

МИКРОБНАЯ БИОИНДИКАЦИЯ ПОЧВ Г. АЛМАТЫ С ПОМОЩЬЮ КУЛЬТУРЫ AZOTOBACTER

¹Мынбаева Б.Н., ²Курманбаев А.А., ³Воронова Н.В.

¹Казахский национальный педагогический университет им. Абая, Алматы,

e-mail: bmynbayeva@gmail.com;

²Институт микробиологии и вирусологии МОН РК, Алматы, e-mail: aseke58@gmail.com;

³Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, e-mail: slovonine@mail.ru

Содержание Cd, Cu, Pb и Zn в урбанизированных почвенных образцах, взятых около интенсивных транспортных магистралей и ТЭЦ-1, превышало контроль в 4,2 раза, 2,5, 2,6 и 1,5 соответственно. Токсичность городских почв, загрязненных тяжелыми металлами, была установлена по уменьшению количества КОЕ культуры *Azotobacter* и среднего диаметра выросших колоний культуры, а также по увеличению индекса токсичности. Выявлена последовательность токсичности тяжелых металлов для *Azotobacter*: Cd > Pb > Cu > Zn. В модельных опытах по среднесмертельному показателю LD50 была подтверждена токсичность урбаноземов. Таким образом, установлено, что культура свободноживущих бактерий *Azotobacter* чувствительна к содержанию тяжелых металлов в почве и изменение численности КОЕ и диаметра колоний можно использовать для индикации загрязнения городских почв.

Ключевые слова: индикаторная культура *Azotobacter*, тяжелые металлы, токсичность городских почв

MICROBIAL BIOINDICATION OF ALMATY CITY'S SOILS BY THE AZOTOBACTER CULTURE

¹Mynbayeva B.N., ²Kurmanbayev A.A., ³Voronova N.V.

¹Kazakh National Pedagogical University, Almaty, bmynbayeva@gmail.com;

²Institute of microbiology and virology, Almaty, e-mail: aseke58@gmail.com;

³Kazakh National Pedagogical University, Almaty, e-mail: slovonine@mail.ru

The most toxic was urbanized soil taken near intensive highways and TEP-1: Cd content the maximum exceeded control in 4,2 times, excess of Cu, Pb and Zn was 2,5; 2,6 and 1,5 respectively. We found an inverse relationship between the content of heavy metals (HMs) in Almaty city's soil samples and the number of *Azotobacter* colonies in them; it was confirmed with 2 other indicators – average diameter of grown culture colonies and an index of toxicity (IT). Identified a sequence of HMs toxicity: Cd > Pb > Cu > Zn. Based on the model experiments was defined medianicide index LD50. Thus, it was detected sensitivity of the free-living nitrogen-fixing bacteria *Azotobacter* culture to the content of heavy metals in soils, and the change in the number of CFU and the diameter of the column can be used for indication of soil pollution.

Keywords: the indicator *Azotobacter* culture, heavy metals, toxicity of the urban soils

Общеизвестно, что тяжелые металлы (ТМ) приводят к изменениям физических и химических свойств почв, в значительной мере влияют на почвенный микробоценоз и биохимические процессы. Бактерии рода *Azotobacter* традиционно используются как индикаторы химического загрязнения почвы [1].

Целью данной работы являлось изучение возможности применения свободноживущих азотфиксирующих бактерий *Azotobacter* для оценки состояния загрязненных тяжелыми металлами почв г. Алматы.

Материалы и методы исследования

Объектом исследований выбраны образцы светло-каштановых почв г. Алматы, отобранные в 3 точках территории города вдоль пр. Райымбека в широтном направлении на пересечении главных автомагистралей (транспортные), а также район ТЭЦ-1 (промышленный); для контроля (фон) был выбран участок за городом – в том же широтном направлении на запад (25 км за городской чертой и в 1 км от

трассы). Места отбора почвенных проб обозначены следующим образом: т. 1 – пр. Райымбека (пересечение с ул. Пушкина); т. 2 – пр. Райымбека (пересечение с пр. Сейфуллина); т. 3 – пр. Райымбека (пересечение с ул. Розыбакиева); т. 4 – район ТЭЦ-1; т. 5 – 25 км от города (фон или контроль) и показаны на рис. 1.

Согласно общепринятой методике отбора проб для проведения почвенного мониторинга [2] образцы почв были взяты на глубине 0–25 см методом «конверта» (в 5 повторностях).

Для микробиологических исследований отбор проб производился стерильными инструментами в стерильные пакеты.

Обилие азотфиксирующих бактерий рода *Azotobacter* учитывали методом комочков обрастания на агаризованной безазотной среде Эшби [2] с подсчетом КОЕ. Индекс токсичности рассчитывали по Р.Р. Кабирову, Р.Х. Хазиповой [3].

Подготовку проб для определения ТМ (Pb, Cd, Cu и Zn) проводили по методике выполнения измерений массовой доли кислоторастворимых форм металлов [4]. Содержание ТМ определяли на атомно-абсорбционном спектрометре с электротермической атомизацией AA-6650 фирмы «Shimadzu» [5].

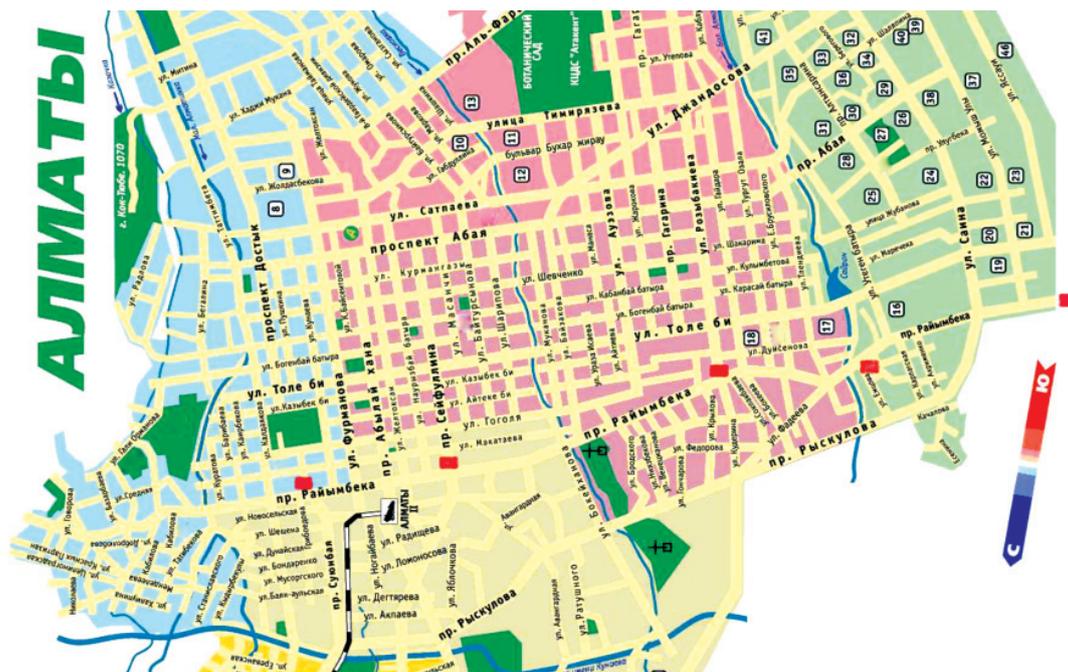


Рис. 1. Расположение участков отбора почвенных проб на карте г. Алматы (красные квадраты)

Результаты исследования и их обсуждение

Известно, что в городских почвах накапливаются разнообразные соединения естественного и антропогенного происхождения, обуславливающие загрязненность урбаноэзов. Основные их загрязнители – ТМ, присутствие которых связано с токсичностью почв, а их количество – со степенью токсичности.

Изучение содержания ТМ в почвенных образцах г. Алматы показало, что перекрестки с интенсивным транспортным движением имели полиметаллическое (Cd, Pb, Cu, Zn) загрязнение, но их содержание варьировало в зависимости от места отбора. Содержание Cd во всех опытных образцах превышало контроль (максимальное превы-

шение составило примерно 4,2 раза в т. 3). В этой же точке отбора почвенные образцы имели повышенное содержание Cu (превышение по сравнению с контролем составило 2,5 раза); превышение по Pb и Zn – 2,6 и 1,5 раза соответственно. Таким образом, почвенные образцы из т. 3, (позже подтвержденные как токсичные по результатам экспериментов с культурой Azotobacter), содержали наибольшее количество ТМ (кроме Pb). Анализ содержания ТМ в почвенных образцах т. 4 показал максимальное превышение концентрации Pb по сравнению с контролем в 3,2 раза, содержание остальных ТМ было также значительным и превышение составило: Cd – 2,6, Cu – 2,0, Zn – 1,5 раза (табл. 1).

Таблица 1

Содержание тяжелых металлов в почвенных образцах

Место отбора почвенных проб	Концентрация кислоторастворимых форм тяжелых металлов, мг/кг			
	Cd	Pb	Cu	Zn
Т. 1	0,51 ± 0,012	44,8 ± 0,265	36,4 ± 0,265	59,6 ± 0,153
Т. 2	0,39 ± 0,015	42,1 ± 0,436	43,7 ± 0,208	59,2 ± 0,208
Т. 3	0,67 ± 0,015	50,5 ± 0,306	52,7 ± 0,252	59,7 ± 0,231
Т. 4	0,41 ± 0,015	63,8 ± 0,153	42,8 ± 0,306	60,7 ± 0,208
Т. 5	0,16 ± 0,015	19,8 ± 0,208	21,5 ± 0,265	41,3 ± 0,351

Для оценки степени химического загрязнения почв был использован коэффициент опасности (K_0), который показывал,

во сколько раз содержание элемента-эко-поллютанта в почвенной пробе выше его ПДК. Наибольшие значения K_0 отмечены

для Pb – от 1,3 до 2,0, Cd – около 1,3 и Cu – от 1,0 до 1,6.

В большом количестве КОЕ бактериальной культуры *Azotobacter* выросли из почвенных образцов степной зоны (25 км от города) и в некоторых нейтральных и слабощелочных почвах г. Алматы (т. 1).

В настоящем исследовании интегральный показатель биологического состояния почвы был рассчитан по следующим параметрам: обилие КОЕ бактерий рода *Azotobacter*, средний диаметр их колоний и индекс токсичности (ИТ).

Наибольшее значение ИТ имели пробы почв, взятых на интенсивном транспортном

перекрестке (т. 3), число КОЕ *Azotobacter* и средний диаметр колоний в них минимальные, т.о. эту почву можно отнести к токсичной. Почвенный образец возле ТЭЦ-1 находился на 2-м месте по токсичности (т. 4). Изучение состояния почвенных образцов из 2 других магистралей (т. 1 и т. 2) показало, что показатели токсичности, количество КОЕ *Azotobacter* и их диаметр были близки между собой и соответствовали категории «среднетоксичных» почв. В контрольном варианте (степная зона за городом) по всем 3 показателям выявлены значения, свидетельствующие о благополучии в почвенных образцах (табл. 2).

Таблица 2

Некоторые параметры роста и развития культуры *Azotobacter* в анализируемых почвенных образцах

Место отбора почвенных проб	Средний диаметр колоний <i>Azotobacter</i> , (см)	Среднее число КОЕ <i>Azotobacter</i> в 1 г почвы	Индекс токсичности (ИТ)
Т. 1	0,61 ± 0,12	124,1 ± 25,7	0,70 среднетоксичная
Т. 2	0,57 ± 0,10	120,8 ± 24,2	0,67 среднетоксичная
Т. 3	0,39 ± 0,08	84,6 ± 15,9	0,46 токсичная почва
Т. 4	0,46 ± 0,09	102,5 ± 19,4	0,55 близкая к токсичной
Т. 5	0,73 ± 0,14	157,5 ± 30,6	Почва стимулирующая

Таким образом, азотфиксирующая культура *Azotobacter* произрастала в анализируемых почвах по-разному, наблюдались различия в скорости роста, количестве колоний и их диаметре; выявлена зависимость между показателями роста и развития данной тест-культуры и содержанием ТМ в почвенных образцах.

Результаты посевов показали зависимость количества КОЕ *Azotobacter* от концентрации ТМ в почвенных образцах: в урбанизированных, сильно загрязненных ТМ, наблюдалось максимальное их снижение. По степени токсичности Cd и Pb явились самыми токсичными металлами из исследуемых, о чем свидетельствовало то, что ингибирующее действие ТМ на бактерии рода *Azotobacter* проявилось весьма значительно в почвенных образцах, взятых в т. 3 (наибольшее содержание Cd = 0,67 мг/кг) и т. 4 (наибольшее содержание Pb = 63,8 мг/кг) (рис. 2).

Следовательно, рост колоний *Azotobacter* на среде Эшби составил 53,7% из почвенных образцов т. 3 и 65,1% – из образцов почвы, взятых в т. 4, очевидна коррелятивная связь между высокими концентрациями Cd

и Pb в этих пробах и количеством колоний *Azotobacter* (почти на 40–50% меньше, чем в почвенных пробах за городом). Среднее значение загрязнений почв по Pb г. Алматы (т. 1 и 2) показало уменьшение числа КОЕ *Azotobacter* примерно на 25%. Содержание Cu и Zn также оказало определенное ингибирующее воздействие на микробиоту почв по сравнению с контролем. Таким образом, установлена последовательность токсич-

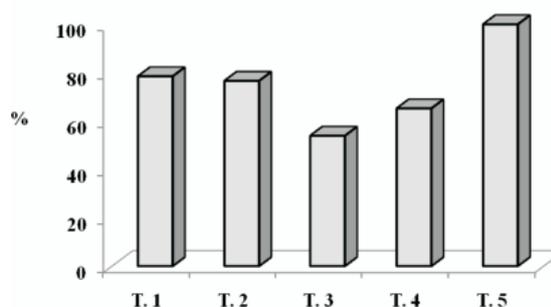


Рис. 2. Изменение численности *Azotobacter* (в %) при ингибирующем воздействии ТМ

ности тяжелых металлов для *Azotobacter* в почвах г. Алматы: $Cd > Pb > Cu > Zn$.

В модельных экспериментах в почвенные образцы вносили растворы солей металлов в следующих вариантах:

1. $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4$, $CdSO_4$ и $ZnSO_4$ в концентрациях, в 2 раза превышавших контрольные.

2. $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4$, $CdSO_4$ и $ZnSO_4$ в концентрациях, в 5 раз превышавших контрольные.

3. $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4$, $CdSO_4$ и $ZnSO_4$ в концентрациях, в 10 раз превышавших контрольные.

4. Контролем служили естественные урбаноземы, содержавшие определенную концентрацию ТМ (см. табл. 1). Почвенные

модельные образцы с внесенными растворами ТМ инкубировали в эксикаторах (60% от ПВ, температура 25 °С).

Все исследованные показатели роста и развития культуры *Azotobacter* (количество КОЕ, средний диаметр колоний и ИТ) снижали свои значения при загрязнении почвы ТМ (табл. 3).

На основании проведенных модельных экспериментов для определения токсичности городских почв можно ввести еще 2 экологических показателя, характеризующих зависимость численности популяции *Azotobacter* от концентрации ТМ в почвенных образцах: среднесмертельный показатель LD_{50} и биоцидный показатель LD_{100} .

Таблица 3

Экологические характеристики развития культуры *Azotobacter* в модельном эксперименте

Вариант модельного опыта	Средний диаметр колоний <i>Azotobacter</i> , (см)	Индекс токсичности (ИТ)	Среднее число КОЕ <i>Azotobacter</i> в 1 г почвы
1	0,36	0,43	78,2
2	0,16	0,24	51,7
3	0,07	0,11	8,4
Контроль	0,50	0,60	108,0

Среднесмертельный показатель LD_{50} наблюдали при концентрациях ТМ, соответствовавших варианту 2 модельного эксперимента. Летальная доза ТМ LD_{100} для бактерий *Azotobacter* в данном опыте не выявлена.

Таким образом, нами установлена загрязненность почв г. Алматы тяжелыми металлами (Pb, Cd, Cu, Zn). Для определения степени загрязнения были использованы химические показатели – ПДК и K_o , а также биоиндикатор *Azotobacter*, определенные биологические показатели роста и развития которого можно применить для диагностики полиметаллического загрязнения почв г. Алматы.

Список литературы

1. Gulyas F. et al. Analysis of soil Toxicity using *Azotobacter* by soil disk method // Proc. World: Abst. Conf. (Amsterdam, Oct. 25-31, 1987). – Amsterdam, 1988. – P. 753–755.
 2. ГОСТ 17.4.3.01-83. Общие требования к отбору проб. (СГ СЭВ 3347-82). – М., 1983. – 44 с.

3. Кабиров Р.Р., Хазипова Р.Х. Альгологический метод оценки токсичности ПАВ // Биоиндикация и биомониторинг. – М.: Наука, 1991. – С. 282–285.
 4. ГОСТ 28168-89. Общие требования к отбору проб. – М., 1989. – 52 с.
 5. РД 52.18.269-90. Методика выполнения измерения массовой доли подвижных форм металлов. – М.: Госкомитет СССР по «Гидрометеорологии», 1990. – 35 с.
 6. Lewis I. M. The cytology of bacteria // Bacteriological Reviews. – 1991. – Vol. 5, № 3. – P. 181–230.
 7. Ahmad F., Ahmad I., Khan M. S. Indole Acetic Acid Production by the Indigenous Isolates of *Azotobacter* and Fluorescent *Pseudomonas* in the Presence and Absence of Tryptophan // Turkish J. Biol. – 2005. – № 29. – P. 29–34.

Рецензенты:

Тулемисова Ж.К., д.б.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Казахского национального аграрного университета, г. Алматы;

Козыбаева Ф.Е., д.б.н., профессор, ГНС отдела экологии почв Ордена Трудового Красного знамени Казахский научно-исследовательский институт почвоведения и агрохимии имени У.У. Успанова (МСХ АО «КазАгроИнновация»), г. Алматы.