

УДК: 631.4

# ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РЕАКЦИЯ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ПОЧВЫ КАК ИНДИКАТОР ЗАГРЯЗНЕНИЯ СТОЙКИМИ ОРГАНИЧЕСКИМИ ЗАГРЯЗНИТЕЛЯМИ

С.А. Марченко, П.А. Кожевин,

Реализация обществом концепции устойчивого развития — обеспечение его здоровья, благополучия, продовольственной и экологической безопасности (но не в ущерб будущим поколениям!). Концепция предполагает необходимость гармонизации взаимоотношений человека с природой, поддержание здоровья среды и почвы — главного и незаменимого компонента агросферы и земной биосферы [6]. Именно продукционные, барьерные, трансформационные, антибиотические и самоочищающие функции почвы определяют качество жизни самого человека, жизнедеятельность и продуктивность биоты наземных экосистем. Антропогенная деградация почвенного покрова уже приводит его в состояние, непригодное для жизнедеятельности. Здоровье почвы (Soil Health) — «...это ее способность в течение длительного времени функционировать в качестве компонента наземной экосистемы, обеспечивая ее биопродуктивность и поддерживая качество воды и воздуха, а также здоровье растений, животных и человека» [9].

Состояние здоровья почвы на государственном уровне должно контролироваться в системе агроэкологического и фитосанитарного мониторинга, использующего в качестве инструментальной базы, наряду с инструментальными методами, и систему экологических индикаторов (рис.). Экологические индикаторы позволяют оценивать реакцию на стрессоры самого первого, биогеоценозического уровня экосистемы — ее микробопедоценоза. Его ответный отклик и последствия дифференцируют как допустимые (гомеостатические), пороговые (стрессовые, предпатогенные), резистентные и необратимые (репрессивно-патологические).

Важная роль в формировании «здоровья почвы» принадлежит микробному сообществу, обеспечивающему функционирование биогеохимических процессов и самоочищение почвы [4]. Микробоценоз — основной компонент почвенной биоты и важнейший объект агроэкологического мониторинга. Его состояние — объективный экологический индикатор функционирования педоценоза, отклика на загрязнение и другие стрессоры. В числе фактологических и функциональных критериев состояния почвенного микробоценоза традиционно используют численность отдельных видов микроорганизмов, их биомассу, базальное дыхание, микробный метаболический коэффициент. Предпринимаются попытки использования и других объективных характеристик функционирования микробопедоценоза [5].

Цель настоящей работы заключалась в оценке состояния здоровья длительно загрязненной почвы с использованием традиционных и новых критериев, таких, как функциональное разнообразие [3] и индуцированная толерантность микробного сообщества (так называемый РИСТ-эффект — Pollution Induced Community Tolerance). Данные об их применении для оценки здоровья и качества почвы, загрязненной стойкими органическими загрязнителями (СОЗ), в литературе отсутствуют.

Объектами исследования служили: подзолистая почва Электроугльской техногенной углеводородной геохимической аномалии подмосковной Мещеры, загрязненная полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ), и дерново-подзолистая почва на территории завода «Конденсатор» (Московская обл., Серпуховской р-н) в различной

степени контаминированная полихлорированными бифенилами (ПХБ). Образцы почвы отбирали из верхнего горизонта (0–20 см) не менее чем в 5 точках. Почву высушивали в отсутствие света, усредняли, измельчали, просеивали через сито размером 2 мм и хранили в аэрируемых бумажных пакетах при 8°C до использования в экспериментах.

Электроугльская техногенная углеводородная аномалия расположена в междуречье рек Москвы и Клязьмы и приурочена к промышленному узлу (завод «Электроугли»), где несколько промышленных предприятий ежегодно выбрасывают около 10 т ПАУ. Южная часть г. Серпухова, где располагается завод «Конденсатор», является зоной экологического риска. В течение 30 лет при производстве трансформаторов здесь использовали препараты на основе ПХБ. В жилом районе вблизи завода, по данным Центра Госсанэпиднадзора, отмечены повышенная онкозаболеваемость, отставание в росте и развитии у детей, а также аллергические заболевания. Исследуемые почвы бедны доступными растениям биофильными элементами (табл. 1).

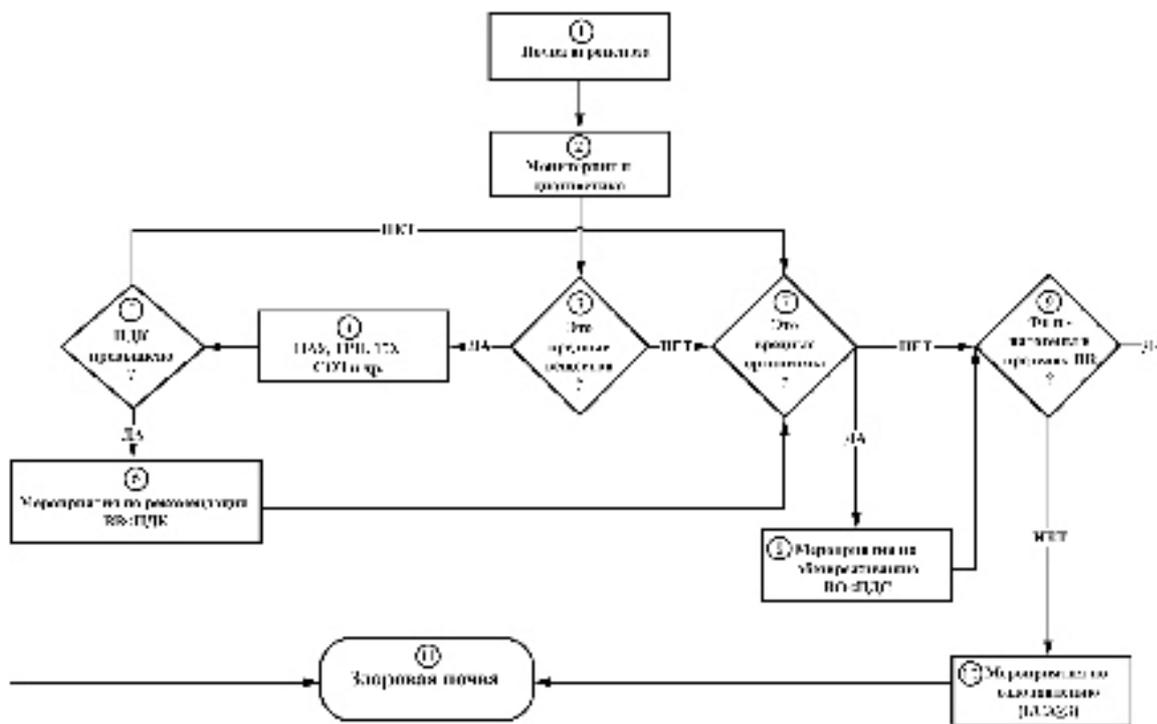
Концентрацию ПАУ и ПХБ в образцах почвы определяли газохроматографически. Содержание  $C_{орг}$ ,  $pH_{вод}$ , доступных Р и К, суммы обменных оснований определяли в соответствии с руководством [2].

Индукцированную загрязнителем толерантность микробного

**Таблица 1. Характеристика почвы опытных участков по градиенту загрязнения**

Концентрация CO <sub>2</sub> , мг/кг	C <sub>орг</sub> , %	pH <sub>вод</sub>	Сумма обменных оснований, мг-экв/100 г почвы	Содержание, мг/100 г почвы	
				P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O
Почва, загрязненная ПАУ					
0 (контроль)	1,71	4,90	7,0	5,4	8,7
67	1,83	4,87	7,0	6,0	7,6
146	1,90	5,12	6,6	6,5	7,2
866	1,81	5,26	5,7	4,5	6,9
3248	1,99	5,54	4,5	4,2	7,0
Почва, загрязненная ПХБ					
0 (контроль)	1,61	5,20	6,6	6,7	9,3
32	1,70	5,10	6,4	6,6	9,0
50	16,1	5,32	5,8	6,2	8,6
120	14,1	5,42	5,4	5,4	8,0
500	17,0	5,57	4,2	4,6	6,9

сообщества почвы оценивали методом мультисубстратреспирометрического тестирования (МСР-метод) по ингибированию дыхательной активности незагрязненной (контроль) и загрязненной почвы в градиенте концентраций поллютанта. Эксперименты проводили в 24-луночных планшетах. В каждую ячейку (лунку) добавляли стандартный углеводный субстрат (источник углерода) в концентрации 1% от массы (1,5 г) почвы. В ячейки вводили также последовательно увеличивающееся количество эталонного поллютанта (фенантрен



**Мероприятия по оздоровлению почвы агроценоза (принципиальная схема на примере патосистемы пшеница – *Bipolaris sorokiniana*)**

**ВВ** – вредные вещества, **ВО** – вредные организмы, **КСА** – коэффициент супрессивной активности, **ПАУ** – полициклические ароматические углеводороды, **ПВ** – порог вредоносности (10–60 конидий/г), **СОЗ** – стойкие органические загрязнители, **ТРН** – техногенные радионуклиды, **ТЭ** – токсичные элементы

для — ПАУ, арохлор 1242 — для ПХБ) для создания концен-трационного градиента СО<sub>2</sub>. Интенсивность эмиссии СО<sub>2</sub> количественно оценивали фотометрией гелевой индикаторной тест-системы [8]. Для этого крышку планшета заливали агаровым гелем, содержащим бромкрезоловый пурпуровый в фосфатном буферном растворе. После увлажнения почвы до 60% от полной влагоемкости (ПВ) ячейки планшета герметично закрывали крышкой и инкубировали при 22°C в течение 8 ч. Эксперименты ставили не менее чем в 4 повторнос-тях. Эффективные дозы загрязняющего вещества (ЭД<sub>50</sub>) для микробного комплекса чистой и загрязненной почвы рассчитывали методом линейного регрессионного анализа. Индуцированную толерантность микробного сообщества (РИСТ-эффект) определяли как отношение полуэффективных доз эталонного поллютанта для загрязненной и изначально чистой почвы:  $ЭД_{50\text{ заг. п.}} / ЭД_{50\text{ чист. п.}}$

Микробную биомассу почвы определяли путем пересчета скорости субстрат-индуцированного дыхания по формуле:  $C_{\text{мик}} \text{ мкг/г почвы} = (CO_2, \text{ мкл/г почвы} \cdot \text{ч}) \cdot 40,04 + 0,37$  (1)

Субстрат-индуцированное дыхание в образцах почвы определяли после обогащения ее дополнительным источ-ником углерода и энергии — глюкозой. Базальное дыхание (БД, мкг С<sub>СО<sub>2</sub></sub>/г•ч) рассчитывали по скорости эмиссии СО<sub>2</sub> почвой за 10 ч ее инкубации при 22°C и 60% от ПВ.

Микробный метаболический коэффициент (ММК) рас-считывали как отношение скорости базального дыхания к микробной биомассе [1]:

$$\text{ММК} = \text{БД} / C_{\text{мик}}, \text{ мкг С}_{\text{СО}_2} / \text{г} \cdot \text{ч} \cdot C_{\text{мик}}, \text{ мг} \quad (2)$$

Функциональное разнообразие микробных сообществ опре-деляли МСР-методом по спектрам потребления источников углерода. Индекс Шеннона (H) рассчитывали по формуле:

$$(3),$$

где

$p_i$  — отношение оптической плотности геля над каждой лункой к сумме оптических плотностей геля над всеми лунками,

$n$  — общее число источников углерода [7].

Индекс Симпсона рассчитывали по формуле:

$$H = \frac{1}{\sum_{i=1}^n p_i^2}$$

где

$$(5),$$

где

$m_i$  — скорректированная оптическая плотность геля над  $i$ -той лункой,  
 $M$  — сумма оптических плотностей геля над всеми лун-ками,  
 $N$  — общее число источников углерода.

Как оказалось (табл. 2), длительное загрязнение почвы СОЗ во всех случаях достоверно снижает ее микробную биомассу. Так, при максимально исследованных уровнях загрязнения почвы ПАУ (3248 мг/кг) и ПХБ (500 мг/кг) микробная биомасса в сравнении с контролем снизилась соответственно в 1,9 и 1,7 раза. Показатель  $C_{\text{мик}} / C_{\text{орг}}$  (т.е. доля микробной биомассы, ДМБ) также снизилась в вари-антах с повышенным содержанием ксенобиотиков. Известно, что в относительно сбалансированных экосистемах ДМБ составляет примерно 2%. Отклонение ДМБ от базово-го значения может указывать на стрессовое состояние экосистемы по содержанию доступного микроорганизмам органического вещества. В наиболее загрязненной СОЗ почве ДМБ снизилась почти в 2 раза.

Противоположная тенденция наблюдалась для БД и ММК. Поскольку БД и ММК взаимосвязаны и наблюдаемые для них тенденции подобны, рассмотрим варьирование ММК. Именно этот показатель характеризует основной обмен (энергию поддержания) микробного сообщества почвы. В стрессовой ситуации под действием СОЗ энергия поддержания почвен-ного микробного комплекса возрастает и значения ММК увеличиваются с 1,72–1,82 в контроле до 5,60–6,19 мкг С<sub>СО<sub>2</sub></sub> /г•С<sub>мик</sub>, мг в почве наиболее загрязненных участков.

Оценка функционального разнообразия микробного сооб-

**Таблица 2. Действие СОЗ на микробное сообщество почвы**

Концентрация СОЗ, мг/кг почвы	С <sub>мик.</sub> <sup>1</sup> , мкг С/г	ДМБ, %	БД, мкг С <sub>СО2</sub> /г·ч	ММК, мкг С <sub>СО2</sub> /ч·С <sub>мик.</sub> <sup>1</sup> МГ	Индекс Шеннона	Индекс Симпсона	Количество субстратов: потребленных/исследованных	РІСТ-эффект
Почва, загрязненная ПАУ								
0 (контроль)	362±38	2,1±0,3	0,66±0,05	1,82±0,16	4,12±0,14	0,68±0,05	23/31	1,0±0,12
67	338±41	1,9±0,2	0,69±0,12	2,10±0,17	3,73±0,14	0,62±0,04	22/31	1,31±0,15
146	323±29	1,7±0,2	0,78±0,10	2,40±0,21	3,42±0,17	0,54±0,06	19/31	1,63±0,17
866	287±26	1,7±0,2	1,06±0,08	3,70±0,29	3,31±0,14	0,43±0,06	16/31	2,42±0,21
3248	192±21	1,0±0,2	1,07±0,12	5,60±0,37	3,23±0,16	0,31±0,04	9/31	4,34±0,37
Почва, загрязненная ПХБ								
0 (контроль)	368±41	2,3±0,3	0,63±0,04	1,72±0,14	3,98±0,19	0,71±0,06	24/31	1,0±0,11
32	340±29	2,2±0,02	0,65±0,05	1,84±0,12	3,69±0,12	0,70±0,05	21/31	1,09±0,12
50	309±32	1,9±0,3	0,78±0,05	2,51±0,17	3,47±0,17	0,67±0,06	20/31	1,64±0,15
120	263±28	1,9±0,2	1,13±0,09	4,30±0,32	3,26±0,13	0,41±0,05	15/31	3,28±0,32
500	209±223	1,2±0,2	1,30±0,11	6,19±0,43	3,08±0,15	0,34±0,04	11/31	4,20±0,49

Примечание: доверительный интервал рассчитан с вероятностью 95%

щества почвы МСР-методом в гелевой индикаторной системе — модифицированных почвенных микрокосмах — позволила на основании полученных спектров потребления субстратов рассчитать индексы Шеннона и Симпсона (табл. 3).

**Таблица 3. Частные коэффициенты детерминации (R<sup>2</sup>) между микробиологическими индексами почвы и концентрацией СОЗ**

Поллютант	Смик	ДМБ	БД	ММК	Индекс Шеннона	Индекс Симпсона	Доля потребленных субстратов	РІСТ-эффект
ПАУ	0,957 <sup>a</sup>	0,881 <sup>a</sup>	0,623 <sup>b</sup>	0,966 <sup>a</sup>	0,818 <sup>a</sup>	0,804 <sup>b</sup>	0,917 <sup>a</sup>	0,879 <sup>a</sup>
ПХБ	0,807 <sup>a</sup>	0,920 <sup>a</sup>	0,753 <sup>b</sup>	0,877 <sup>a</sup>	0,857 <sup>a</sup>	0,706 <sup>b</sup>	0,800 <sup>a</sup>	0,779 <sup>a</sup>

a – уровень достоверности  $p < 0,05$ ;

b – уровень достоверности  $p < 0,1$

В целом, значение индекса разнообразия Шеннона обеспечивает получение более достоверных данных, чем индекса Симпсона. Менее загрязненной почве соответствуют большее значение индексов разнообразия и наоборот. По мере увеличения степени загрязнения почвы как ПАУ, так и ПХБ снижается количество потребляемых микробами субстратов с 23—24 в чистой почве до 9—11 в наиболее контаминированных образцах. Уменьшение разнообразия спектра потребляемых субстратов при длительном загрязнении почвы ведет к изменениям в круговороте веществ, составляющих пул доступного микроорганизмам углерода и характеризующих степень минерализации органического вещества педоценоза. При этом меняется не только структура микробного сообщества, но и в целом возрастает устойчивость к загрязнителю консорбиентов микробопедоценоза, т.е. вектор его отклика на стрессор направлен к состоянию «резистентность». Действительно, в почвах, длительно загрязненных ПАУ и ПХБ, с увеличением концентрации поллютантов соответственно возрастала и толерантность микробных сообществ (табл. 2): соотношение  $\text{ЭД}_{50 \text{ загр. п.}} / \text{ЭД}_{50 \text{ чист. п.}}$  увеличивалось в градиенте концентраций загрязнителя от 1 (в чистой почве) до 4,34 и 4,20 в вариантах, максимально загрязненных ПАУ и ПХБ соответственно.

Корреляционный анализ содержания ПАУ, ПХБ и микробиологических показателей (табл. 3) продемонстрировал наличие тесной связи между загрязнением почвы обоими поллютантами и активностью ее микробных сообществ. С вероятностью в 95% были значимы частные коэффициенты

детерминации (R<sup>2</sup>) между концентрацией поллютантов и микробными характеристиками почвы как традиционными (микробная биомасса, ДМБ, ММК), так и вновь используемыми — показатели индекса Шеннона и РІСТ-эффект.

Итак, с учетом как традиционных, так и предлагаемых критериев пороговым (предпатогенным) уровнем загрязнения почвы в случае ПАУ является интервал

концентраций 67÷148 мг/кг, для дерново-подзолистой в случае ПХБ — 32÷50 мг/кг, что существенно ниже. Наиболее чувствительным показателем оценки действия обсуждаемых стрессоров является индекс разнообразия Шеннона, согласно которому достоверное значение пороговых концентраций составляет для указанных поллютантов 67 и 32 мг/кг почвы соответственно. Показатель РІСТ-эффекта свидетельствует о присутствии в микробном пуле загрязненной почвы микроорганизмов-деструкторов поллютантов. Судя по полученным данным, их выделение в чистую культуру (для последующего производства биопрепаратов-деструкторов) целесообразно с участков, максимально загрязненных ксенобиотиками. Очевидно, поэтому критерии оценки здоровья и качества почвы должны базироваться не только на использовании традиционно применяемых характеристик микробопедоценоза, но и оцененных нами.

Таким образом, на примере изучения почв, длительно загрязненных стойкими органическими загрязнителями, продемонстрировано высокоэффективное использование экологических индикаторов состояния микробного сообщества почвы, таких, как показатели его функционального разнообразия и индуцированной толерантности в отношении поллютанта (индекс Шеннона и РІСТ-эффект). Метод гелевой индикаторной тест-системы в сочетании с мультисубстратреспирометрией в условиях модифицированной почвенной микроскопии позволяет быстро и с приемлемым уровнем относительной погрешности (9—12%) оценивать как традиционные, так и предлагаемые функциональные характеристики микробопедоценоза. Предлагаемые критерии и методические подходы перспективно использовать в интересах агроэкологического мониторинга для экспресс-оценки состояния «почвенного здоровья», при бонитировке почв сельскохозяйственных, селитебных и рекреационных территорий, а также для оперативного поиска высокоэффективных микроорганизмов — деструкторов СОЗ. 