

УДК 579.6:579.26:579.87+57.044

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ  
ПОЧВЕННОЙ МИКРОБИОТЫ  
ПРИ ХИМИЧЕСКОМ ЗАГРЯЗНЕНИИ СРЕДЫ**

**Т. В. Жуйкова<sup>1,2</sup>, В. А. Гордеева<sup>1,2</sup>, В. С. Безель<sup>2</sup>,  
Л. В. Костина<sup>3</sup>, И. Б. Ившина<sup>3,4</sup>**

<sup>1</sup> *Нижнетагильский государственный социально-педагогический институт  
Российского государственного профессионально-педагогического университета  
Россия, 622031, Нижний Тагил, Красногвардейская, 57  
E-mail: hbfnt@rambler.ru*

<sup>2</sup> *Институт экологии растений и животных УрО РАН  
Россия, 620144, Екатеринбург, 8-е Марта, 202*

<sup>3</sup> *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН  
Россия, 614081, Пермь, Голева, 13*

<sup>4</sup> *Пермский государственный национальный исследовательский университет  
Россия, 614990, Пермь, Букирева, 15*

Поступила в редакцию 21.03.15 г.

**Структурно-функциональное состояние почвенной микробиоты при химическом загрязнении среды.** – Жуйкова Т. В., Гордеева В. А., Безель В. С., Костина Л. В., Ившина И. Б. – Изучено структурно-функциональное разнообразие основных эколого-трофических групп почвенных микроорганизмов в техногенно загрязненных тяжёлыми металлами луговых почвах Среднего Урала. Увеличение общей численности микроорганизмов на техноземах, по сравнению с агрозёмами, связано с более высоким обилием в них железовосстанавливающих, денитрифицирующих, азотфиксирующих, сульфатредуцирующих бактерий; увеличения уровня целлюлозолитической активности, а также их зависимостью от уровня токсической нагрузки на почвы. При загрязнении почв тяжёлыми металлами формируется упрощенная структура микробного сообщества с преобладанием *r*-стратегов, что отражает более ранние этапы сукцессии микробценозов при загрязнении почв.

*Ключевые слова:* эколого-трофические группы бактерий, коэффициенты сукцессии и олиготрофности, загрязнение среды, тяжёлые металлы.

**Structural-functional state of the soil microbiota in chemically polluted environment.** – Zhuikova T. V., Gordeeva V.A., Bezel' V. S., Kostina L. V., and Ivshina I. B. – The structural-functional diversity of main ecological trophic groups of soil microorganisms in the meadow soils of the Central Urals, anthropogenically contaminated with heavy metals, was studied. The growth of the total numbers of these microorganisms in technozems, in comparison with those in agrozems, is due to the higher abundance of ferric-reducing, denitrifying, nitrogen-fixing and sulphate-reducing bacteria; the increased cellulolytic activity, and the dependence of these characteristics on the soil toxic load. When soil is contaminated with heavy metals, a reductive structure of the microbial community is formed, with the predominance of *r*-strategists, which reflects earlier stages of microbiocenoses succession under soil contamination.

*Key words:* ecological trophic groups of bacteria, succession rate, oligotrophic capacity, environmental pollution, heavy metals.

DOI: 10.18500/1684-7318-2016-2-186-198

## ВВЕДЕНИЕ

На фоне техногенного загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами (ТМ) изменяются консервативные свойства почвы: уровень активной кислотности, обменная ёмкость, структура и химический состав компонентов, а также структура гуминовых и фульвокислот, функциональные группы которых связываются с ионами ТМ (Костина и др., 2009). Это также оказывает влияние на биоразнообразие эколого-трофических групп микроорганизмов, уровень их метаболической активности, их способность адаптироваться к поллютантам (Загуральская, Зябченко, 1994; Ившина и др., 2014; Gadd, 1993; Blum, Eswaran, 2004; Lorenz, Kandeler, 2006). На техногенных субстратах возможно как снижение микробиологической активности микроорганизмов вследствие замедления физиолого-биохимических процессов (Богородская и др., 2012), так и ее усиление в результате гибели чувствительных и развития устойчивых к ТМ бактерий (Семенова и др., 2011).

Цель настоящей работы – изучение численности и оценка структурно-функционального состояния основных эколого-трофических групп почвенной микробиоты при различных уровнях загрязнения среды ТМ. Предполагается, что в условиях длительного (десять лет) загрязнения в почвах формируется устойчивый комплекс микробиоты, способный поддерживать необходимый уровень биогенного обмена, обеспечивая стабильное функционирование травяного фитоценоза (Жуйкова и др., 2015).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

**Характеристика исследованной территории.** Исследования проведены в районе действия Нижнетагильского металлургического комбината (ОАО «ЕВРАЗ НТМК») в г. Нижний Тагил, Свердловской обл. (60° в.д., 58° с.ш.). Предприятие действует с 1938 г. и является крупнейшим источником атмосферного загрязнения. Основные выбросы – тонкодисперсные пылевые частицы, содержащие ионы ТМ ( $As^{3+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Cr^{6+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ), газы ( $CO_2$ ,  $NO_2$ ,  $SO_2$ ), а также фенолы и дигидросульфиды.

**Почвенная характеристика участков.** Почвенно-растительный покров исследуемой территории сформировался в условиях таёжной географической зоны, подзоны южной тайги. По ландшафтным условиям и почвенным характеристикам ранее выделены две группы почв: агрозёмы и технозёмы (Жуйкова и др., 2015). *Агрозёмы* расположены в агроландшафтах с агродерново-подзолистыми почвами с начальными стадиями дернового процесса (заброшенные пашни) и характеризуются средним плодородием. Обменный комплекс этих почв насыщен основаниями до 57 – 95%, в основном кальцием. Обеспеченность легкогидролизуемым азотом (2.60 – 5.61 мг/100 г) и подвижными фосфатами (3.41 – 49.70 мг/100 г) этих почв низкая и очень низкая. Более полно данные почвы обеспечены подвижными формами калия (11.96 – 418.00 мг/100 г). *Технозёмы* расположены в техногенных ландшафтах, на промышленных отвалах, возраст которых более 45 лет. Это молодые почвы, формируемые по буроземному и литоземному типам, обладающие более высоким плодородием, сильно насыщенные основаниями ( $V > 95\%$ ), высокими и очень высокими показателями обеспеченности обменными формами фосфора

(11.28 – 158.05 мг/100 г) и калия (38.97 – 544.25 мг/100 г). Обеспеченность азотом при слаборазвитой дернине низкая (4.47 – 5.12 мг/100 г), при наличии дернины – высокая (29.13 – 57.90 мг/100 г), что может способствовать более интенсивному развитию почвенной микрофлоры.

*Уровень химического загрязнения почвы.* Химический состав почвы определен в соответствии с аттестованными методами анализа в аккредитованной лаборатории ИЭРиЖ УрО РАН (Аттестат аккредитации № РОСС RU. 0001.515630). Отбор и анализ почвы на содержание Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb выполнен на основании методических указаний РД 52.18.191-89 (Методика выполнения..., 1990) методом пламенной атомно-абсорбционной спектроскопии на спектрометре AAS Vario 6 (Analytik Jena AG, Германия).

В градиенте загрязнения концентрации подвижных форм ТМ (основных загрязнителей) достигают: для меди – 288, свинца – 23, кадмия – 2, цинка – 343 мкг/г почвы. На основании расчетного индекса загрязнения  $Z$  (сумма концентраций ТМ, отнесенных к фоновым значениям в относительных единицах) выделены зоны техногенной нагрузки: фоновая ( $Z = 1.0$  отн. ед.), буферная (участки с  $Z = 3.3, 6.2$  отн. ед.), импактная ( $Z = 22.8, 30.0$  отн. ед.). Названия зон соответствуют номенклатуре ЮНЕП (Global..., 1973). Содержание подвижных форм Cd, Cu и Zn в почве на загрязненных территориях многократно превышает фоновые уровни: в буферной зоне – в 10, 8, 13 раз, в импактной – в 78, 10 и 29 раз соответственно.

**Микробиологические исследования.** Образцы почв (30 на каждом участке) для микробиологического анализа отбирали в мае 2011 и 2012 гг. с соблюдением правил антисептики из верхнего 0 – 10 см слоя почвы. Для более эффективной десорбции микроорганизмов с поверхности почвенных частиц осуществляли предварительную подготовку почвы ультразвуковой обработкой почвенной суспензии (1 : 10, 2 – 5 мин) низкочастотным диспергатором Soniprep 150 (MSE) (Sanyo, Япония). Общую численность микроорганизмов определяли, используя флюорохромный краситель акридин оранжевый (Инструментальные методы..., 1982). Подсчет микроорганизмов проводили на люминесцентном микроскопе Micros MC 400FP (Австрия), просматривая не менее 30 полей зрения для каждого образца. Пересчет численности вели по формуле:  $N_{\text{общ}} = ((4 \times a \times n) / P) \times 10^{10}$ , где  $a$  – число клеток в поле зрения;  $P$  – площадь поля зрения, мкм<sup>2</sup>;  $n$  – показатель разведения; 4 – площадь образца (капли), см<sup>2</sup>.

Для определения численности основных эколого-трофических групп микроорганизмов использовали чашечный метод и метод предельных разведений (Методы почвенной..., 1991). Подсчет выполняли по таблице Мак-Креди. Посев почвенных образцов проводили на селективные питательные среды (Зенова и др., 2002): аммонификаторы – в мясоептонный бульон; денитрификаторы и анаэробные азотфиксаторы (*Clostridium* spp.) – среду Гильея; нитрификаторы I и II фазы – среду Виноградского; сульфатовосстанавливающие – среду Постгейта Б; железо- и марганцевосстанавливающие – среду Бромфильда; гетеротрофы – на мясоептонный агар (МПА); углеводородокисляющие (УОБ) – минеральную агаризованную среду К в парах смеси  $n$ -алканов (C<sub>12</sub>-C<sub>17</sub>); олиготрофы – минеральную агаризованную среду К без источника углерода (Каталог штаммов..., 1994); аэробные цел-

люлозоразрушающие – среду Гетчинсона. Численность свободноживущих аэробных азотфиксаторов рода *Azotobacter* учитывали методом комочков обрастания на среде Эшби. Культивирование микроорганизмов проводили при 28 – 60°C в течение 7 – 21 сут.

Функциональную структуру комплекса почвенных микроорганизмов определяли по соотношению численности разных физиологических групп. Для анализа структуры сообщества вычисляли коэффициент олиготрофности ( $K_o$ ) – отношение численности микроорганизмов, выросших на голодном агаре (ГА), к численности микроорганизмов, выросших на МПА ( $K_o = \text{ГА} / \text{МПА}$ ); коэффициент сукцессии ( $K_c$ ) – отношение общего количества бактерий (М), учитываемых люминесцентным методом с использованием флюорохромного красителя акридина оранжевого, к численности бактерий, выросших на МПА (П) ( $K_c = \text{М} / \text{П}$ ) (Семенова и др., 2011; Сорокина и др., 2008). Определения проводили в 3 – 5-кратной повторности.

*Статистическую обработку результатов* проводили с учётом среднего арифметического ( $M$ ) и его ошибки ( $m$ ). Межгодовую изменчивость численности исследованных групп бактерий выражали через коэффициент вариации ( $C_v$ ). Сопряженность между признаками выражали через коэффициента ранговой корреляции Спирмена ( $R_s$ ). Различия между выборками и процент объясненной дисперсии оценивали однофакторным дисперсионным анализом. Множественные сравнения проведены  $S$ -методом Шеффе. Статистический анализ выполнен с помощью ПСП Stat Soft, Inc., 2012.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Варьирование численности и соотношение эколого-трофических групп микроорганизмов относятся к числу чувствительных параметров, свидетельствующих об изменении состояния окружающей среды (Свирскене, 2003; Полянская и др., 2012; Brooks, 1995; Chen et al., 2001; Zhao et al., 2013). В табл. 1 представлены количественные характеристики групп микроорганизмов, участвующих в циклах превращения азота, углерода, серы, железа, марганца, а также основных агентов деструкции целлюлозы.

*Общая численность микроорганизмов.* В течение всего периода исследований общая численность бактерий в почвенных микробоценозах агрозёмов не превышала  $12.8 \times 10^{10}$  клеток / г почвы (рис. 1). В технозёмах этот показатель был в 2 раза выше ( $24.4 \times 10^{10}$  клеток / г почвы) ( $S$ -метод:  $F(4; 11) = 3.43 - 5.26$ ;  $p < 0.05 - 0.01$ ). Обнаружена связь показателя с уровнем загрязнения почвы ТМ ( $R_s = 0.49 - 0.81$ ;  $N = 15$ ;  $p < 0.06 - 0.001$ ), особенно в весенне-летний сезон 2012 г. Более широкое варьирование общей численности микроорганизмов за время исследования было на технозёмах, по сравнению агрозёмами (2.2 и 1.2 – 1.8 раз соответственно).

*Численность гетеротрофных и олиготрофных бактерий.* Высокая численность гетеротрофных бактерий ( $5.2 \times 10^9$  клеток / г почвы) отмечена в 2011 г. в почве фоновой зоны. С увеличением загрязнения этот показатель снижается в 1000 раз ( $S$ -метод:  $F(4; 11) = 6.21$ ;  $p < 0.001$ ). Низкий уровень численности данной группы прослеживался на всех участках в сезон 2012 г. (см. табл. 1;  $F(4; 11) = 1.56$ ;  $p > 0.05$ ).

Таблица 1

Численность (клеток / г почвы) эколого-трофических групп микроорганизмов в почве исследуемых территорий ( $M \pm m$ )

Эколого-трофические группы	Год наблюдения	Токсическая нагрузка, отн. ед.				
		Агрозёмы			Технозёмы	
		1.00	3.33	6.19	22.78	30.00
Гетеротрофы ( $n = 3$ )	2011	$(5.2 \pm 1.0) \cdot 10^9$	$(5.1 \pm 3.1) \cdot 10^6$	$(6.4 \pm 0.9) \cdot 10^6$	$(8.9 \pm 0.6) \cdot 10^6$	$(9.4 \pm 0.2) \cdot 10^6$
	2012	$(5.2 \pm 1.9) \cdot 10^6$	$(2.5 \pm 1.0) \cdot 10^6$	$(2.8 \pm 1.3) \cdot 10^6$	$(5.0 \pm 1.8) \cdot 10^6$	$(1.8 \pm 0.7) \cdot 10^7$
Олиготрофы ( $n = 3$ )	2011	$(3.7 \pm 0.9) \cdot 10^6$	$(2.1 \pm 1.3) \cdot 10^6$	$(1.1 \pm 0.3) \cdot 10^7$	$(9.5 \pm 0.3) \cdot 10^6$	$(10.4 \pm 0.3) \cdot 10^6$
	2012	$(5.9 \pm 1.9) \cdot 10^8$	$(2.1 \pm 0.6) \cdot 10^8$	$(1.7 \pm 0.1) \cdot 10^8$	$(3.4 \pm 1.5) \cdot 10^8$	$(5.1 \pm 0.5) \cdot 10^8$
УОБ ( $n = 3$ )	2011	$(3.2 \pm 0.5) \cdot 10^9$	$(9.3 \pm 3.5) \cdot 10^8$	$(8.0 \pm 0.6) \cdot 10^7$	$(1.3 \pm 0.4) \cdot 10^9$	$(7.7 \pm 4.2) \cdot 10^8$
	2012	$(0.9 \pm 0.06) \cdot 10^7$	$(0.1 \pm 0.05) \cdot 10^9$	$(1.3 \pm 0.0) \cdot 10^9$	$(5.0 \pm 1.9) \cdot 10^8$	$(9.4 \pm 3.8) \cdot 10^8$
Азотфиксаторы, % ( $n = 9$ )	2011	0.0±0.0	2.3±0.7	0.0±0.0	72.7±11.1	66.8±12.6
	2012	23.6±11.3	0.7±0.3	9.8±3.2	97.8±1.1	100.0±0.0
Аммонификаторы ( $n = 9$ )	2011	$(1.8 \pm 0.4) \cdot 10^{10}$	$(2.7 \pm 0.6) \cdot 10^9$	$(1.0 \pm 0.8) \cdot 10^{10}$	$(2.5 \pm 0.0) \cdot 10^9$	$(2.5 \pm 0.0) \cdot 10^9$
	2012	$(1.0 \pm 0.05) \cdot 10^8$	$(0.2 \pm 0.1) \cdot 10^8$	$(9.0 \pm 3.8) \cdot 10^7$	$(0.2 \pm 0.04) \cdot 10^9$	$(0.2 \pm 0.08) \cdot 10^9$
Денитрификаторы ( $n = 9$ )	2011	$(9.9 \pm 7.6) \cdot 10^3$	$(1.9 \pm 0.7) \cdot 10^6$	$(8.7 \pm 2.2) \cdot 10^5$	$(9.3 \pm 4.8) \cdot 10^6$	$(1.8 \pm 0.7) \cdot 10^7$
	2012	$(0.2 \pm 0.02) \cdot 10^3$	$(0.9 \pm 0.2) \cdot 10^5$	$(0.2 \pm 0.07) \cdot 10^4$	$(4.4 \pm 0.7) \cdot 10^7$	$(2.3 \pm 0.4) \cdot 10^7$
Нитрификаторы I фазы ( $n = 3$ )	2011	$2.5 \cdot 10^7$	$6.5 \cdot 10^4$	$4.0 \cdot 10^4$	$2.5 \cdot 10^6$	$2.5 \cdot 10^7$
	2012	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Нитрификаторы II фазы ( $n = 3$ )	2011	$2.5 \cdot 10^7$	$9.5 \cdot 10^6$	$2.5 \cdot 10^6$	$2.5 \cdot 10^7$	$2.5 \cdot 10^7$
	2012	$(8.0 \pm 6.0) \cdot 10^5$	$(3.7 \pm 0.7) \cdot 10^6$	$(2.0 \pm 0.3) \cdot 10^5$	$(2.0 \pm 0.5) \cdot 10^8$	$(2.0 \pm 0.5) \cdot 10^8$
Сульфатредукторы ( $n = 9$ )	2011	0.0	$(1.1 \pm 0.7) \cdot 10^2$	$(0.3 \pm 0.01) \cdot 10^3$	$(7.3 \pm 0.4) \cdot 10^3$	$(2.5 \pm 0.0) \cdot 10^2$
	2012	0.0	$2.5 \pm 0.0$	$1.8 \pm 0.7$	$2.5 \pm 0.0$	$2.5 \pm 0.0$
Железосостанавливающие бактерии ( $n = 3$ )	2011	$(2.5 \pm 0.0) \cdot 10^6$	$(2.5 \pm 0.0) \cdot 10^7$	$(2.5 \pm 0.0) \cdot 10^7$	$(9.5 \pm 0.0) \cdot 10^6$	$(9.5 \pm 0.0) \cdot 10^6$
	2012	$(4.7 \pm 4.1) \cdot 10^6$	$(0.9 \pm 0.4) \cdot 10^6$	$(0.1 \pm 0.06) \cdot 10^7$	$(1.0 \pm 0.1) \cdot 10^7$	$(4.7 \pm 4.1) \cdot 10^6$
Марганецвосстанавливающие бактерии ( $n = 3$ )	2011	$(2.5 \pm 0.0) \cdot 10^7$	$(2.5 \pm 0.0) \cdot 10^7$	$(2.5 \pm 0.0) \cdot 10^7$	$(2.5 \pm 0.0) \cdot 10^7$	$(2.5 \pm 0.0) \cdot 10^7$
	2012	$(3.1 \pm 1.4) \cdot 10^7$	$(1.3 \pm 0.2) \cdot 10^7$	$(1.3 \pm 0.6) \cdot 10^7$	$(11.0 \pm 0.0) \cdot 10^7$	$(4.5 \pm 0.0) \cdot 10^7$
Целлюлозоразрушающие аэробные бактерии ( $n = 9$ )	2011	$(1.8 \pm 0.4) \cdot 10^4$	$(1.9 \pm 0.6) \cdot 10^4$	$(2.6 \pm 0.8) \cdot 10^4$	$(3.7 \pm 0.7) \cdot 10^4$	$(5.1 \pm 1.0) \cdot 10^4$
	2012	$(1.9 \pm 0.4) \cdot 10^4$	$(1.9 \pm 0.6) \cdot 10^4$	$(5.0 \pm 0.6) \cdot 10^4$	$(3.7 \pm 0.3) \cdot 10^4$	$(4.4 \pm 1.1) \cdot 10^4$
Целлюлозоразрушающие анаэробные мезофилы ( $n = 9$ )	2011	—	—	—	—	—
	2012	$(5.5 \pm 2.1) \cdot 10^2$	$(9.5 \pm 0.0) \cdot 10^2$	$(9.0 \pm 3.0) \cdot 10^4$	$(3.8 \pm 0.6) \cdot 10^5$	$(4.0 \pm 1.0) \cdot 10^4$
Целлюлозоразрушающие анаэробные термофилы ( $n = 9$ )	2011	—	—	—	—	—
	2012	$(2.8 \pm 1.3) \cdot 10^3$	$(3.2 \pm 0.7) \cdot 10^3$	$(3.4 \pm 1.0) \cdot 10^4$	$(9.5 \pm 0.0) \cdot 10^3$	$(6.4 \pm 3.0) \cdot 10^3$
Микроскопические грибы ( $n = 3$ )	2011	—	—	—	—	—
	2012	$(2.4 \pm 1.1) \cdot 10^6$	$(4.1 \pm 0.2) \cdot 10^6$	$(7.3 \pm 3.0) \cdot 10^4$	$(8.5 \pm 4.5) \cdot 10^3$	$(2.4 \pm 0.6) \cdot 10^5$

Примечание.  $n$  – число повторностей;  $M$  – среднее арифметическое;  $m$  – ошибка среднего арифметического; прочерк – нет данных.

Численность олиготрофных бактерий возрастает в градиенте загрязнения почвы и статистически значимо различается на агрозёмах и технозёмах в 2011 г. ( $S$ -метод:  $(F(4; 11) = 5.74; p < 0.001)$ ). В пробах 2012 г. этот показатель возрос в 50 раз независимо от уровня токсической нагрузки ( $R_s = 0.1; N = 15; p > 0.05$ ).

Численность углеводородокисляющих бактерий (УОБ). В 2011 г. химическое загрязнение и группа почв не оказывали существенного влияния на численность УОБ ( $F(4; 11) = 0.99; p > 0.05$ ). В 2012 г. в пробах с фонового участка регистрировали низкую численность УОБ по сравнению с остальными территориями ( $F(4; 11) = 5.04; p < 0.001$ ).

Численность бактерий цикла азота. Во время исследования не выявлено зависимости численности аммонифицирующих бактерий от уровня загрязнения почв ТМ (2011 и 2012 гг.:  $R_s = -0.25$  и  $0.49$  соответственно;  $N = 15; p > 0.05$ ) в отличие от денитрифицирующих бактерий, численность которых была минимальна на фоновом участке и положительно коррелировала с уровнем токсической нагрузки неза-

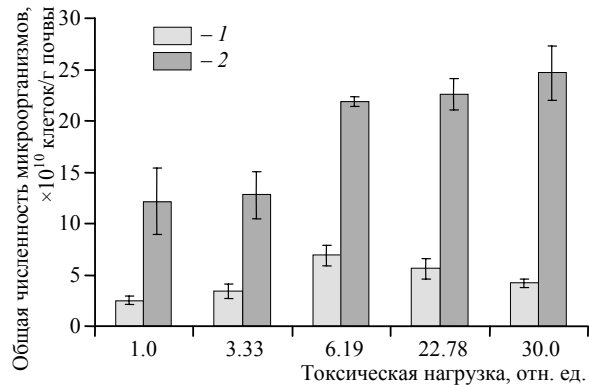
## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОЧВЕННОЙ МИКРОБИОТЫ

висимо от года наблюдения (2011 и 2012 гг.:  $R_s = 0.70 - 0.85$ ;  $N = 15$ ;  $p < 0.05 - 0.001$ ).

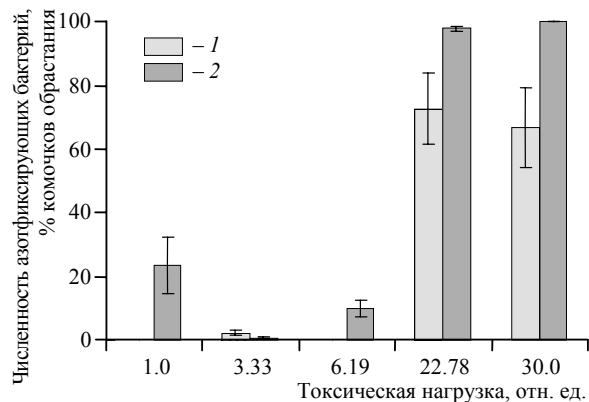
Обилие нитрифицирующих бактерий *I фазы* снижалось в градиенте загрязнения на агрозёмах и повышалось на технозёмах в 2011 г. Эта эколого-трофическая группа в 2012 г. в почвах не обнаружена. Нитрификаторы *II фазы* в 2012 г. имели практически постоянную численность на всех участках ( $2.5 \times 10^7$  клеток / г почвы) с незначительным снижением в буферной зоне (см. табл. 1) ( $R_s = 0.22$ ;  $N = 15$ ;  $p = 0.72$ ). В 2012 г. наблюдалась резкое снижение численности этой группы бактерий на агрозёмах до  $10^5 - 10^6$  клеток / г почвы, на технозёмах происходило увеличение этих микроорганизмов до  $10^8$  клеток / г почвы. Зависимость численности данной группы от загрязнения почв статистически значима ( $R_s = 0.74$ ;  $N = 15$ ;  $p < 0.001$ ).

Численность азотфиксирующих бактерий в почвах фоновой и буферной зон на протяжении всего периода исследований оставалась низкой (1 – 24% комочков обрастания). В почвах импактной зоны данный показатель возрастал до 67 – 100% (*S*-метод: 2011 г.:  $F(4; 75) = 10.76$ ; 2012 г.:  $F(4; 45) = 62.15$ ;  $p < 0.01$ ) (рис. 2). Тесная корреляционная связь доли бактерий рода *Azotobacter* с уровнем загрязнения выявлена как в 2011 г., так и в 2012 г. ( $R_s = 0.61 - 0.79$ ;  $p < 0.001$ ). Установлены значимые различия в численности азотфиксирующих бактерий на агрозёмах и технозёмах (*S*-метод: 2011 г.:  $F(4; 75) = 6.76$ ; 2012 г.:  $F(4; 45) = 12.14$ ;  $p < 0.01$ ), что свидетельствует об устойчивости азотфиксаторов к ТМ.

*Численность бактерий, участвующих в круговоротах серы, железа и марганца.* Сульфатвосстанавливающие бактерии не были обнаружены в образцах почв фоновой зоны на протяжении периода исследования. На загрязнен-



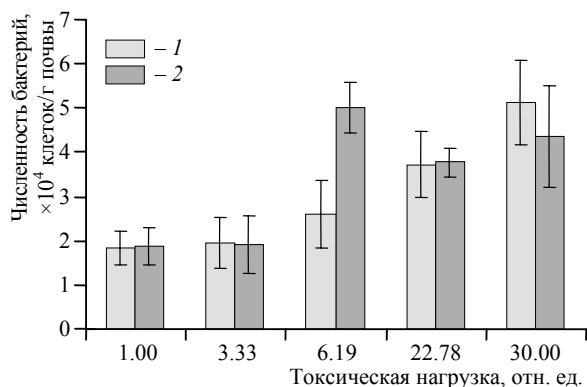
**Рис. 1.** Общая численность микроорганизмов в условиях химического загрязнения (1 – 2011 г., 2 – 2012 г.)



**Рис. 2.** Численность азотфиксирующих бактерий в градиенте химического загрязнения (1 – 2011 г., 2 – 2012 г.)

ных территориях показатель был низкий по сравнению с другими эколого-трофическими группами бактерий (см. табл. 1). Положительная корреляция между численностью этих бактерий и уровнем загрязнения почвы ( $R_s = 0.68 - 0.74$ ;  $N = 15$ ;  $p < 0.001$ ) сохраняется в течение периода наблюдений. Аналогичная реакция на уровень загрязнения почвы отмечена и для железоредуцирующих бактерий в 2012 г. ( $R_s = 0.59$ ;  $N = 15$ ;  $p < 0.001$ ). Наиболее устойчивы к ТМ и агрохимическому составу почвенного субстрата марганцевосстанавливающие бактерии (см. табл. 1), численность которых незначительно увеличивалась в импактной зоне в 2012 г. по сравнению с остальными участками ( $S$ -метод:  $F(4; 11) = 9.6$ ;  $p < 0.01$ ).

*Целлюлозолитические бактерии.* Многими авторами отмечено торможение скорости процесса деструкции органического вещества при загрязнении почвы ТМ



**Рис. 3.** Численность аэробных целлюлозоразрушающих микроорганизмов на исследуемых участках (1 – 2011 г., 2 – 2012 г.)

и соединениями серы (Воробейчик, 2007; Giller et al., 1998 и др.), что обусловлено снижением численности бактерий данной группы и подавлением их активности (Евдокимова и др., 2013). Установлена прямая зависимость аэробных и анаэробных целлюлозолитиков от уровня загрязнения почв ТМ (аэробы:  $R_s = 0.65 - 0.74$ ; анаэробы: мезофиллы –  $R_s = 0.79$ ; термофилы –  $R_s = 0.60$ ;  $N = 15$ ;  $p < 0.05 - 0.001$ ) (см. табл. 1, рис. 3).

На образование биологически активных веществ в почвах также влияют сапротрофные *микроскопические грибы* (Методы..., 1991), численность которых в агрозёмах в 10 – 1000 раз выше по сравнению с технозёмами ( $S$ -метод:  $F(4; 11) = 5.68$ ;  $p < 0.01$ ). Зависимость показателя от уровня загрязнения почв обратно пропорциональна:  $R_s = -0.25$ ;  $N = 15$ ;  $p < 0.001$ .

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Многие авторы подчеркивают высокую лабильность и зависимость обилия различных групп бактерий (аммонифицирующих, азотфиксирующих, нитрифицирующих, олиготрофных, целлюлозоразрушающих) и микроскопических грибов от внешних факторов, в том числе от присутствия ТМ (Загуральская, Зябченко, 1994; Артамонова, 2002; Полянская, 2012; Степанов и др., 2012; Gadd, 1993; Brooks, 1995). С одной стороны, при действии Pb, Cu, Ni отмечено снижение численности и активности нитрифицирующих бактерий (Семенова и др., 2011; Евдокимова и др., 2013; Brooks, 1995). С другой, подчеркивается устойчивость аммонификаторов, денитрификаторов и нитрификаторов к загрязнению почвы ТМ (Умаров,

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОЧВЕННОЙ МИКРОБИОТЫ

Азиева, 1980; Звягинцев и др., 1997). Причиной этого может быть использование бактериями в качестве питания энергетического материала погибших микроорганизмов высокочувствительных к токсикантам.

Устойчивые к ТМ бактерии оказываются наиболее толерантными и к другим неблагоприятным условиям среды. Результаты проведенного исследования показывают, что обилие аммонификаторов, денитрификаторов, олиго- и гетеротрофных бактерий в разные годы в почве максимально загрязненного участка ниже, чем на фоновой территории ( $C_v = 41 - 107\%$  и  $118 - 196\%$  соответственно).

Микробиологическая активность почвы может в большей степени коррелировать с ее физико-химическими свойствами, чем с уровнем ТМ (Звягинцев и др., 1997). Наши данные получены для агрозёмов и технозёмов, подверженных различным уровням загрязнения ТМ. При этом численность бактерий отдельных эколого-трофических групп (гетеротрофов, олиготрофов и нитрификаторов) значительно отличается в разные годы. Одной из причин этого может быть их реакция на погодные условия.

Среди погодно-климатических факторов, потенциально влияющих на развитие почвенной микробиоты, рассмотрены сумма осадков, эффективных температур и среднемесячная температура воздуха (табл. 2). Весенние месяцы 2012 г. были более теплыми: среднемесячная температура воздуха в апреле была на  $3.0^{\circ}\text{C}$  выше, сумма эффективных температур – в 10 раз больше, чем в 2011 г. Сумма осадков за зимний период с учетом осадков в апреле и в первой половине мая в 2012 г. – в 5 раз больше, чем в 2011 г.

**Таблица 2**

Характеристика погодно-климатических условий в районе исследования

Показатели	Месяц (даты)	Год наблюдения	
		2011	2012
Средняя температура воздуха, $^{\circ}\text{C}$	Апрель (1.04–30.04)	3.9	7.0
	Май (1.05–15.05)	8.0	8.7
Сумма эффективных температур ( $> 10^{\circ}\text{C}$ ), $^{\circ}\text{C}$	Апрель (1.04–30.04)	12.4	116.0
	Май (1.05–15.05)	64.5	90.0
Сумма осадков, мм	Зимний период (1.11–30.04)	154.1	152.8
	Апрель (1.04–30.04)	15.8	78.7
	Май (1.05–15.05)	6.3	19.7
Сумма осадков за период с температурой $> 10^{\circ}\text{C}$ , мм	Апрель (1.04–30.04)	0	0
	Май (1.05–15.05)	0	15.5

Межгодовое варьирование общей численности организмов в почвенных микробеценозах в большей степени выражено в импактной зоне по сравнению с фоновой и слабо загрязненным участком буферной зоны (2.2 и 1.2 – 1.8 раза соответственно). Сочетанное действие неблагоприятных погодных условий и химического загрязнения приводит к снижению общей численности почвенных микроорганизмов, особенно в импактной зоне.

С другой стороны, на фоновой территории более чувствительными к межгодовому колебанию погодных условий оказались олиготрофы, гетеротрофы и УОБ,



чем эти же группы в условиях загрязнения. В более влажный и теплый год численность гетеротрофов в фоновой зоне резко снижается до уровня максимально загрязненного участка. В импактной зоне исследуемый показатель даже повышается. Следовательно, для гетеротрофов наиболее благоприятной оказывается незначительно увлажненная почва.

Подобная реакция на погодные условия и химическое загрязнение почвы выявлена для УОБ, численность которых в 2012 г. в почве фонового участка значимо отличается от таковой на всех остальных участках. Противоположную реакцию на погодные условия и химическое загрязнение демонстрируют олиготрофные бактерии, обильные на всех участках в теплый и влажный весенний период. В неблагоприятный по погодным условиям год численность данной группы снижалась. Вероятно, на фоновом участке данная группа микроорганизмов более чувствительна к колебанию погоды: теплые и влажные условия способствуют развитию олиготрофов, но оказываются неблагоприятными для развития гетеротрофов и УОБ.

Для аммонификаторов и денитрификаторов более благоприятными оказались пониженные влагообеспеченность почвы и температура воздуха. Наиболее чувствительны к этому бактерии фоновой и буферной зон.

Низкая вариабельность численности аммонификаторов, денитрификаторов, олиго- и гетеротрофных бактерий характерна для максимально загрязненных территорий. Высокие дозы ТМ нивелируют действие погодных факторов, что согласуется с исследованиями М. М. Умарова и Е. Е. Азиевой (1980). Толерантность к металлам, возможно, сопровождается формированием устойчивости к неблагоприятным погодным условиям. Повышенная влажность почвы в нашем случае привела к увеличению численности азотфиксирующих бактерий, особенно на загрязненных участках. Имеет место различная реакция на ТМ почвенной нитрификации, зависящей от погоды.

Таким образом, погодно-климатические условия весеннего сезона 2012 г. оказались более благоприятными для азотфиксирующих, нитрифицирующих, марганец- и железовосстанавливающих бактерий. Высокая влагообеспеченность почвы и большое количество теплых дней в апреле способствовали увеличению численности азотфиксирующих бактерий на всех участках, а железовосстанавливающих, марганцевосстанавливающих и нитрифицирующих – только на максимально загрязненных. В фоновой и буферной зонах наблюдалось даже снижение численности последних.

Подобная многофакторность условий (химическое загрязнение, агрохимические показатели почв, погодно-климатические условия) неизбежно усложняет комплексную оценку ответных реакций микробценоза на техногенное воздействие. Можно говорить лишь о более высоком общем обилии микроорганизмов на технозёмах по сравнению с агрозёмами за счет увеличения численности железовосстанавливающих, денитрифицирующих, азотфиксирующих, сульфатредцирующих бактерий и повышенной целлюлозолитической активности, а также о зависимости этих показателей от уровня токсической нагрузки. Отмечено также подавление активности сапротрофных грибов.

В качестве интегральных показателей функциональной структуры сообщества микроорганизмов можно рассмотреть коэффициенты олиготрофности и сукцессии

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОЧВЕННОЙ МИКРОБИОТЫ

(Семенова и др., 2011; Сорокина и др., 2008; табл. 3). Различие этих коэффициентов в разные годы наблюдений ( $K_o$ :  $F(1; 29) = 34.40$ ;  $K_c$ :  $F(1; 29) = 66.76$ ;  $p < 0.001$ ) свидетельствует о том, что наряду с активно функционирующими группами микроорганизмов в почвах содержится значительное количество бактерий, так называемого «микробного пула», способного увеличивать активность и число поколений при наступлении благоприятных для их жизнедеятельности условий. При высоких активных температурах и достаточной степени увлажнения (оптимальные погодные условия для большинства микроорганизмов) была возможна не только активизация гетеротрофов и олиготрофов, но и увеличение числа поколений бактерий. Это привело к повышению коэффициентов олиготрофности и сукцессии в более благоприятный по погоде 2012 г., особенно в фоновой зоне. Таким образом, «микробный пул» обеспечивает поддержание гомеостатического состояния почвы, т.е. постоянство характерных для нее химических и биологических параметров.

Таблица 3

Коэффициенты ( $K_o$ ) и ( $K_c$ ) в почвах загрязненных ТМ

Показатель	Год наблюдения	Токсическая нагрузка, отн. ед.				
		Агрозёмы		Технозёмы		
		1.0	3.3	6.2	22.8	30.0
Коэффициент олиготрофности ( $K_o \times 10^6$ )	2011	0.001	0.41	1.72	1.07	1.11
	2012	114.8	82.0	59.4	68.7	28.3
Коэффициент сукцессии ( $K_c \times 10^9$ )	2011	4.8	6800.0	10781.3	6404.5	4468.1
	2012	23269.2	51200.0	78214.3	45200.0	13555.6

Если принять, что коэффициент олиготрофности отражает меру развития трофической структуры микробного сообщества, то химическое загрязнение приводит к упрощению структуры микробоценозов, наиболее выраженному на технозёмах (см. табл. 3). Если же данная реакция неспецифична и проявляется в ответ на влияние любых пессимальных факторов, то низкие значения  $K_o$  в 2011 г. подтверждают менее благоприятные в этом году погодные условия для развития микробных сообществ.

Различие почв проявляется и в значениях коэффициента сукцессии, который с ростом химического загрязнения на агрозёмах повышается, а на технозёмах снижается. Высокие значения  $K_c$  на буферных участках, вероятно, отражают более поздние стадии развития микробоценозов с преобладанием микроорганизмов с  $K$ -стратегией. Низкое значение  $K_c$  на максимально загрязненном участке свидетельствует о возрастающей роли быстро растущих видов с  $r$ -стратегией, а следовательно, о более ранних этапах сукцессии микробоценоза. Это согласуется с полученными нами ранее данными о сукцессионных стадиях развития травяных фитоценозов на этих территориях (Жуйкова и др., 2015). Рудеральные сообщества импактной зоны ( $Z = 22.8 - 30.0$  отн. ед.) с преобладанием многолетних злаков характеризуются низким уровнем проективного покрытия и видовой насыщенности, что отражает раннюю стадию их сукцессионного развития (предшествующая лугам стадия восстановительной сукцессии) и влияние химического загрязнения.

Однофакторный дисперсионный анализ результатов, полученных в разные годы наблюдения, позволил оценить вклад в общую дисперсию двух важнейших в нашем случае факторов: «токсической нагрузки» и «группы почв» (табл. 4). Показано высокозначимое влияние токсической нагрузки на  $K_0$  и  $K_c$ , максимальное для коэффициента сукцессии. Влияние почвенного субстрата менее значимо для обоих показателей.

**Таблица 4**

Оценка влияния группы почвы и химического загрязнения на  $K_0$  и  $K_c$

Период исследования	Фактор	$F$	$df$	$p$	Доля объясненной дисперсии, %
Коэффициент олиготрофности ( $K_0$ )					
2011 г.	1	13.11	1; 14	0.003	52.2
	2	4.36	4; 14	0.03	63.5
2012 г.	1	11.90	1; 14	0.004	42.8
	2	7.01	4; 14	0.006	73.7
Коэффициент сукцессии ( $K_c$ )					
2011 г.	1	4.37	1; 14	0.057	25.1
	2	24.78	4; 14	0.0001	90.8
2012 г.	1	0.40	1; 14	0.54	3.0
	2	47.50	4; 14	0.0001	95.0

*Примечание.* 1 – группа почв, 2 – токсическая нагрузка.

Таким образом, высокие уровни химического загрязнения и неблагоприятные погодно-климатические факторы способствуют формированию микробных сообществ, в которых снижена доля видов с  $K$ -стратегией и увеличена доля  $r$ -стратегов. Это свидетельствует о неспецифичности реакции микробного сообщества на стрессовые факторы.

## ВЫВОДЫ

1. Влияние загрязнения почвы ТМ на структуру микробного сообщества выражается в изменении численности и соотношения эколого-трофических групп микроорганизмов. На фоновом участке высокая общая численность достигается за счет олиготрофных и азотфиксирующих бактерий, на максимально загрязненном – за счёт гетеротрофных, олиготрофных, азотфиксирующих, нитрифицирующих, железовосстанавливающих микроорганизмов.

2. При наиболее высоком общем обилии микроорганизмов в технозёмах в градиенте загрязнения формируется упрощенная структура микробного сообщества с преобладанием  $r$ -стратегов, что свидетельствует о ранних этапах сукцессии микробоценозов.

3. На коэффициенты олиготрофности и сукцессии микробных сообществ в большей степени влияет уровень загрязнения почвы ТМ, чем группа почв.

4. Более устойчивы к колебаниям погодных условий марганцевосстанавливающие, денитрифицирующие, целлюлозоразрушающие аэробные бактерии. Вы-

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОЧВЕННОЙ МИКРОБИОТЫ

сокая влажность почвы способствует повышению численности олиготрофов, азотфиксирующих, нитрифицирующих и железовосстанавливающих бактерий на максимально загрязненной территории и снижению гетеротрофов, аммонификаторов, нитрификаторов, углеводородокисляющих и железовосстанавливающих бактерий в почвах фоновой и в некоторых случаях буферной зон.

Таким образом, высокая способность к саморегуляции в сочетании с избыточной биомассой почвенных микроорганизмов и разнообразием их эколого-трофических групп способствует стабильному функционированию травяных фитоценозов в градиенте загрязнения почв ТМ. Результаты исследований, проведенных в условиях южно-таёжной зоны Урала, характеризуют состояние почвенных микробценозов конкретных травяных сообществ, сформировавшихся на конкретных группах почв и подвергающихся конкретному по составу и интенсивности химическому загрязнению ТМ. Это требует осторожного подхода к прямой экстраполяции полученных данных на иные экотоксикологические ситуации.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства Свердловской области, Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 13-04-96056-р\_урал\_а) и Программы Президиума УрО РАН (проект № 12-И-4-2051).*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

*Артамонова В. С.* Микробиологические особенности антропогенного преобразования почв Западной Сибири. Новосибирск : Изд-во СО РАН. 2002. 225 с.

*Богородская А. В., Пономарева Т. В., Шапченко О. А., Шишкин А. С.* Оценка состава микробных комплексов лесотундровой зоны в условиях аэротехногенного загрязнения // Почвоведение. 2012. № 5. С. 582 – 593.

*Воробейчик Е. Л.* Сезонная динамика пространственного распределения целлюлозолитической активности почвенной микрофлоры в условиях атмосферного загрязнения // Экология. 2007. № 6. С. 427 – 437.

*Евдокимова Г. А., Корнейкова М. В., Мозгова Н. П.* Изменения свойств почв и почвенной биоты в зоне воздействия аэротехногенных выбросов Кандалакшского алюминиевого завода // Почвоведение. 2013. № 10. С. 1274 – 1280.

*Жуйкова Т. В., Мелинг Э. В., Кайгородова С. Ю., Безель В. С., Гордеева В. А.* Особенности почв и травянистых растительных сообществ в условиях техногенеза на Среднем Урале // Экология. 2015. № 3. С. 163 – 172.

*Загуральская Л. М., Зябченко С. С.* Воздействие промышленных загрязнений на микробиологические процессы в почвах бореальных лесов района Костомукши // Почвоведение. 1994. № 5. С. 105 – 101.

*Зенова Г. М., Степанов А. Л., Лихачева А. А., Манучарова Н. А.* Практикум по биологии почв : учеб. пособие. М. : Изд-во МГУ, 2002. 120 с.

*Звягинцев Д. Г., Кураков А. В., Умаров М. М., Филипп З.* Микробиологические и биохимические показатели загрязнения свинцом дерново-подзолистой почвы // Биология почв. 1997. № 9. С. 1124 – 1131.

*Ившина И. Б., Костина Л. В., Каменских Т. Н., Жуйкова В. А., Жуйкова Т. В., Безель В. С.* Почвенный микробиоценоз как показатель стабильности луговых сообществ при химическом загрязнении среды тяжелыми металлами // Экология. 2014. № 2. С. 83 – 90.

Инструментальные методы в почвенной микробиологии / под общ. ред. Е. А. Андreyuk. Киев : Наук. думка, 1982. 176 с.

Каталог штаммов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов / под ред. И. Б. Ившиной. М. : Наука, 1994. 163 с.

*Костина Л. В., Куюкина М. С., Ившина И. Б.* Методы очистки загрязненных тяжелыми металлами почв с использованием (био)сурфактантов (Обзор) // Вестн. Пермского гос. ун-та. Сер. Биология. 2009. Вып. 10, № 36. С. 95 – 110.

Методика выполнения измерений массовой доли кислоторастворимых форм металлов (меди, свинца, цинка, никеля, кадмия) в пробах почвы атомно-абсорбционным анализом РД 52.18.191-89 [Электронный ресурс] / Государственный комитет СССР по гидрометеорологии. М., 1990. URL: <http://www.gosthelp.ru/text/> (дата обращения: 12.02.2015).

Методы почвенной микробиологии и биохимии / под ред. Д. Г. Звягинцева. М. : Изд-во МГУ, 1991. 304 с.

*Полянская Л. М., Суханова Н. И., Чакмазян К. В., Звягинцев Д. Г.* Особенности изменения структуры микробной биомассы почв в условиях залежи // Почвоведение. 2012. № 7. С. 792 – 798.

*Свирскене А.* Микробиологические и биохимические показатели при оценке антропогенного воздействия на почвы // Почвоведение. 2003. № 2. С. 202 – 210.

*Семенова И. Н., Ильбулова Г. Р., Суюндуков Я. Т.* Изучение эколого-трофических групп почвенных микроорганизмов в зоне влияния горнорудного производства // Фундаментальные исследования. 2011. № 11. С. 410 – 414.

*Сорокина О. А., Павлова Л. М., Киселев В. И.* Влияние подвижных форм тяжелых металлов на микробиологическую активность почвогрунтов россыпной золотодобычи (на примере долины реки Джалинды, Приамурье) // Сиб. экол. журн. 2008. № 3. С. 473 – 484.

*Степанов А. Л., Цветкова О. Б., Паников С. Н.* Изменение структуры микробного сообщества под влиянием нефтяного и радиоактивного загрязнения // Почвоведение. 2012. № 12. С. 1320 – 1324.

*Умаров М. М., Азиева Е. Е.* Некоторые биохимические показатели загрязнения почв тяжелыми металлами // Тяжелые металлы в окружающей среде. М. : Изд-во МГУ, 1980. С. 109 – 115.

*Blum W. E. H., Eswaran H.* Soils for sustaining global food production // J. Food Science. 2004. Vol. 69, № 2. P. 37 – 42.

*Brooks P. C.* The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals // Biology and Fertility of Soils. 1995. Vol. 19, iss. 4. P. 269 – 279.

*Chen G., Lu W., Wang S., Wu Y., Wan G.* A comparative study on the microbiological characteristics of soils under different land use conditions from karst areas of southwest China // Chinese J. Geochemistry. 2001. Vol. 20, iss. 1. P. 52 – 58.

*Gadd G. M.* Interaction of fungi with toxic metals // New Phytologist. 1993. Vol. 124, iss. 1. P. 25 – 60.

*Giller K. E., Witter E., Mcgrath S. P.* Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils : A review // Soil Biology and Biochemistry. 1998. Vol. 30, iss. 10–11. P. 1389 – 1414.

Global Environmental Monitoring System (GEMS) : Action Plan for Phase I. SCOPE Rep. 3, Toronto, 1973. 132 p.

*Lorenz K., Kandeler E.* Microbial biomass and activities in urban soils in two consecutive years // J. Plant Nutrition and Soil Science. 2006. Vol. 169, iss. 6. P. 799 – 808.

*Zhao D., Li F., Yang Q., Wang R., Song Y., Tao Y.* The influence of different types of urban land use on soil microbial biomass and functional diversity in Beijing, China // Soil Use and Management. 2013. Vol. 29, № 2. P. 230 – 239.