

Численность и разнообразие почвенных актиномицетов вблизи объекта по уничтожению химического оружия «Марадыковский»

© 2012. Т. Я. Ашихмина¹, д.т.н., зав. лабораторией,

Е. В. Товстик², аспирант, С. Ю. Огородникова¹, к.б.н., с.н.с.,

Е. А. Домнина¹, к.б.н., доцент, И. Г. Широких^{1,2}, д.б.н., в.н.с.,

¹Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН,

²Зональный научно-исследовательский институт сельского хозяйства Северо-Востока им. Н. В. Рудницкого Россельхозакадемии,
e-mail: irgenal@mail.ru

Изучены численность, разнообразие и структура комплексов актиномицетов в почвах лесных и луговых биомов вблизи объекта хранения и уничтожения химического оружия «Марадыковский». Показаны количественные и качественные изменения в составе актиномицетных комплексов за период деятельности объекта с 2007-го по 2012 г., обусловленные как естественными, так и техногенными факторами.

We consider size, diversity and structure of actinomycetes complexes of in forest and grassland biomes soil near the chemical weapons decommission plant «Maradykovsky». Quantitative and qualitative changes in aktinomitsetnyh complexes are shown the in the plant operation from 2007 to 2012, caused by both natural and man-made factors.

Ключевые слова: почвы, комплекс актиномицетов, уничтожение химического оружия, биодиагностика

Keywords: soil, actinomycetes complex, chemical weapons decommission, biodiagnostics

Введение

В связи с реализацией процесса уничтожения химического оружия (УХО), осуществляемого в соответствии с международной Конвенцией [1], особую актуальность приобретает проблема контроля над поступлением отравляющих веществ и продуктов их деструкции в различные объекты окружающей среды, включая почву. Объекты, организованные для реализации процесса УХО, относят к числу объектов повышенной техногенной опасности для природных комплексов и экосистем [2]. Несмотря на исключение возможности прямого загрязнения почвы при штатном функционировании объектов хранения и уничтожения химического оружия (ОХУХО), остаётся возможность опосредованного загрязнения почвы за счёт осаждения токсичных веществ из воздуха. В связи с этим обязательным условием контроля за безопасным уничтожением химического оружия является биологический мониторинг прилегающих к ОХУХО территорий. Биомониторинг позволяет получить, наряду с инструментальными методами, объективные сведения об экологическом состоянии природных комплексов [3].

В силу большого разнообразия биохимических функций и высокой чувствительности к изменениям среды перспективны в биоиндикации возникающих нарушений почвенные микроорганизмы [3 – 7]. Под влиянием техногенного загрязнения в почве может происходить изменение структуры сообществ, поскольку в его состав входят микроорганизмы с разной физиологической толерантностью. Почва, обладая благодаря принципу дублирования и полифункциональности видов значительной буферностью, сохраняет до определённого предела воздействий свои биологические свойства (состояние гомеостаза). Однако изменения в структуре комплексов почвенных микроорганизмов уже поддаются обнаружению и могут свидетельствовать об испытываемом экосистемой состоянии стресса, хотя в целом микробное сообщество остаётся таким же функциональным, как и до воздействия стрессора. При значительном уровне загрязнения в сообществах почвенных микроорганизмов происходят необратимые изменения, указывающие на исчерпание микробной системой почвы запаса своей прочности [8]. Таким образом, структура микробного сообщества, т. е. набор отдельных элементов (например, так-

сонов), их относительное обилие, пространственное и временное расположение, а также взаимосвязь между ними имеют для биоиндикационных целей существенное значение.

В почвенной микробиологии из-за ряда методических трудностей анализ структуры микробного сообщества становится возможным только после выделения в качестве объекта какой-либо группы популяций, учитываемых конкретным методом. В данной работе мы попытались проанализировать индикаторную ценность параметров комплексов почвенных актиномицетов. Накопленные данные, характеризующие актиномицетные комплексы в различных экосистемах, позволяют перейти к выявлению влияния на них различных видов техногенных воздействий [9 – 11].

Целью данной работы было изучение численности, разнообразия и структуры комплексов почвенных актиномицетов для оценки состояния почв луговых и лесных биоценозов за период деятельности ОХУХО в режиме уничтожения отравляющих веществ.

Объекты и методы

Объектами исследования служили образцы почв, отобранные на площадках системы государственного экологического мониторинга (ГЭМ) в санитарно-защитной зоне (СЗЗ) ОХУХО «Марадыковский». Отбор образцов произведён из верхних почвенных горизонтов на глубину 0–20 см, включая толщу подстилки или дернины, летом 2007, 2008, 2011, 2012 гг.

Участки отбора образцов расположены на различном удалении от объекта ОХУХО, в северо-восточном, восточном, юго-восточном и южном направлениях в соответствии с розой ветров и приурочены к лесным и луговым фитоценозам (табл. 1).

Учёт численности почвенных актиномицетов проводили методом поверхностного посева из разведений почвенных суспензий на среду с пропионатом натрия. Для селективного ограничения роста немиецелиальных бактерий и грибов почву прогревали при 70 °С и в среду дополнительно вводили 50 мкг/мл нистатина. Чашки с посевами инкубировали в термостате при 27 °С в течение 10–12 суток и при комнатной температуре до трёх недель. Проводили дифференцированный подсчет колоний, выделяя по морфологическим признакам четыре морфотипа, соответствующих родам *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Streptosporangium* и группе олигоспоровых родов.

К роду *Streptomyces* предварительно относили представителей, имеющих цепочки спор на воздушном мицелии и нефрагментированный субстратный мицелий. Культуры, имеющие одиночные споры на субстратном мицелии, отсутствие или слабое развитие стерильного воздушного мицелия, предварительно относили к роду *Micromonospora*. Культуры, принадлежащие к роду *Streptosporangium*, определяли по наличию ветвящегося, нефрагментированного субстратного мицелия, не несущего споры, и воздушных гиф с цепочками спор и спорангиями. В группу олигоспоровых родов объединяли представителей, образующих одиночные споры, либо короткие цепочки более крупных по размеру спор на ветках воздушного мицелия [12].

Структуру комплекса актиномицетов характеризовали на основании показателей частоты встречаемости [9] отдельных представителей: доминирующие ($\geq 85\%$), типичные частые ($\geq 60\%$), типичные редкие ($\geq 40\%$) и случайные ($< 40\%$). Для оценки родового разнообразия актиномицетов использовали индекс Шеннона [13].

Таблица 1

Характеристика участков отбора образцов почвы для анализа

Тип фитоценоза	Тип почвы	От объекта		№ участка в системе ГЭМ
		расстояние, км	направление	
Лес	Среднеподзолистая песчаная	3,12	С-В	34
	Сильно подзолистая супесчаная	2,75	С-В	36
Луг	Дерново-слабоподзолистая супесчаная	6,24	В	84
		1,15	С-В	3
	Дерново-подзолистая супесчаная	3,96	Ю-В	60
	Дерново-подзолистая легкосуглинистая	2,72	Ю	43
	Дерново-подзолистая среднесуглинистая	2,77	В	39

Данные обработаны стандартными методами статистического анализа [14] с использованием программ STATGRAFICS и EXEL 7.

Результаты и обсуждение

Общая численность актиномицетов при учёте на среде с пропионатом натрия варьировала в исследуемых почвах в пределах двух порядков (от $1,8 \times 10^4$ до $1,9 \times 10^6$ КОЕ/г) в зависимости от типа фитоценоза и времени отбора образца (табл. 2). Почвы луговых фитоценозов отличались от почв под лесом существенно более высокой численностью мицелиальных прокариот как в начальный период наблюдений (2007–2008 гг.), так и по прошествии пяти-шести лет деятельности ОХУХО в режиме уничтожения ХО (2011–2012 гг.). Общей тенденцией для тех и других почв явилось увеличение в 2012 году общей численности актиномицетов в почвах лесов в 4,2–16,1 раза, в почвах под лугами – в 1,9–4,5 раза по сравнению с началом наблюдений. Эти результаты согласуются с общей тенденцией к доминированию в микробных сообществах техногенно-загрязнённых почв микроорганизмов с K-стратегией [15].

Возможность выявить те биологические эффекты, которые вызваны техногенным воздействием на почву, затруднена в природных экосистемах многочисленностью сопутствующих естественных факторов. Для более корректной интерпретации получаемой в процессе мониторинга информации необходимо разграничение изменчивости почвенного микробного комплекса, обусловленной естественными и техногенными причинами. С помощью многофакторного дисперсионного анализа проводили оценку влияния на параметры актиномицетных комплексов таких факторов, как тип фитоценоза (фактор А), год пробоотбора (фактор В), направление от объекта, сопряжённое с особенностями почвенного покрова (фактор С), и удалённость от объекта (фактор D) (табл. 3). При этом факторы А и С подразумевались как естественные, а факторы В и D рассматривались как техногенные, действующие во времени и пространстве соответственно. Наибольшее влияние на общую численность актиномицетов в ряду сопряжённых почв лесных и луговых угодий оказал фактор С, связанный с почвенной разностью ($F=82,51$; $p \geq 0,0000$). Вторым по силе влияния на варьирование численности актиномицетов оказался фактор «год пробоотбора» ($F=58,52$; $p \geq 0,0000$). Влияние фактора «удалённость от

объекта», хотя и оценивалось как достоверное ($F=3,70$; $p \geq 0,0056$), уступало остальным рассматриваемым факторам.

Комплексы почвенных актиномицетов в исследуемых почвах были представлены родами *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Streptosporangium* и олигоспоровыми видами. Уже в начальный период наблюдений обратила на себя внимание необычная для зональных почв структура комплексов, при которой все входящие в его состав представители имеют одинаково высокую частоту встречаемости (80–100%) и, следовательно, относятся к доминантам (табл. 2). Такая структура доминирования, как было показано ранее [8, 15], характерна для нарушенных местообитаний и может являться следствием техногенного загрязнения почв до начала уничтожения ХО в 2006 г.

За период деятельности объекта в режиме уничтожения ХО значительных изменений по частоте встречаемости стрептомицетов, микромоноспор и стрептоспорангиумов в почвенных комплексах не выявлено. Изменилась в ту или другую сторону лишь частота встречаемости олигоспоровых видов, среди которых, по-видимому, могут иметь место специфические индикаторы данного химического загрязнения. Вместе с тем другой показатель экологической структуры актиномицетного комплекса – относительное обилие родов – достоверно изменялся в зависимости от времени отбора образца почвы. Так, для стрептомицетов долевое участие в комплексе возросло ($F=99,55$; $p \geq 0,0000$) за период уничтожения ХО, а для микромоноспоровых актиномицетов, напротив, существенно ($F=30,8$; $p \geq 0,0000$) снизилось (табл. 3). Особенно отчетливо эта тенденция прослеживается на примере лесных экосистем. В 2007 году относительное обилие в почвенных комплексах стрептомицетов составляло менее 10%, микромоноспор – 46–65%, а в 2012 году относительное обилие стрептомицетов возросло до 53,7–66,8%, при снижении обилия микромоноспор до 20–28% от общего числа актиномицетов (табл. 2). Аналогичные изменения произошли и в комплексах актиномицетов почв луговых угодий. Выявленное в 2012 г. (и в 2011 г. для участков 39 и 60) соотношение между представителями родов *Streptomyces* и *Micromonospora* (>1) соответствует типичной структуре комплексов актиномицетов в зональной дерново-подзолистой почве [16], тогда как это же соотношение, зафиксированное в 2007–2008 гг. (<1), должно расцениваться как отклонение от нормы. Показатели относительного обилия

Таблица 2

Характеристика комплексов актиномицетов, выделяемых на среде с пропионатом натрия

Тип фитоценоза	№ участка	Год отбора образца	Общая численность, тыс. КОЕ/г	Частота встречаемости/долевое участие родов, %				Разнообразие, Н%
				1	2	3	4	
Лес	36	2007	18,0±2,3	100/7,7	100/65,2	100/9,9	100/17,2	1,40±0,16
		2012	290,5±65,4	100/66,8	100/20	100/13,1	40/0,1	1,23±0,13
	34	2007	104,7±49,3	80/9,1	100/46,1	100/44,2	20/0,6	1,33±0,22
		2012	435,0±144,1	100/53,7	100/28,0	100/16,9	80/1,4	0,50±0,08
Луг	43	2007	603,4±100,9	100/35,8	100/56,3	100/0,8	100/7,1	1,31±0,07
		2012	1573±413,7	100/65,7	100/26,5	100/5,0	100/2,8	1,23±0,17
	84	2008	602,2±70,7	100/23,6	100/63,7	60/1,0	100/2,7	1,12±0,18
		2012	1271,4±170,4	100/74,8	100/22,1	100/2,5	80/0,6	0,94±0,13
Луг	3	2007	60,7±28,9	80/16,5	100/42,8	100/30,8	60/9,9	1,51±0,44
		2012	278,6±42,4	100/46,9	100/45,7	100/7,4	0/0	1,28±0,10
	39	2011	953,2±163,1	100/72,4	100/25,0	100/1,4	80/0,9	0,99±0,11
		2012	1902,8±132,9	100/67,0	100/26,2	100/6,2	80/0,6	1,19±0,04
60	2011	871,8±71,8	100/58,1	100/35,5	100/4,6	100/1,8	1,29±0,01	
	2012	1902,8±132,9	100/58,5	100/38,8	100/2,2	60/0,5	1,12±0,06	

Таблица 3

Оценка степени влияния факторов на комплекс почвенных актиномицетов

Источник варьирования	df	SS	F	p
Относительное обилие стрептомицетов				
Тип фитоценоза (фактор А)	1	337,4	4,48	0,0383
Год пробоотбора (фактор В)	3	22470,8	99,55	0,0000
Направление от объекта (фактор С)	2	2730,5	18,14	0,0000
Удалённость от объекта (фактор D)	1	325,3	4,32	0,0418
Относительное обилие микромоноспор				
Тип фитоценоза (фактор А)	1	85,8	0,78	0,3791
Год пробоотбора (фактор В)	3	3369,1	30,83	0,0000
Направление от объекта (фактор С)	2	498,7	4,56	0,0142
Удалённость от объекта (фактор D)	1	19,1	0,17	0,6776
Относительное обилие стрептоспорангиумов				
Тип фитоценоза (фактор А)	1	6,9	0,08	0,7730
Год пробоотбора (фактор В)	3	1197,9	4,86	0,0043
Направление от объекта (фактор С)	2	1854,6	4,28	0,0001
Удалённость от объекта (фактор D)	1	549,5	6,69	0,0121
Относительное обилие олигоспоровых актиномицетов				
Тип фитоценоза (фактор А)	1	35,16	1,60	0,2112
Год пробоотбора (фактор В)	3	510,73	7,72	0,0002
Направление от объекта (фактор С)	2	31,43	0,71	0,4943
Удалённость от объекта (фактор D)	1	119,16	5,40	0,0234
Общая численность актиномицетов				
Тип фитоценоза (фактор А)	1	7,93	0,00	0,9925
Год пробоотбора (фактор В)	3	1,59	58,52	0,0000
Направление от объекта (фактор С)	2	1,49	82,51	0,0000
Удалённость от объекта (фактор D)	1	334656,0	3,70	0,0056
Разнообразие актиномицетов				
Тип фитоценоза (фактор А)	1	0,0016	0,05	0,8316
Год пробоотбора (фактор В)	3	0,1025	0,95	0,4215
Направление от объекта (фактор С)	2	0,5009	6,98	0,0019
Удалённость от объекта (фактор D)	1	0,0016	0,05	0,8321

Примечание: df – число степеней свободы, SS – сумма квадратов, F – критерий Фишера, p – уровень значимости.

в комплексе изменялись в период наблюдений и для стрептоспорангиумов и олигоспоровых актиномицетов. Однако эти изменения минорных компонентов актиномицетного комплекса носили разнонаправленный характер, в зависимости от типа фитоценоза, почвенной разности и удалённости от объекта (табл. 3). Многофакторный дисперсионный анализ показал, что на долевое участие в комплексе рода *Streptosporangium* наибольшее влияние оказал фактор «удалённость от объекта» ($F=6,69$; $p \geq 0,0121$). При этом высоким (11,6%) обилием данного рода отличалась почва на расстоянии ≥ 3 км от объекта. Влияние факторов «год пробоотбора» и «направление от объекта» на относительное обилие стрептоспорангиумов оценивалось также как достоверное, но менее значимое.

Наибольшее влияние на относительное обилие олигоспоровых актиномицетов в комплексе оказал фактор «год пробоотбора». Долевое участие олигоспоровых актиномицетов в комплексе снижалось от 5,7% в 2008 г. до 1,4 % в 2012 г.

За период уничтожения ХО на объекте в прилегающих к нему лесных и луговых фитоценозах, за редким исключением (табл. 2, участок 34), не выявлено достоверного сокращения родового разнообразия почвенных актиномицетов. Достоверное ($F=6,98$; $p \geq 0,0019$) влияние на разнообразие актиномицетного комплекса оказал фактор С, т. е. природная разновидность почвы. Это может указывать на более высокую, в сравнении с другими группами микроорганизмов, физиологическую толерантность актиномицетов

к возможным в зоне влияния ОХУХО химическим загрязнителям.

Заключение

Таким образом, варьирование уровня численности, разнообразия, структуры комплекса актиномицетов в ряду прилегающих к УХО почв вызвано как природными (тип фитоценоза, почвенная разность), так и техногенными (продолжительность воздействия и удалённость от объекта) причинами.

Общая численность и разнообразие актиномицетов определялись, в первую очередь, той почвенной разностью, в условиях которой происходило формирование комплекса. Кроме того, на общую численность актиномицетов оказали существенное влияние продолжительность техногенного воздействия и удалённость от объекта. Влияние продолжительности воздействия на почву многократно превосходило влияние фактора пространственной удалённости от объекта не только в отношении показателя общей численности актиномицетов, но и в отношении относительного обилия представителей родов *Streptomyces* и *Micromonospora*. Вместе с тем варьирование долевого участия стрептомицетов и микромоноспор достоверно зависело и от природных факторов, тогда как доленое участие стрептоспорангиумов и олигоспоровых актиномицетов в комплексе определялось в основном техногенными факторами.

В целом, оценка экологического состояния почв лесных и луговых биомов не выявила на уровне мицелиальных прокариот драматических последствий деятельности объекта в режиме уничтожения ХО (за период до 2012 г.). Комплекс почвенных актиномицетов претерпел перестройки, заключающиеся в повышении общей численности и изменении соотношения по обилию доминантных родов (стрептомицетов и микромоноспор), а также в изменении относительного обилия минорных компонентов комплекса. Полученная информация о состоянии микробной системы почв различного хозяйственного назначения может быть использована для дальнейшего мониторинга в зоне возможного влияния объекта ОХУХО, а также для своевременного принятия решений о характере использования почв или выведении их из активного оборота.

Литература

1. Конвенция о запрещении химического оружия. Проблемы ратификации // Химическое оружие и проблемы его уничтожения. 1996. № 2. С. 5–9.
2. Ашихмина Т.Я. Комплексный экологический мониторинг объектов хранения и уничтожения химического оружия. Киров: Вятка, 2002. 544 с.
3. Ашихмина Т.Я., Домрачева Л.И., Домнина Е.А., Кантор Г.Я., Кочурова Т.И., Кондакова Л.В., Огородникова С.Ю., Олькова А.С., Панфилова И.В. Система биологического мониторинга компонентов природной среды в районе объекта хранения и уничтожения химического оружия «Марадыковский» Кировской области // Теоретическая и прикладная экология. 2008. № 4. С. 32–38.
4. Биологический мониторинг природно-техногенных систем/Под общ. ред Т.Я. Ашихминой, Н.М. Алалыкиной. Сыктывкар: Коми научный центр УрО РАН, 2011. 388 с.
5. Свирскене А. Микробиологические и биохимические показатели при оценке антропогенного воздействия на почвы // Почвоведение. 2003. № 2. С. 202–210.
6. Brooks P.C. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals// Biol. Fertil. Soils. 1995. V. 19. P. 269–279.
7. Stenberg B. Monitoring soil quality of arable land: microbiological indicators // Acta Agriculture Scandinavica. 1999. V. 49. P 1–24.
8. Биоиндикация загрязнений наземных экосистем / Под ред. Р. Шуберта. М.: Мир, 1988. 348 с.
9. Звягинцев Д.Г., Зенова Г.М. Экология актиномицетов. М: ГЕОС, 2001. 257 с.
10. Гришко В.Н., Сыщикова О.В. Сообщества актиномицетов рода *Streptomyces* в почвах, загрязнённых тяжёлыми металлами // Почвоведение. 2009. № 2. С. 235–243.
11. Гришко В. Н., Сыщикова О. В. Структурно-функциональные особенности сообщества актиномицетов в некоторых чернозёмах и засоленных почвах Украины // Почвоведение. 2010. №2. С. 221–228.
12. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т./ Под ред. Дж. Хоулт, Н. Криг, П.Снит, Дж. Стейли, С. С. Уилльямс. М.: Мир, 1997. Т. 2. 800 с.
13. Мэггаран Э. Экологическое разнообразие и его измерение. М.: Мир, 1992. 173 с.
14. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа. 1990. 352с.
15. Благодатская Е. В., Пампура Т. В., Богомолова И. Н., Копчик Г. Н., Лукина Н. В. Влияние выбросов медно-никелевого комбината на микробные сообщества почв лесных биогеоценозов Кольского полуострова // Известия РАН. Сер. биологическая. 2008. № 2. С. 232–242.
16. Широких И.Г., Широких А.А. Микробные сообщества кислых почв Кировской области. Киров: НИИСХ С-В., 2004. 332 с.