

УДК 631.46:628.3

**ВЫБОР КРИТЕРИЕВ ДЛЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ НАГРУЗКИ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ
ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ
НА МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА ПОЧВЫ**

С.Ю. Селивановская, С.Н. Киямова, В.З. Латыпова

Аннотация

Изучен спектр ответных реакций микробного сообщества серой лесной почвы на внесение органических отходов, характеризующихся разным уровнем загрязнения. С использованием результатов корреляционного анализа обоснован выбор критериев, пригодных для экспериментального определения допустимой нагрузки многокомпонентных органических отходов на почвенные сообщества.

Введение

Увеличивающаяся информация о риске загрязнения почв различными токсикантами в совокупности с ужесточением законодательства в области охраны окружающей среды требует конкретизации методов биологической оценки почв, основанных на использовании эндогенной микрофлоры, которые позволяют выявить загрязнение на ранней стадии, осуществить мониторинг изменения состояния экосистем, а также оценить допустимую антропогенную нагрузку на почвенный биоценоз. В настоящее время оценка антропогенной нагрузки, в основном, базируется на расчете количества индивидуальных токсикантов. Такой подход не позволяет ни оценить негативный эффект смеси токсикантов, ни принять во внимание биодоступность токсичных веществ. В этом плане биологический анализ является альтернативой, поскольку представляет собой инструмент, позволяющий оценить эффекты биодоступной фракции взаимодействующих токсикантов в комплексной матрице окружающей среды [1]. К числу наиболее часто упоминаемых токсикантов относятся металлы, для которых во многих странах установлены предельные содержания в почвах [2, 3]. Почвы могут быть загрязнены металлами, поступающими из различных источников, одним из них является обработка почв осадками сточных вод. В последние годы увеличение объемов сточных вод, подлежащих очистке, существенно увеличило и количество образующихся органических отходов – осадков, что предопределило сложности в их утилизации [3–6].

Осадки сточных вод являются хорошим почвоулучшителем в сельском, лесном хозяйствах, при рекультивации почв, так как содержат большое количество органогенных элементов. Основной их недостаток – присутствие вредных металлов, а также большого количества органических токсикантов, которые могут подвергаться биоаккумуляции или вызывать почвенный токсикоз.

Поскольку в случае многокомпонентных образований, таких, как осадки, очевидна невозможность химического анализа всех их компонентов, равно как и в почве, обработанной ими, приоритет должен быть отдан биологическим методам анализа. Более того, ответная реакция сообществ организмов должна служить основой для установления допустимой нагрузки в отношении осадков сточных вод еще и потому, что осадки оказывают на почву двойственный эффект за счет одновременного внесения органического вещества и токсичных элементов.

В данном исследовании проведен скрининг критериев, характеризующих ответную реакцию почвенного микробного сообщества с целью выявления наиболее пригодных для экспериментального определения допустимой нагрузки многокомпонентных органических отходов на почвенные сообщества.

1. Материалы и методы исследования

В лабораторных экспериментах использовали модельные образцы осадков сточных вод, основу которых составил реальный осадок станции очистки г. Казани. После определения компонентного состава реального осадка в него были добавлены в виде растворимых солей металлы (Hg, Cd, Ni, Pb, Cr, Cu, Mn, Zn и As) с таким расчетом, чтобы их содержание достигло предусмотренного СанПиН 2.1.7.573-96, а также превышало его в 5, 10 и 20 раз в результате были получены образцы ОСВ₁, ОСВ₅, ОСВ₁₀ и ОСВ₂₀. После инкубирования образцов осадков в течение месяца в термостате при температуре 28°C осадки вносили в почву в соотношении 1:150 и помещали в стеклянные инкубационные сосуды, вмещающие 1 кг смеси. Смесь инкубировали в течение 30 суток при 28°C в темноте. В итоге было получено четыре образца почвы с внесенными осадками сточных вод (П₁, П₅, П₁₀ и П₂₀), а также контрольный образец, в который осадок не вносили (П_к). Характеристика образцов представлена в табл. 1. Анализ образцов осуществляли на 30-е сутки инкубации.

Измерение углерода микробной биомассы проводили экстракционно-фу-мигационным методом [7]. Измерение интенсивности дыхания небогащенной почвы (V_{basal}) определяли по выделению CO_2 , который улавливали щелочью [8]. Метаболический коэффициент ($q\text{CO}_2$) рассчитывали как отношение дыхания небогащенной почвы V_{basal} к уровню микробной биомассы [9]. Определение потенциальной активности азотфиксации осуществляли ацетиленовым методом [10]. Дегидрогеназную активность почвы определяли методом Ленарда в модификации Колешко [11]. Протеолитическую активность почвы определяли методом Галстяна и Арутюняна [11]. Уреазную активность почвы определяли методом Галстяна [11]. Интенсивность разложения целлюлозы определяли по убыли веса хлопчатобумажного полотна [10].

Численность микроорганизмов различных групп определяли методом посева на плотные питательные среды: мясо-пептонный агар – МПА (гетеротрофные бактерии), крахмало-аммиачный агар – КАА (стрептомицеты), среда Чапека (микромикробы), почвенный агар – ПА (автохтонные микроорганизмы) [10]. Содержание в почве бактерий рода *Azotobacter* определяли методом комочков обрастания на среде Эшби [12].

Табл. 1

Характеристика образцов серой лесной почвы после внесения модельных осадков сточных вод и контрольного образца

Показатель	Образец				
	П _к	П ₁	П ₅	П ₁₀	П ₂₀
С _{орг.} , %	0.8 ± 0.12	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.14	1.0 ± 0.1
pH, H ₂ O	7.1 ± 0.05	7.1 ± 0.1	7.0 ± 0.1	7.05 ± 0.1	6.9 ± 0.05
Содержание металла, мг/кг сухого вещества					
Zn	30 ± 7	51 ± 9	125 ± 22	284 ± 74	520 ± 124
Cd	0.2 ± 0.03	0.3 ± 0.08	1.4 ± 0.12	2.4 ± 0.6	6 ± 1.1
Pb	11 ± 3	12 ± 2	40 ± 8	65 ± 12	120 ± 28
Hg	0.06 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.4 ± 0.05	0.9 ± 0.04	1.8 ± 0.2
Cu	25 ± 4	42 ± 7	75 ± 18	95 ± 21	185 ± 55
Ni	13 ± 4	12 ± 4	28 ± 6	32 ± 8	78 ± 16
As	1.6 ± 0.2	1.7 ± 0.3	2.1 ± 0.3	2.8 ± 0.5	4 ± 0.8
Cr	51 ± 11	59 ± 13	113 ± 22	130 ± 29	140 ± 33
Mn	140 ± 28	150 ± 29	290 ± 61	310 ± 78	460 ± 114

Значения pH определяли потенциометрическим методом в водном (1:1) и солевом 1.0 М KCl (1:25) экстрактах. Содержание органического углерода определяли мокрым окислением 0.167 М K₂Cr₂O₇ с последующим титрованием 0.1М (NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O [13].

Валовое содержание металлов в почвах, осадках, отходах и растениях определяли после мокрого окисления образца концентрированной HNO₃ и 3% H₂O₂.

Измерение всех параметров проводили не менее чем в трехкратной повторности. Статистическую обработку результатов проводили с помощью электронных таблиц Excell и программы Origin 7.0. Достоверность различий полученных результатов оценивали с использованием коэффициента Стьюдента ($P < 0.05$). Взаимосвязь ряда факторов устанавливали посредством расчета коэффициента корреляции.

2. Результаты и обсуждение

Одним из основных показателей, характеризующих воздействие антропогенных факторов на микробные сообщества, является углерод микробной биомассы (С_{микр}) [2, 14–16]. В используемой нами серой лесной почве (контрольный вариант) запасы общей микробной биомассы составили 0.74–0.83 мгС/г (табл. 2). На 30 сутки исследования микробная биомасса в вариантах П₁, П₅ и П₁₀ составила около 60% от уровня контрольного варианта. Биомасса в варианте П₂₀ составила лишь 20% от контрольного варианта. Выявлена обратно пропорциональная зависимость уровня микробной биомассы и содержания металлов ($R = -0.87$). В литературе представлены данные об использовании этого критерия в лабораторных опытах. В целом, авторы свидетельствуют о том, что внесение осадков, загрязненных высоким количеством металлов [17, 18], дей-

ствуется негативно на уровень микробной биомассы. Однако есть и данные о том, что внесение осадка, содержащего Zn в количестве 2000 мг/кг, не приводило к достоверному снижению уровня микробной биомассы [19].

Табл. 2

Значения фактологических критериев состояния серой лесной почвы, обработанной различно загрязненными осадками сточных вод

Вариант	Численность				ОМБ, мгС г ⁻¹
	ГБ*, КОЕ · 10 ¹⁰ г ⁻¹	М, КОЕ · 10 ⁶ г ⁻¹	А, КОЕ · 10 ⁶ г ⁻¹	Az, %	
П _к	319 ± 95	115 ± 33	230 ± 69	37 ± 8	0.89 ± 0.22
П ₁	63 ± 12	126 ± 29	105 ± 28	40 ± 12	0.52 ± 0.16
П ₅	124 ± 36	148 ± 36	150 ± 41	29 ± 11	0.55 ± 0.17
П ₁₀	62 ± 15	251 ± 66	260 ± 62	20 ± 7	0.55 ± 0.12
П ₂₀	30 ± 9	573 ± 133	245 ± 61	2 ± 0.5	0.15 ± 0.03

*ГБ – гетеротрофные бактерии

М – микромицеты

А – актиномицеты

Az – бактерии рода *Azotobacter*

ОМБ – общая микробная биомасса

Почвенное микробное дыхание является одним из наиболее часто используемых параметров для измерения микробиологической активности. Внесение модельных образцов осадков в почву существенно не изменило дыхательную активность микробных сообществ (табл. 3). Через 30 суток после внесения осадков сточных вод уровень базального дыхания остается выше контрольного варианта. Необходимо отметить, что в литературе представлены достаточно противоречивые данные об ответной реакции микроорганизмов на действие индивидуальных металлов в плане изменения респираторной активности [20]. Так, Rost с соавторами [19] обнаружил обратную зависимость респираторной активности от дозы внесенного Zn: внесение осадка, содержащего металл, приводит к снижению респираторной активности за счет элиминации наиболее активной части микроорганизмов, которая представляет собой незначительную часть микробной биомассы. Однако, в основном, авторы свидетельствуют о том, что увеличивающиеся дозы металлов приводят к увеличению дыхания, что свидетельствует об их негативном влиянии на микробное сообщество и его стрессе [2, 17, 18].

Метаболический коэффициент (qCO_2) является отношением между дыханием и микробной биомассой, то есть представляет удельную метаболическую активность и может быть показателем неблагоприятных условий окружающей среды [9]. По изменению значения qCO_2 , в частности, по увеличению, можно судить о нарушении устойчивого состояния почвы или, другими словами, о нарушении устойчивости почв. Метаболический коэффициент в случае контрольного варианта составил 1.9 на 30 сутки измерения (табл. 2). Установлено, что внесение модельных образцов осадков приводит к увеличению qCO_2 . Максимальное значение метаболического коэффициента выявлено для образца П₂₀, содержащего максимальное количество металлов. Обнаружена прямая корреляция между содержанием металлов в образцах и уровнем метаболического

коэффициента ($R = 0.91$). Полученные данные о прямой корреляции между уровнем qCO_2 и содержанием металлов в образцах согласуются с результатами [18]. Согласно современным представлениям такое увеличение метаболического коэффициента означает стресс почвенного микробного сообщества, поскольку любое нарушение экосистемы сопровождается перераспределением энергии, когда большая ее часть расходуется на поддержание клеток [2, 18, 21, 22]. Одновременно существует мнение о том, что трактовать увеличение qCO_2 с позиций энергетической оптимизации возможно только в условиях долговременного полевого эксперимента, когда микробное сообщество находится в стабильном состоянии [20]. В случае же лабораторных исследований причины увеличения qCO_2 могут быть несколько иными. Так, токсичные металлы убивают часть микроорганизмов, результатом чего является резкое увеличение процесса разложения микробных клеток. Именно это само по себе вызывает увеличение qCO_2 .

Фиксация атмосферного азота – процесс, осуществляемый только прокариотами, обладающими ферментом нитрогеназой. Такая активность встречается у свободноживущих гетеротрофных бактерий, фототрофных цианобактерий и организмов, фиксирующих N_2 в симбиотической ассоциации с растениями. Оценка влияния возрастающих концентраций металлов на нитрогеназную активность гетеротрофных микроорганизмов позволила выявить высокую чувствительность указанного параметра. Действительно, как видно из табл. 3, в случае образцов P_{10} и P_{20} через 30 суток отмечено полное подавление фиксации N_2 . В литературе широко обсуждается вопрос о целесообразности использования гетеротрофной фиксации N_2 как биологического индикатора почвенного загрязнения тяжелыми металлами и о чувствительности данного метода [2, 22, 23]. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о достаточной чувствительности гетеротрофных diaзотрофов, что позволяет рекомендовать применение указанного метода в оценке состояния почв, обработанных осадками.

К числу свободноживущих азотфиксаторов относятся бактерии рода *Azotobacter*, наличие которых является индикатором благоприятных свойств почвы. Анализ численности азотобактера продемонстрировал зависимость, сходную с таковой для гетеротрофной азотфиксации (табл. 2). Достоверное снижение численности через 30 суток после внесения осадков установлено в случае образцов P_{10} и P_{20} . Коэффициент корреляции между суммарным содержанием металлов и численностью азотобактера составил -0.99 .

Оценку влияния ОСВ на структуру микробного сообщества почвы осуществляли на основе фактологических критериев, включающих численность основных групп микроорганизмов – бактерий, грибов и актиномицетов (табл. 2). Исходный почвенный образец на 30 сутки исследования был представлен следующими показателями этих критериев: численность бактерий, характеризующих гетеротрофный пул, учитываемых на среде МПА, – $319,5 \cdot 10^{10}$ КОЕ/г; количество жизнеспособных пропагул микромицетов – $1156 \cdot 10^5$ КОЕ/г; стрептомицетов – $230 \cdot 10^6$ КОЕ/г. В результате анализа соотношения основных физиологических групп установлено снижение численности бактерий во всех опыт-

ных вариантах на 60–90% по сравнению с контрольным вариантом. По сравнению с исходным количеством отмечено увеличение численности актиномицетов и микромицетов во всех опытных вариантах. При этом не обнаружено достоверной зависимости численности последних групп микроорганизмов от содержания металлов в почвенных образцах.

Оценку влияния ОСВ на ферментативную активность почв осуществляли на основе определения дегидрогеназной, протеазной и целлюлолитической активностей. Через 30 суток инкубирования уровень дегидрогеназной активности в опытных вариантах снижался, однако достоверного дозо-зависимого эффекта обнаружено не было (табл. 3).

Не установлено достоверного влияния возрастающих концентраций металлов в составе ОСВ и в случае анализа протеолитической активности почвы (табл. 3). К 30 суткам отмечалось даже увеличение показателя относительно образца без добавления осадка, за исключением образца П₂₀, уровень почвенной активности которого был соизмерим с уровнем в контрольном варианте.

При оценке целлюлолитической активности на основе определения интенсивности разложения хлопчатобумажного полотна установлено, что внесение осадков с увеличивающимся содержанием металлов не снижало целлюлолитической активности, а напротив стимулировало ее (табл. 3). Более того, выявлен прямой дозозависимый эффект с коэффициентом корреляции 0.93. Это может быть связано с перераспределением в структуре микробного сообщества в сторону более устойчивых организмов – микромицетов и актиномицетов. Именно эти организмы являются основными деструкторами сложных биополимеров в почве.

Для того чтобы выявить критерии, наиболее адекватно отражающие влияние ОСВ на состояние почвы, проведен корреляционный анализ результатов, полученных на 30 сутки инкубации образцов. Данные представлены в табл. 4. На основании значений коэффициентов корреляции можно заключить, что наиболее адекватно отражали воздействие токсичных компонентов ОСВ на сообщество серой лесной почвы такие критерии, как углерод микробной биомассы ($R = -0.86$), метаболический коэффициент ($R = 0.91$), активность процесса азотфиксации ($R = -0.87$) и численность бактерий рода *Azotobacter* ($R = -0.99$). Такие критерии, как ферментативная активность почвы численность отдельных групп микроорганизмов, широко рекомендуемые в биологической диагностике почв, загрязненных металлами, оказались не пригодными в случае внесения в почву металлов в составе ОСВ.

Summary

S.Yu. Selivanovskaya, S.N. Kiyamova, V.Z. Latypova. Selection of the indexes for experimental determination of the load of the organic wastes on soil microbial communities.

Response of microbial communities of the grey forest soil on the amendment of the soil with organic waste was studied. Selection of the parameters suitable for the experimental estimation of the permissible load of the multicomponent organic waste on the soil microbial communities were proved by means of correlation analysis.

Литература

1. *Kapanen A., Itavaara M.* Ecotoxicity tests for compost applications // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2001. – V. 49. – P. 1–16.
2. *McGrath S.P., Chaudri, A.M., Giller K.E.* Long-term effects of metals in sewage sludge on soils, microorganisms and plants // *J. Industrial Microbiology*. – 1995. – V. 14. – P. 94–104.
3. Санитарные Правила и Нормы 2.1.7.573-96 «Гигиенические требования к использованию сточных вод и их осадков для орошения и удобрения» (2.1.7. Почва, очистка населенных мест, бытовые и промышленные отходы, санитарная охрана почвы). – М., 1997. – 36 с.
4. *Ahlf W., Forstner U.* Managing Contaminated Sediments: improving chemical and biological criteria // *J. Soil & Sediments*, – 2001. – V. 1. – P. 30–37.
5. *Selivanovskaya S.Yu., Latypova V.Z., Kiyamova S.N., Alimova F.K.* Use of microbial parameters to assess treatment methods of municipal sewage sludge applied to grey forest soils of Tatarstan // *Agriculture, Ecosystems and Environment*. – 2001. – V. 86, No 2. – P. 145–153.
6. *Wong J.W.C., Lai K.M., Su D.S., Fang M.* Availability of heavy metals for *Brassica chinensis* grown in an acidic loamy soil amended with a domestic and industrial sewage sludge // *Water Air and Soil Pollution*. – 2001. – V. 128. – P. 339–353.
7. ISO 14240-2. Soil quality – Determination of soil microbial biomass. Part 2: Fumigation-extraction method. International standard. – 1997. – 12 p.
8. *Methods in Soil Biology*. Ed. F. Schinner. – Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1995. – 230 p.
9. *Anderson T.H., Domsch K.H.* The metabolic quotient for CO₂ (qCO₂) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils // *Soil. Biol. Biochem.* – 1993. – V. 25. – P. 393–395.
10. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д.Г. Звягинцева. – М.: Изд-во МГУ, 1991. – 310 с.
11. *Колешко О.И.* Экология микроорганизмов почвы. – Минск: Высш. шк., 1981. – 176 с.
12. *Бабьева И.П., Зенова Г.М.* Биология почв. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 336 с.
13. ГОСТ 26213-91. Метод определения органического вещества. – М.: Изд-во стандартов, 1992. – 6 с.
14. *Brookes P.C.* The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals // *Biol. Fertil. Soils*. – 1995. – V. 19. – P. 269–279.
15. *Ананьева Н.Д., Благодатская Е.В., Демкина Т.С.* Оценка устойчивости почвенных микробных комплексов к природным и антропогенным воздействиям // *Почвоведение*. – 2002. – № 5. – С. 580–587.
16. *Moreno J.L., Perez T.A., Aliaga A., Hernandez T.* The ecological dose of nickel in semiarid soil amended with sewage sludge related to unamended soil // *Water Air and Soil Pollution*. – 2003. – V. 143. – P. 289–300.
17. *Dar G.H.* Impact of lead and sewage sludge on soil microbial biomass and carbon and nitrogen mineralization // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* – 1997. – V. 58. – P. 234–240.
18. *Moreno J.L., Hernandez T., Garcia C.* Effects of cadmium-contaminated sewage sludge compost on dynamics of organic matter and microbial activity in an arid soil // *Biol. Fertil. Soil*. – 1999. – V. 28. – P. 230–237.

19. *Rost U., Joergensen R.G., Chander K.* Effects of Zn enriched sewage sludge on microbial activities and biomass in soil // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2001. – V. 33. – P. 633–638.
20. *Giller K.E., Witter E., McGrath S.P.* Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review // *Soil Biol. Biochem.* – 1998. – V. 10–11. – P. 1389–1414.
21. *Odum E.P.* Trends expressed in stressed ecosystems // *Bioscience*. – 1985. – V. 35. – P. 419–422.
22. *Brookes P.C.* The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals // *Biol. Fertil. Soils*. – 1995. – V. 19. – P. 269–279.
23. *Van Beelen P., Doelmann P.* Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment // *Chemosphere*. – 1997. – V. 34, No 3. – P. 455–499.

Поступила в редакцию
16.05.05

Селивановская Светлана Юрьевна – доктор биологических наук, доцент, профессор Казанского государственного университета.

E-mail: Svetlana.Selivanovskaya@ksu.ru

Киямова Светлана Наильевна – кандидат биологических наук, доцент Казанского государственного технологического университета.

Латыпова Венера Зиннатовна – доктор химических наук, профессор Казанского государственного университета.