феврале и в октябре. При этом были получены схожие результаты.

Предложенный метод биотестирования обладает следующими достоинствами: чувствительность, экспрессность, универсальность (применимость в различных регионах), информативность доступность, то есть относительную дешевизну в использовании.

Библиография

1. СанПиН 1.2.3685-21 "Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания".
2. "ГОСТ 17.4.4.02-2017. Межгосударственный стандарт. Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа" (Введен в действие Приказом Росстандарта от 17.04.2018 N 202-ст)
3. ГОСТ Р 56157-2014. Национальный стандарт Российской Федерации Почва. МЕТОДИКИ (МЕТОДЫ) анализа состава и свойств проб почв.
4. Критерии отнесения опасных отходов к классу опасности для окружающей природной среды. (Утверждено приказом Министерства природных ресурсов России 15 июня 2001 г. № 511.)
5. Колесников С.И. Экологические последствия загрязнения почв тяжёлыми металлами / С.И. Колесников, К.Ш. Казеев, В.Ф.Вальков. – Ростов на Дону : изд-во СКНЦ ВШ, 2000. – 231 с
6. Наседкин П.О. Оценка содержания тяжелых металлов и радионуклидов в почвах земель сельскохозяйственного назначения / П.О. Наседкин, О.В. Нежевляк, А.Г. Шмидт // Международный научно-исследовательский журнал.- 2022. - №6 (120)
7. Обзор методов биоиндикации и биотестирования для оценки состояния окружающей среды / А. С. Еремеева, М. И. Донченко, В. С. Бучельников [и др.]// Молодой ученый. — 2015. — № 11 (91). — С. 537-540.
8. Сердюкова А.Ф. Последствия загрязнения почвы тяжёлыми металлами / А.Ф. Сердюкова, Д.А. Барабанщиков // Молодой ученый. – 2017. – № 51(185). – С. 131–135
9. Надежкина Е.С. Оценка содержания тяжелых металлов в почвах Пензенской области // Агрехимический вестник. 2015. №3.
10. world-weather.ru - Архив погоды в в Невинномысске (Россия), климат по месяцам, роза ветров в Невинномысске.