

Модельные эксперименты по влиянию кадмия на структуру микробных сообществ почв г. Алматы

© 2011. Б. Н. Мынбаева, к.б.н., профессор,
Казахский национальный педагогический университет им. Абая,
e-mail: bmynbayeva@gmail.com

Отмечено изменение структуры микрофлоры почв г. Алматы в модельных экспериментах при определении реакции «доза – эффект»: из зоны гомеостаза микробных сообществ постепенно выпадали чувствительные к Cd культуры – *Candida* и *Rhodotorula* (LD₁₀₀); *Cryptococcus* (LD₅₀); *Streptomyces*, шт. 2, и *Streptomyces*, шт. 3 (LD₅₀ и LD₁₀₀); *Pseudomonas* (LD₅₀); часть культур перешла в зону стресса. В зоне резистентности остались *Bacillus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Streptomyces*, шт. 4, *Fusarium*, *Streptomyces* шт. 1. Диагностической ценностью обладали устойчивая к ацетату кадмия культура грибов *Fusarium* и чувствительные культуры дрожжей *Candida* и *Rhodotorula*, актиномицетов *Streptomyces*, шт. 2, и *Streptomyces*, шт. 3.

Changes of the soil microflora structure in Almaty city soils in the model experiments for assesment of «dose-effect» reaction are noted. From the homeostasis zone of microbial communities to the Cd-sensitive cultures – *Candida* and *Rhodotorula* (LD₁₀₀); *Cryptococcus* (LD₅₀); *Streptomyces*, sp. 2, and *Streptomyces*, sp. 3 (LD₅₀ and LD₁₀₀); *Pseudomonas* (LD₅₀) were disappearing gradually; some part of the cultures transferred into a stress zone. *Bacillus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Streptomyces*, sp. 4, *Fusarium*, *Streptomyces*, sp. 1, remained in the resistance zone. Fungi *Fusarium* resistant to cadmium acetate and sensitive yeast *Candida* and *Rhodotorula*, actinomycetes *Streptomyces*, sp. 2, and *Streptomyces*, sp. 3, have a diagnostic value.

Ключевые слова: тяжёлые металлы, ацетат кадмия, летальная доза, микробные сообщества городских почв

Key words: heavy metals, cadmium acetate, lethal dose, microbial communities of urban soils

По современным представлениям микробиологические последствия загрязнения почв тяжёлыми металлами (ТМ) определяются их воздействием на состав и функционирование почвенной микробиоты [1]. Цель работы: определение наиболее выраженной реакции «доза – эффект» для микрофлоры почв г. Алматы по изменению микробной структуры почвенных ценозов при внесении различных доз ацетата кадмия в модельные почвенные образцы.

Объекты и методы исследований

Микроорганизмами-мишенями явились бактерии, дрожжи, актиномицеты и мицелиальные микроскопические грибы. Численность представителей почвенной микробиоты определяли стандартными методами почвенной микробиологии [2]: высевом почвенной вытяжки на селективные плотные питательные среды с различными дозами ацетата кадмия (Cd(CH₃COO)₂·7H₂O). Численность бактерий определяли на мясо-пептонном агаре (МПА); дрожжей – на сусло-агаре с 4 мл/л молочной кислоты для ингибирования роста бактерий;

актиномицетов – на крахмал-аммиачном агаре (КАА); целлюлозоразлагающих бактерий – на среде Гетчинсона и микроскопических грибов – на среде Чапека. Для идентификации микроорганизмов использовали определители [3, 4]. Продолжительность культивирования для бактерий и грибов составляла 4–7 сут., для актиномицетов – 14 сут. Чувствительность или устойчивость микроорганизмов к Cd оценивали по отсутствию или наличию их роста на соответствующих средах с почвенными образцами и определённой концентрацией Cd, степень выраженности этих параметров – по количеству КОЕ микроорганизмов, их процентному содержанию и показателю LD (аббр. с англ. яз. «lethal dose»), отражающим дозу Cd, при которой происходит угнетение роста, развития и численности микроорганизмов на 50% (LD₅₀) или 100% (LD₁₀₀).

Для оценки экотоксичности почв нами были выбраны следующие варианты модельных экспериментов с валовыми концентрациями кадмия (мг в 1 кг почвы): почвенные образцы урбанозёмов с содержанием 0,5 мг (контроль); 2-кратное увеличение, или 1,0 мг почвы, и 4-кратное увеличение, или 2,0 мг.

Результаты и их обсуждение

Реакции представителей микробного сообщества почв г. Алматы на возрастающие концентрации Cd, влияние которых окажется максимально положительным или отрицательным на представителей микрофлоры (через показатель LD), изучали в контролируемых условиях модельных экспериментов.

Доминирование разных групп микроорганизмов при различных концентрациях Cd позволило разделить диапазон микробного сообщества на несколько участков – адаптивных зон: 1) зона гомеостаза или зона устойчивости микробного сообщества; 2) зона стресса, в которой происходят существенные изменения сообщества; 3) зона резистентности – резко сокращается видовой состав сообщества, а доминантами становятся резистентные виды микроорганизмов.

Кадмий считается наиболее токсичным элементом из всех ТМ, хотя его содержание в почвенных образцах урбаноёмов составило 0,5 мг/кг почвы. В модельных опытах предполагалось определить зоны гомеостаза, стресса и устойчивости для представителей микробных сообществ при внесении более значительных его концентраций.

Результаты проведённых экспериментов в числовой форме представлены в таблице 1.

Микромицеты проявили разную реакцию на вносимые дозы Cd(CH₃COO)₂·7H₂O: сильно-го угнетения численности, роста и развития колоний не наблюдали для *Aspergillus* и *Penicillium* даже при 4-кратном увеличении дозы вносимого Cd, т. е. их можно назвать устойчивыми культурами по отношению к изучаемому ТМ. Культура *Fusarium* не только была устойчивой к Cd, но и увеличивала численность в 3–5 раз при 2 кратном и 4 кратном увеличении дозы соответственно по сравнению с контролем. Таким образом, устойчивыми тест-культурами можно считать *Aspergillus* и *Penicillium*, но токсичность почвенных образцов на Cd лучше устанавливать по статистически достоверному увеличению численности *Fusarium*. Следовательно, количество 7±1,1 КОЕ/г *Fusarium* соответствовало концентрации 0,5 мг/кг почвы, 24±3,3 и 35±4,6 – относилось к дозам 1 и 2 мг/кг почвы соли Cd.

Культуры дрожжей *Candida* и *Rhodotorula* оказались наиболее чувствительными к токсическому воздействию Cd: выявлены среднесмертельные LD₅₀ и биоцидные LD₁₀₀ показатели эффекта действия этого ТМ на дрожжи (рис. 1).

В динамике роста и развития культуры *Cryptococcus* в присутствии солей Cd наблюдали среднесмертельный показатель (LD₅₀) при 2-кратном увеличении дозы металла

Таблица 1

Численность микроорганизмов (КОЕ/г почвы) при различных дозах Cd

№	Выделенные культуры	Содержание Cd в почве		
		естественные урбаноёмы (0,5 мг/кг)	2-кратное увел. (1 мг/кг)	4-кратное увел. (2 мг/кг)
Микроскопические грибы				
1	<i>Fusarium</i>	7±1,13	24±1,9	35±2,8
2	<i>Penicillium</i>	87±3,2	61±2,5	55±2,0
3	<i>Aspergillus</i>	82±3,9	68±2,0	56±2,9
Дрожжи				
4	<i>Candida</i>	31±2,1	15±1,8	9±1,1
5	<i>Cryptococcus</i>	63±3,2	34±2,7	22±1,9
6	<i>Rhodotorula</i>	32±3,3	15±2,6	8±1,3
7	<i>Sporobolomyces</i>	23±2,5	17±2,0	11±2,3
Актиномицеты				
8	<i>Streptomyces, um. 1</i>	68±5,5	38±3,8	33±2,7
9	<i>Streptomyces, um. 2</i>	55±4,0	15±2,0	4±1,2
10	<i>Streptomyces, um. 3</i>	79±4,5	18±1,9	5±1,3
11	<i>Streptomyces, um. 4</i>	80±5,1	52±3,7	41±4,1
Бактерии				
12	<i>Bacillus</i>	80±6,2	70±5,0	64±5,4
13	<i>Pseudomonas</i>	49±4,3	34±5,1	23±3,5
14	<i>Cytophaga</i>	33±2,0	27±2,5	22±3,1

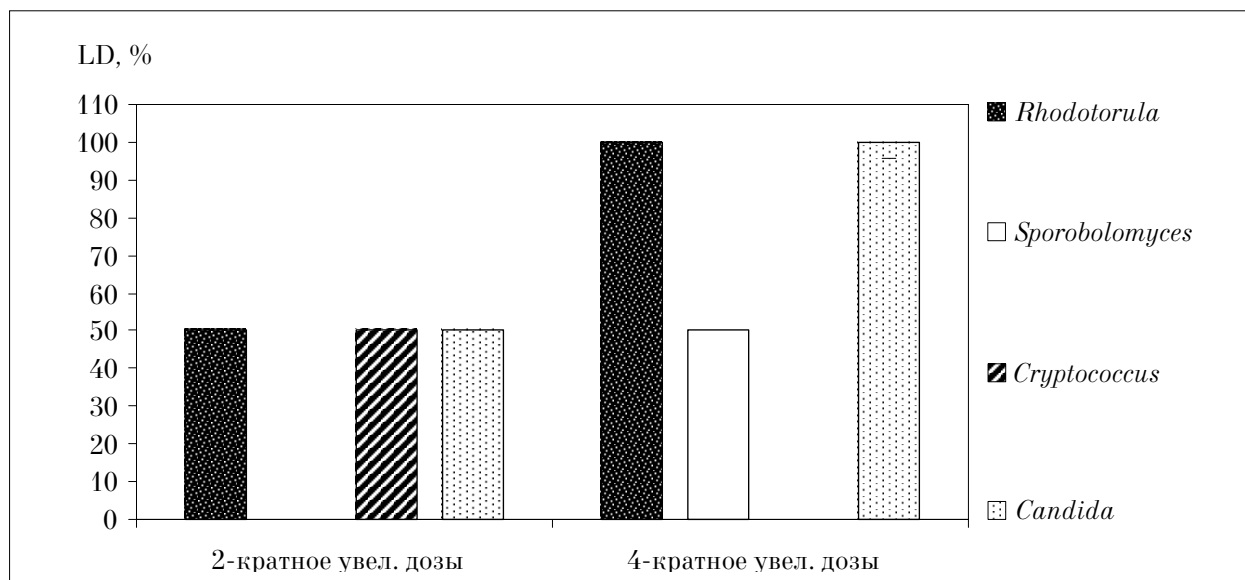


Рис. 1. Показатели среднесмертельной LD₅₀ и биоцидной LD₁₀₀ концентраций Cd(CH₃COO)₂·7H₂O для дрожжей

в среде выращивания. Этот же показатель определён для культуры дрожжей *Sporobolomyces*, но только при максимальной дозе вносимого Cd (4 ПДК). Следовательно, наиболее чувствительными культурами дрожжей по отношению к Cd можно назвать представителей родов *Candida* и *Rhodotorula*, наиболее устойчивой – *Sporobolomyces*. Культуры *Candida* и *Rhodotorula* легко выращивать и определять до рода, поэтому их можно использовать в качестве диагностических показателей определённых концентраций Cd: например, количество 31±2 КОЕ *Candida* соответствовало концентрации 0,5 мг/кг, 15±2 – 1 мг/кг, 9±1 КОЕ *Candida* – 2 мг/кг ацетата Cd в почвенных образцах. Дрожжи *Rhodotorula* имели сходные диагностические показатели.

Чувствительность к солям Cd проявили актиномицеты рода *Streptomyces*, шт. 2 и шт. 3: угнетение их роста наблюдали при 2-кратном увеличении дозы вносимого Cd, а при 4-кратном увеличении рост практически отсутствовал, т. е. эта доза явилась для них биоцидной (рис. 2).

Культура *Streptomyces*, шт. 4, по сравнению с другими проявила некоторую устойчивость к токсичному Cd: показатель LD₅₀ проявился при максимальной (4-кратной) дозе вносимого металла. *Streptomyces*, шт. 1, показал среднюю степень чувствительности. Таким образом, чувствительность актиномицетов к Cd была высокой; ни одна из 4 культур актиномицетов не проявила хороший уровень устойчивости к Cd. Следовательно, культуры акти-

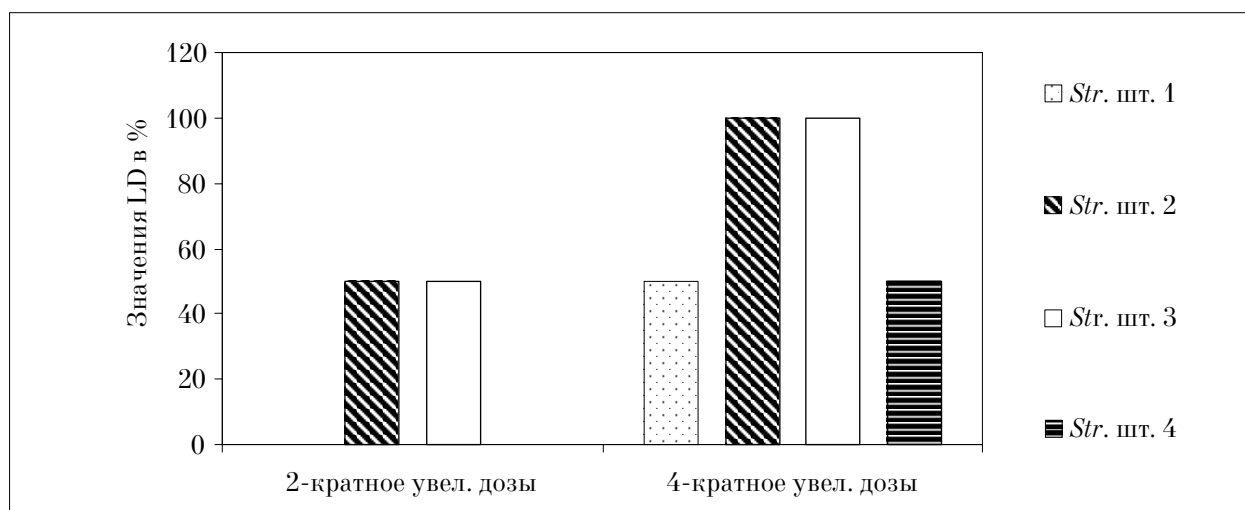


Рис. 2. Показатели среднесмертельной LD₅₀ и биоцидной LD₁₀₀ концентраций Cd(CH₃COO)₂·7H₂O для актиномицетов

номицетов *Streptomyces*, шт. 2, и *Streptomyces*, шт. 3, можно использовать для диагностики конкретных концентраций Cd: при 1 мг/кг количество составило КОЕ $16 \pm 2,0$; при 2 мг/кг почвы – $4-5 \pm 1,2$.

Показатели LD₅₀ были выявлены для культуры *Pseudomonas* только при 4-кратном увеличении дозы вносимого Cd, можно сказать, что эти бактерии больше устойчивы, нежели чувствительны к этому ТМ: для *Bacillus*

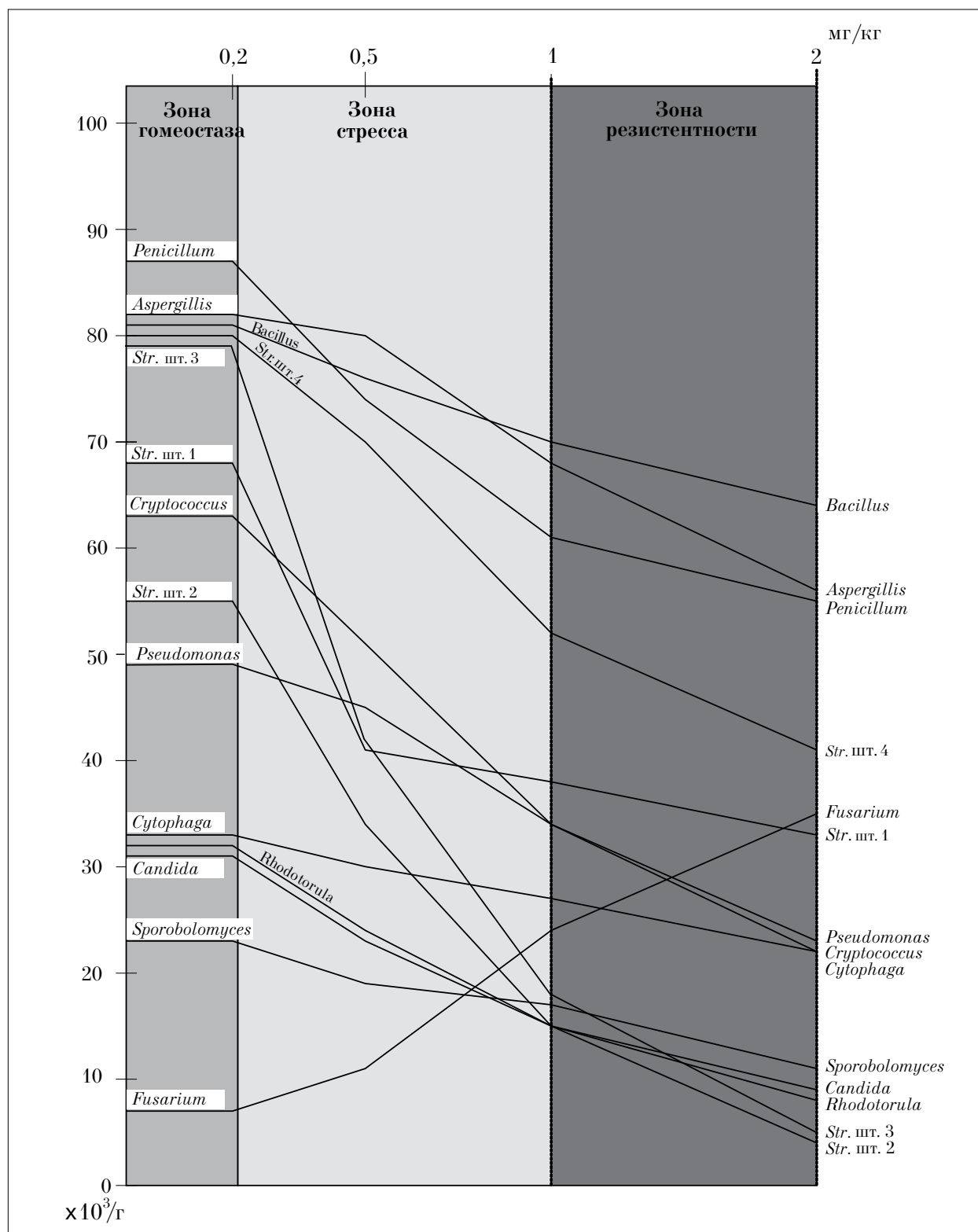


Рис. 3. Изменение структуры микробного сообщества при возрастающих концентрациях Cd (CH₃COO)₂·7H₂O в урбанизированных почвенных образцах (по оси ординат – численность микроорганизмов, тыс./г)

и *Cytophaga* среднесмертельных и биоцидных концентраций Cd не отмечено. Следовательно, большинство бактериальных культур проявили большую устойчивость к Cd, кроме *Pseudomonas*.

Таким образом, присутствие Cd в исследуемых концентрациях привело к 100-процентному угнетению численности при максимальной дозе этого металла у двух культур дрожжей (*Rhodotorula* и *Candida*) и у двух культур актиномицетов – *Streptomyces*, шт. 2, и *Streptomyces*, шт. 3. Наибольшей степенью толерантности к Cd обладали грибные культуры и спорообразующие бактерии *Bacillus*. Средняя чувствительность или толерантность наблюдалась у *Streptomyces*, шт. 4, *Streptomyces*, шт. 1, из актиномицетов, из дрожжей – у *Cryptococcus*, из бактерий – у *Pseudomonas* и *Cytophaga*.

На ниже представленной синэкологической диаграмме (аналогично исследованиям Г. А. Евдокимовой [5]) показаны изменения, происходящие с модельным микробным сообществом урбаноэмов при возрастании в них содержания $Cd(CH_3COO)_2 \cdot 7H_2O$. Наблюдалась большая зона стресса для всего микробного сообщества, кроме представителей грибных культур, спорообразующих бактерий р. *Bacillus* (их угнетение было небольшим – 22%). Произошло выпадение основных групп микроорганизмов: в зоне резистентности оказались дрожжи *Candida* и *Rhodotorula*, из актиномицетов *Streptomyces*, шт. 3, и *Streptomyces*, шт. 2; остальные культуры при максимальной концентрации Cd остались в зоне стресса (рис. 3).

Таким образом, в модельных экспериментах установлена большая зона стресса для всего микробного сообщества, кроме представителей грибных культур и спорообразующих бактерий *Bacillus*; при значительном увеличении доз вносимого ацетата Cd в почвенные образцы произошло выпадение основных групп микроорганизмов, и в зоне резистентности остались только микромицеты и *Cytophaga*.

Величина зоны гомеостаза является важным показателем, количественно отражающим степень устойчивости почвенной микробиоты к ТМ: фоновая почва характеризо-

валась максимумом устойчивости, урбаноэмы – минимумом.

Выводы:

1. Самый низкий уровень загрязнения микробиологическим путём не обнаруживался, соответствовал величине зоны гомеостаза незагрязнённой почвы, но определялся химическими методами по превышению фоновых концентраций ТМ.

2. Средний уровень загрязнения показал отсутствие перераспределения членов микробного сообщества при 2-кратной концентрации $Cd(CH_3COO)_2 \cdot 7H_2O$, но выявлено сокращение видового разнообразия комплекса микроорганизмов, увеличение доли токсинобразующих форм.

3. Высокий уровень загрязнения наблюдался при снижении микробиологической активности, появлении резистентных или токсичных форм микроорганизмов.

4. Наблюдаемые изменения структуры микробиоценозов показывают, что степень загрязнения почв солями Cd можно оценивать по микробиологическим показателям с помощью чувствительных и устойчивых видов микроорганизмов, что важно для разработки основ биологического мониторинга окружающей среды. Полученные результаты дополнили представления о влиянии ТМ на структуру микробных сообществ почвенных образцов урбанизированных территорий, а также указали на перспективность некоторых показателей.

Литература

1. Бабьева И.П., Левин С.В., Решетова Н.С. Изменение численности микроорганизмов в почвах при загрязнении тяжёлыми металлами // Тяжёлые металлы в окружающей среде. М.: Изд-во МГУ, 1980. С. 115–120.
2. Методы почвенной микробиологии и биохимии // Под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд-во МГУ, 1991. 303 с.
3. Краткий определитель бактерий Берги / Под ред. Дж. Хуэт М.: Изд-во Мир, 1980. 495 с.
4. Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А. и др. Определитель актиномицетов. Роды *Streptomyces*, *Streptovorticillium*, *Chainia*. М.: Изд-во Мир, 1983. 248 с.
5. Евдокимова Г.А. Микробный компонент природных и технических систем Севера // Геоэкология. 2002. № 3. С. 237–242.