

Тастамбек К.Т.,
Акимбеков Н.Ш.,
Ерназарова А.К.,
Кайырманова Г.К.,
Абдиева Г.Ж., Уалиева П.С.,
Жубанова А.А.

Казахский национальный
университет имени аль-Фараби,
Казахстан, г. Алматы

Изучение микробного разнообразия в пробах воды и почвы Атырауской и Мангистауской областей

В настоящее время в населенных пунктах и сельских округах почва и вода существенно отличаются от объектов естественных экосистем. Несомненно, что антропогенное загрязнение природной среды диктует необходимость разработки новых достоверных, краткосрочных и легко воспроизводимых методов оценки токсичности почв и воды – важнейших компонентов окружающей среды. Данная работа посвящена изучению микробного разнообразия в пробах почв и воды Атырауской и Мангистауской областей. По результатам экспериментального определения микробного пейзажа в пробах Атырауской и Мангистауской областей установлено, что качественный состав весьма однообразен, а численность микроорганизмов в этих образцах не превышает 10⁴ КОЕ/г. Все это свидетельствует о том, что бактериальный пейзаж в изучаемом регионе относительно беден как по количественному, и качественному составу, что, несомненно, отрицательно влияет на процессы природного самоочищения почвенных экосистем, поскольку для бактериальных групп в качестве условного критерия количества принята величина не менее 1 млн. клеток на 1 г субстрата, т.е. только при такой численности они могут иметь главное экологическое значение. Результаты, полученные при изучении количества микробных сообществ и оценки загрязнения среды Западного региона РК, могут быть использованы в научных целях и при составлении учебных материалов по экологии и биотехнологии окружающей среды.

Ключевые слова: микробное разнообразие, пробы почвы и воды, техногенное воздействие, экология, биотест.

Tastambek K.T.,
Akimbekov N.Sh.,
Yernazarova A.K.,
Kaiymanova G.K.,
Abdieva G.Zh., Ualieva P.S.,
Zhubanova A.A.

Al-Farabi Kazakh National University,
Almaty, Kazakhstan

The evaluation of microbial diversity in water and soil samples from Atyrau and Mangystau regions

The soil as a natural resource and the habitat of microbial diversity has a number of global functions in the biosphere. Under the impact of unregulated industrial activity of human in the process of fulfillment of social-economic processes soil and water undergo a range of changes that lead to soil erosion, degradation and water pollution. High levels of human activities to the environment is particularly apparent in the urban areas. Currently, the soil and water in settlements and rural districts are significantly different from those in natural ecosystems. There is no doubt that anthropogenic pollution of the environment dictates the need to develop new reliable, short-term and replicable methods to assess the toxicity of soil and water, which is major environmental components. The study is devoted to evaluate microbial diversity in soil and water samples from Atyrau and Mangystau regions, Kazakhstan. According to the results, the microbial landscape in samples from Atyrau and Mangystau regions showed that the qualitative composition is rather monotonous, and the number of microorganisms in these samples does not exceed 10⁴ CFU/g. All this testifies to the fact that the bacterial landscape in the concerned region is relatively poor both in quantitative and qualitative composition, which undoubtedly negatively influence on the processes of natural self-purification of soil ecosystems, as for bacterial groups as a conditional number of criteria adopted by the value should be not less than 1 million cells in 1 g of the substrate, i.e. only such number of microbes may have important ecological value.

Key words: microbial diversity, soil, water, anthropogenic impact, ecology, bioassay.

Тастамбек Қ.Т.,
Акимбеков Н.Ш.,
Ерназарова А.К.,
Кайырманова Г.К.,
Абдиева Г.Ж., Уалиева П.С.,
Жубанова А.А.

Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық
университеті, Қазақстан, Алматы қ.

Атырау мен Маңғыстау өңірлерінің су мен топырақ үлгілеріндегі микробтық алуантүрлілікті зерттеу

Ғылыми жұмыс Атырау мен Маңғыстау өңірлерінен әкелінген су мен топырақ үлгілеріндегі микробтық алуантүрлілікті зерттеуге арналған. Маңғыстау және Атырау облыстарының топырақ сынақтарында микробтарды эксперимент ретіндегі қорытындысы бойынша микробты көріністің сапалық көрінісі едәуір біркелкі, ал осы үлгідегі микроағзалардың саны 10⁴ КОЕ/г аспайды деп анықталды. Осыдан зерттелген аймақтағы бактериалды көрініс саны және сапалық құрамы жағынан жұтаң екенін, топырақ экожүйелерінің табиғи өзін-өзі тазарту үрдісіне теріс ықпал ететінін байқаймыз, себебі, сандық критерийдің шартты сапасындағы бактериалды топтар үшін шамасы 1 г субстрат үшін 1 млн жасушалардан төмен болмауы тиіс, тек осы сандық жағдайда ғана олардың басты экологиялық маңызы бола алады.

Түйін сөздер: микробтық алуантүрлілік, топырақ пен су сынақтары, техногенді әсер, экология, биотест.

**ИЗУЧЕНИЕ
МИКРОБНОГО
РАЗНООБРАЗИЯ
В ПРОБАХ ВОДЫ И
ПОЧВЫ АТЫРАУСКОЙ
И МАНГИСТАУСКОЙ
ОБЛАСТЕЙ**

Введение

В современных условиях при постоянно растущем вредном воздействии техногенных факторов на природную среду биотестовые системы оценки занимают промежуточную нишу между индикаторными и количественными способами оценки поллютантов, позволяя быстро определить потенциально опасные уровни контаминации. Среди особых преимуществ биоиндикации следует отметить то, что они чувствительны к большому спектру химических компонентов и позволяют фиксировать негативные изменения в окружающей среде при низких концентрациях поллютантов. Основным положительным моментом применения биотестов является и то, что оценка реакции живого организма позволяет выявить характер и уровень техногенного воздействия на среду в показателях, имеющих биологический смысл и потому дополняющих цельную картину изменений, происходящих в экосистемах [1-2].

Следует отметить, что биологические и, в частности, микробиологические методы индикации и тестирования загрязнений воды и почв природных и антропогенных экосистем различными ксенобиотиками не используются в полной мере. В то время, как именно их использование может позволить наиболее точно оценить состояние биоценоза *in situ* в короткие сроки, а также прогнозировать динамику возможных изменений в природных популяциях в таких условиях с течением времени [3-6].

В связи с этим, подбор краткосрочных тест-систем на основе биологических объектов, позволяющих быстро и эффективно проводить оценку интегральной токсичности таких объектов внешней среды, как вода и почвы, является актуальным. Важно и то, что тест-системы на основе «биобатарей» и «биокассет» позволяют определить не только уровень токсичности воды и почв, но и являются полезным инструментом для наблюдения и оценки процессов, протекающих в природе как при ее загрязнении, так и при ее ремедиации. Это означает, что результаты, полученные в ходе биотестирования, будут полезны при разработке мер, необходимых для проведения ремедиационных процедур на загрязненных территориях. Одним из перспективных методов определения суммарного эффекта

воздействия токсикантов на объекты природной среды является биотестирование состояния биообъектов с помощью тест-систем. При этом важно то, что методы оценки состояния объектов окружающей среды методами биотестирования являются экспрессными и не требуют больших финансовых затрат.

Методы оценки интегральной токсичности образцов почв и воды при помощи высших организмов хорошо известны. Так, в исследованиях почв широко используются растения, а воды – различные водоросли. Однако, для оценки токсичности объектов окружающей среды необходимо регистрировать ответную реакцию не только высших организмов, но и микроорганизмов, поскольку изучение их специфических реакций при использовании с целью биотестирования состояния водной и почвенной сред могут дать целый ряд преимуществ, по сравнению с реакциями растений и беспозвоночных.

Как известно, ответные реакции бактерий на внешние факторы наступают быстро, поскольку они весьма восприимчивы к воздействиям, касающихся различных сторон их жизнедеятельности – роста, аккумуляции химических элементов, активности метаболических и физиологических процессов.

Важно и то, что высокая интенсивность процессов роста и размножения микроорганизмов при наличии соответствующих хорошо воспроизводимых методов оценки различных параметров их роста и метаболизма дает возможность выявлять их ответ на воздействие любого экологического фактора воздействия изменения в динамике на протяжении многих лет.

В этой связи, исследования, направленные на выявление таких микробных биообъектов и разработку хорошо воспроизводимых методов, характеризующих их ответную реакцию на различные виды контаминации, являются перспективными для мониторинга экологического состояния водных и почвенных сред.

В основе микробных методов, направленных на определение интегральной токсичности факторов, воздействующих на окружающую среду, лежит возможность регистрации в динамике разнообразных показателей микробного метаболизма, таких как: общая численность водных и почвенных микроорганизмов, численность отдельных видов, принадлежащих к различным экологическим и физиологическим группам, их соотношение, а также биохимические и физиологические особенности определенных групп микроорганизмов.

Первый способ заключается в изучении изменения разнообразных показателей микробного фона, их ответной реакции на действие внешних факторов среды в природных условиях, а также при текущем контроле микробной популяции. При этом, при мониторинге микробных пейзажей природных объектов используются различные характеристики, такие, как общая микробная численность, численность популяций и биохимические особенности отдельных видов микроорганизмов разных экологических и физиологических групп, их соотношение.

Ко второму способу относятся те исследования, где изолированная, чистая лабораторная культура определенного микроорганизма выполняет роль тест-объекта: по изменению показателей процессов жизнедеятельности этой культуры экспериментатор может судить как о токсичности почвы и воды в целом, так и о токсических свойствах и степени токсичности какого-либо конкретного загрязнителя.

Одной из принципиально важных задач в области защиты окружающей среды является разработка и создание эффективных способов оценки антропогенного воздействия на биосферу с целью ограничения (исключения) ее токсического загрязнения и обеспечения нормального функционирования экосистем. Среди различных видов загрязнений наибольшую опасность для водных и почвенных биоценозов представляют поллютанты, которые вызывают необратимые изменения в биологических структурах и их функционировании.

Мониторинг загрязнения биосферы показывает, что основными источниками поступления хемотоксикантов в окружающую среду являются сельскохозяйственные, промышленные, коммунально-бытовые объекты. Количественное определение отдельных загрязняющих веществ не позволяет оценить степень биологической опасности для организмов смесей химических веществ, поступающих в окружающие объекты, из-за разнообразного характера их взаимодействия, образования комплексных поллютантов, появления в процессе разложения исходных, более токсичных соединений.

Одним из основных направлений совершенствования системы мониторинга качества природных объектов является применение в мониторинге источников токсического загрязнения почвенных и водных экосистем методов биотестирования, позволяющих в интегральной форме определить токсичность почв и воды и их биологическую безопасность.

Применение естественной микробиоты для оценки качества природных объектов, контроль параметров ее жизнедеятельности является традиционным, широко применяемым методическим приемом, поэтому большинство научных публикаций посвящены именно этому методическому подходу. С целью мониторинга степени влияния обширного ареала загрязняющих и поражающих контаминантов, при оценке качества воды и почвы используется текущий контроль за изменением структуры и состава микробных популяций природных объектов как для отдельных таксономических, так и для отдельных трофических групп микробных сообществ.

Материалы и методы

Отбор проб воды проводился в соответствии с ГОСТ 17.1.5.05-85 «Общие требования к отбору проб поверхностных и морских вод» в весенний период. Пробы морской и речной воды отбирались стандартным батометром в чистые пластиковые емкости и стеклянные емкости.

Пробы морской и речной воды отбирались в следующих точках (рис. 1):

По Актаускому региону:

- вода до обработки МАЭК,
- морская вода,
- питьевая вода.

По Жанаозенскому региону:

- вода до обработки,
- артезианская вода.

По Мангистаускому региону:

- водоемы хозяйства «Улан»,
- водоемы близ г. Кульсары,
- хозяйство «Исаев», Индерский район.

Отбор проб почв производился на территориях с предполагаемо разной, по отношению друг к другу, техногенной нагрузкой (в рабочей зоне промышленных предприятий, на наиболее нагруженной транспортной магистрали, в предполагаемо чистом месте).

Для анализа пробы почвы отбирались в следующих точках:

- Мангыстауский регион,
- Атырауский регион,
- Жанаозенский регион.

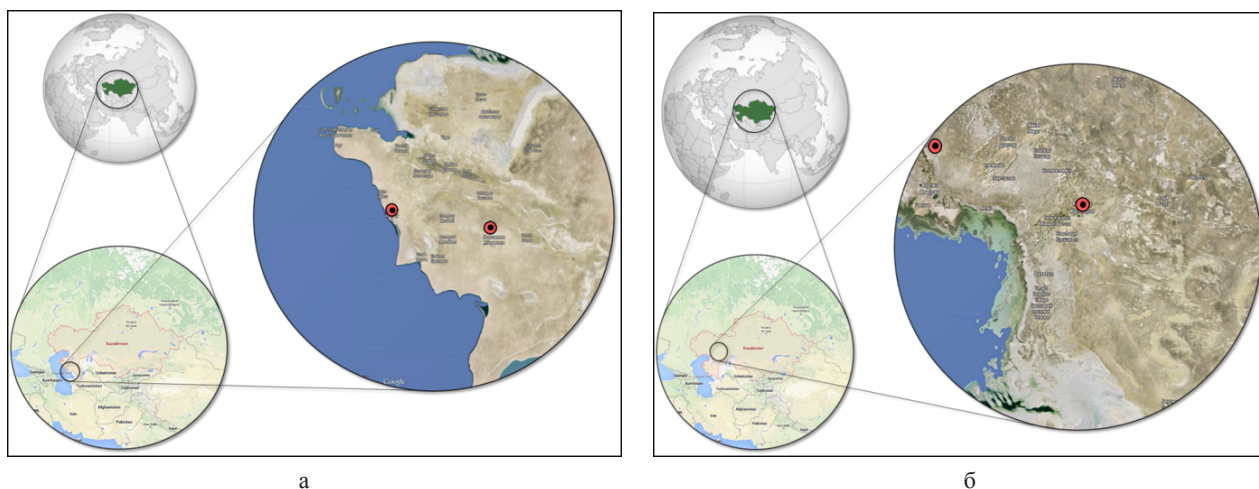


Рисунок 1 – Место нахождения точки отбора проб для анализа:
а – по Мангистаускому региону, б – по Атыраускому региону

Отбор почвенных проб велся по методике, соответствующей условиям ГОСТ 14.4.4.02.-84., ГОСТ-29269-91, по т.н. методу «конверта» с почвенных горизонтов 1 (от 0 до 5 см глубиной) и 2 (от 5 до 25 см глубиной) при помощи стандартной очищенной ботанической копалки (лопаточки).

Отобранные таким образом в каждой из 5-ти микроточек образцы грунта переносились на

пергамент (или полиэтилен, газета), где тщательно перемешивались, освобождались от крупных включений и механических примесей (камней, мусора) и т.д.

Для микробиологического анализа брали 1 г почвы, увлажняя ее до состояния пасты и растирали в ступке в течение 3 мин. Суспензию готовили в 100 мм стерильной воды, затем проводили высев на плотные питательные среды.

Численность микробов определяли методом посева на селективные плотные среды. Также для определения микробного состава пробы воды высевали на эти питательные среды.

Количество бактерий, использующих органический азот и некоторые группы микроорганизмов, использующих минеральный азот, учитывали на TSA (Tryptone soya agar) и MIA (Meat infusion agar), энтеробактерий на дифференциально-диагностической среде эндо, все виды группы *Pseudomonas* на PIA (*Pseudomonas isolation agar*). Количество грибов и дрожжей учитывали на селективной среде SDA (*Sabouraud dextrose agar*).

Засеянные чашки инкубировали при 30°C и 37°C. Морфологию клеток культур микроорганизмов изучали методами световой микроскопии при помощи стереоскопическо-тринокулярного микроскопа MicroOptix MX-1150 (T) (увеличении 1250). Колонии бактерий учитывали на 2-3 сутки, дрожжей и грибов – 5-7 сутки. При посевах использовали разведения 1:10² и 1:10⁴. Посчитав количество колоний микроорганизмов на 4 параллельных чашках, определяли среднее арифметическое количество колоний.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследований по определению почвенных и водных микроорганизмов свидетельствуют, что во всех исследованиях проб в достоверном количестве были обнаружены жизнеспособные микроорганизмы (таблица 1). При сравнении количественного состава микроорганизмов при их культивировании на разных питательных средах выявились такие особенности:

- в больших количествах были обнаружены бактерии на среде MIA и TSA, в меньшем количестве на других средах,

- численность микроорганизмов в разных пробах воды колебалась в пределах от 10² до 10⁵ КОЕ/г,

- наибольшая численность бактерий отмечена на среде MIA в пробе воды, взятой из хозяйства «Исаев», Индерского района,

- из трех типов исследованных проб воды наименее насыщенной гетеротрофными бактериями оказалась вода из водоема хозяйства «Улан».

Таблица 1 – Численность различных групп микроорганизмов в почвенных образцах (КОЕ/г почвы)

Таксономические группы микроорганизмов	Место отбора проб	
	По Мангистаускому региону	По Атыраускому региону
Бактерии	2,7x10 ⁴	9,1x10 ⁴
Грибы	1,3x10 ²	6,2x10 ²
Дрожжи	3,5x10 ⁴	5,1x10 ⁴

Среди микроорганизмов доминировали гетеротрофные грамположительные и грамотрицательные бактерии (TSA). Относительно высокое содержание этих бактерий обнаружено и в пробе почвы, взятой из Атырауского региона (рис. 2).

Помимо изучения численности гетеротрофных и олиготрофных бактерий, проводилось также исследование численности дрожжей и грибов на среде SDA. Численность этих микроорганизмов была средней – 7,1x10² в пробах водоема близ г. Кульсары, от 3x10² до 5x10³ в пробах хозяйства «Исаев» Индерского района и 2x10³ КОЕ/мл в пробах водоема хозяйства «Улан».

Определение энтеробактерий на среде Endo agar показало, что во всех исследуемых образцах воды содержится от 1,3 x10² до 3,5 x10³ КОЕ/мл.

Наибольшая численность энтеробактерий обнаружена в пробах водоема близ г. Кульсары.

В биосфере в круговороте веществ экологическое значение имеют только те микроорганизмы, которые многочисленны и проявляют бурную жизнедеятельность. Для бактериальных групп в качестве условного критерия количества принята величина не менее 1 млн. клеток на 1 г субстрата, и только при такой численности они могут иметь главное экологическое значение. Для дрожжей и грибов эта величина составляет 10 тыс. на 1 г [29]. Однако, в исследуемой нами почве численность бактерий не превышала 10⁴ КОЕ/г, что свидетельствует о том, что бактериальный пейзаж в изучаемом регионе относительно беден по своему количественному и качественному составу. Это, в свою очередь, может отрицательно влиять на процессы природного самоочищения почвенных экосистем.

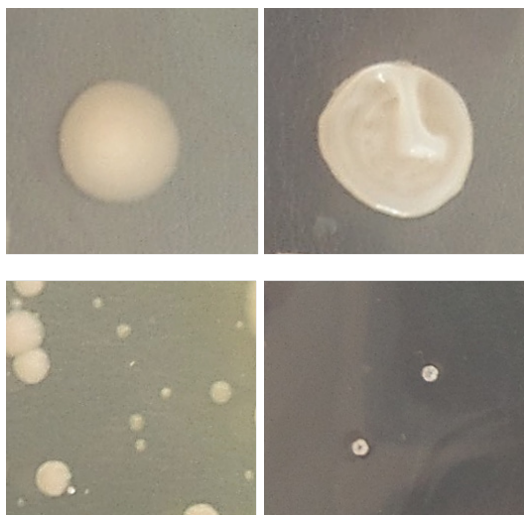


Рисунок 2 – Доминирующие колонии микроорганизмов на среде TSA

Проведенные исследования численности сапрофитных бактерий в пробах воды по Мангистауской и Атырауской областей показали, что величина этого показателя колебалась от 1×10^1 до 12×10^2 КОЕ/мл (рис. 3).

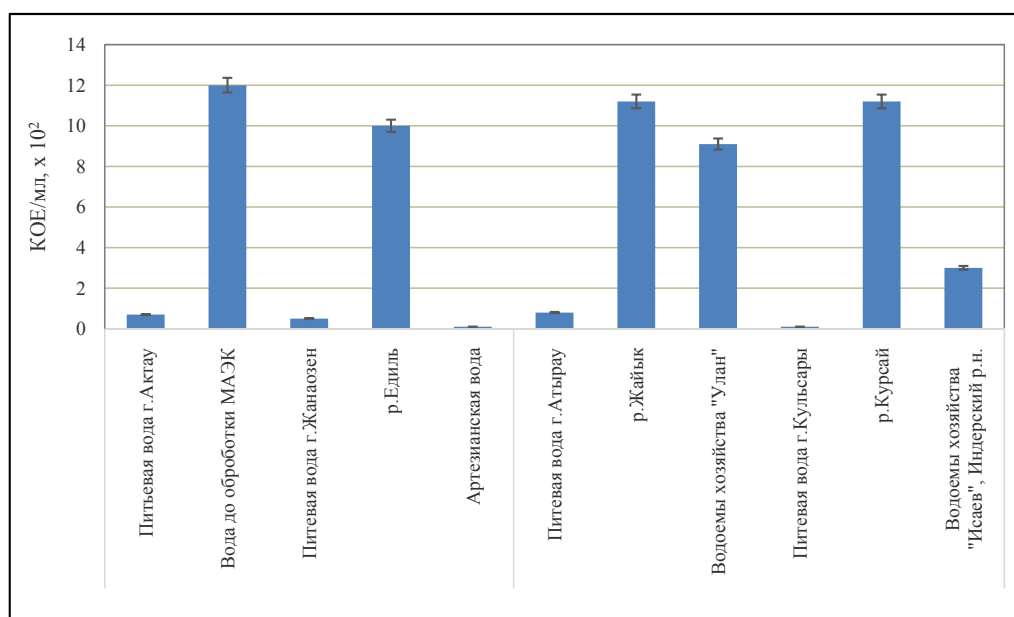


Рисунок 3 – Динамика численности сапрофитных микроорганизмов в пробах воды (КОЕ/мл)

Результаты гидробиологических исследований подтвердили высокую техногенную нагрузку на биоценозы Мангистауской водной экосистем. Об этом свидетельствует низкое видовое разнообразие бентосных по-

пуляций и доминирующее развитие сапрофитных бактерий.

В пробах воды до обработки МАЭК общее число микроорганизмов достигало $12,4 \times 10^2$ КОЕ/мл, тогда как в питьевой воде г. Актау этот показатель составлял $0,2 \times 10^2$ КОЕ/мл. В артезианской воде Жанаозенской зоны общее количество сапрофитных микроорганизмов не превышало $0,1$ КОЕ/мл.

Результаты оценки сапрофитного фона микроорганизмов по Атыраускому региону показали, что их численность находится в пределах от $0,02 \times 10^2$ до $11,3 \times 10^2$ КОЕ/мл.

Дополнительно были проведены сравнительные исследования численности представителей рода *Pseudomonas*. Показано, что общая численность бактерий в 1 мл, по данным метода серийных разведений, составила $0,4 \times 10^2$ в пробах питьевой воды и $2,2 \times 10^2$ клеток/мл в воде Мангистауского региона до обработки МАЭК.

В морской воде представителей данного рода не обнаружено.

В результате исследований количественного состава группы *Pseudomonas* в воде зоны Атырауского региона было установлено, что количество бактерий этой группы не превышало $0,1 \times 10^2$ клеток/мл.

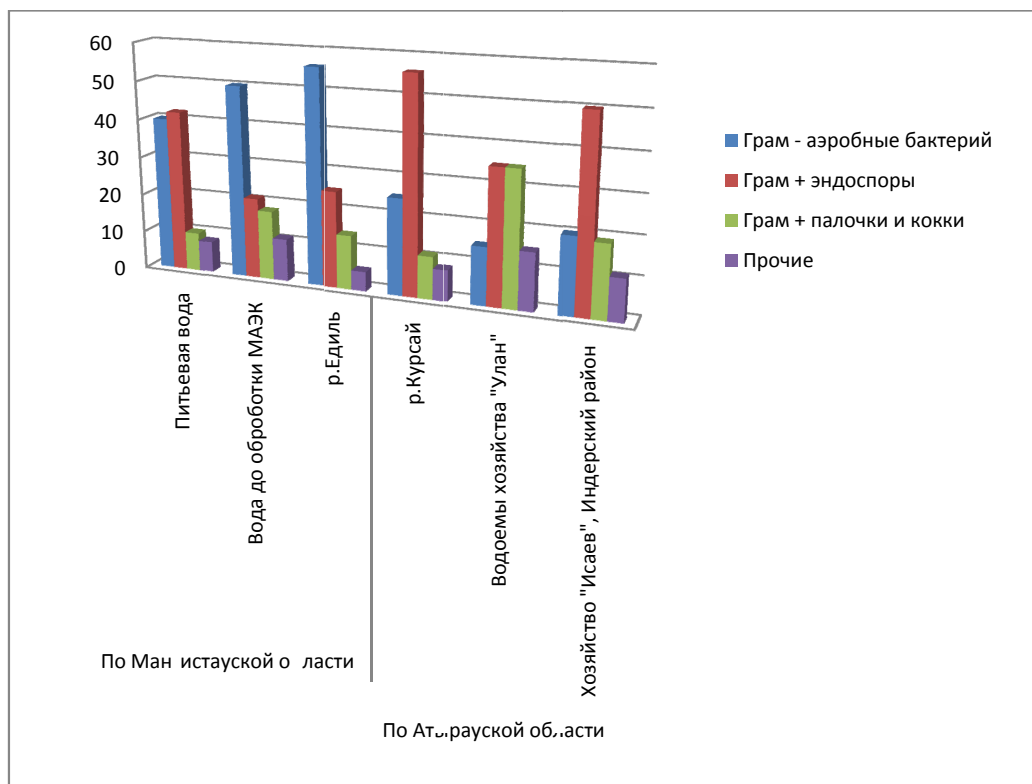


Рисунок 4 – Видовой состав бактерий в пробах воды

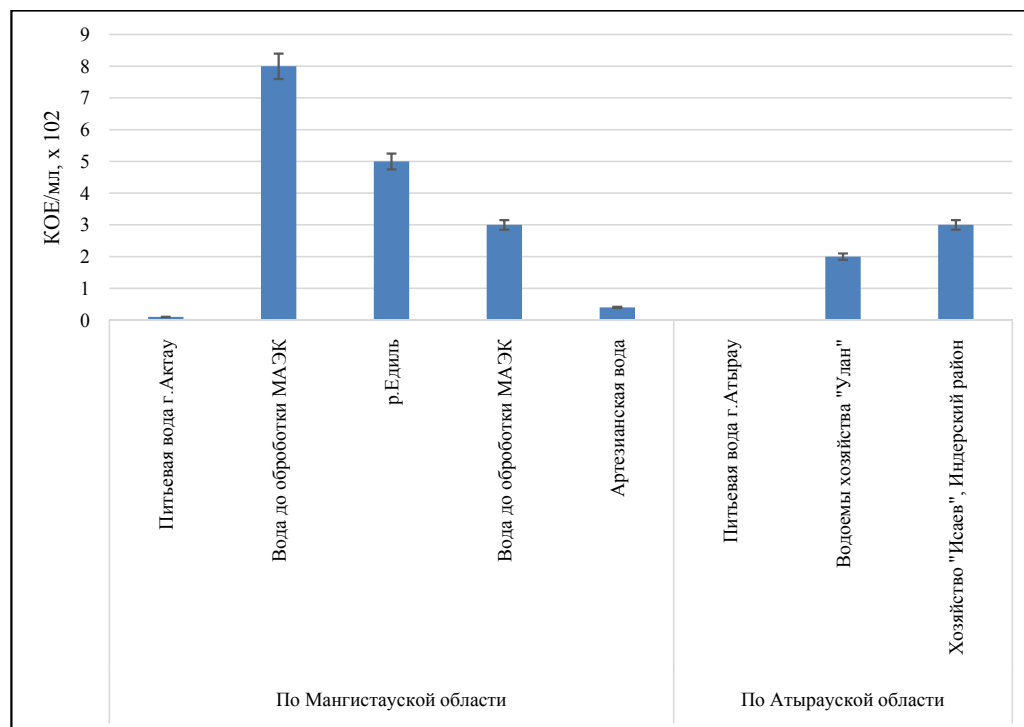


Рисунок 5 – Общая численность грибов и дрожжей в пробах воды

По Актаускому региону численность грамотрицательных бактерий (*Enterobacter*, *Proteus*, *Aeromonas*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*) для питьевой воды составляет 40%; для воды до обработки – 50%, для морской воды – 57%.

Численность грамположительных бактерий (палочки, кокки и эндоспоры как *Bacillus*, *Clostridium*, *Micrococcus*, *Enterococcus*) составила 45-53% в пробах воды Актауского региона. На долю остальных групп микроорганизмов приходится около 7-10%.

При исследовании микробной численности микрофлоры образцов воды Атырауской и Мангистауской областей были обнаружены грибы и дрожжи (*Mucor*, *Fusarium*), их численность составила от $1,2 \times 10^1$ и 8×10^2 КОЕ/мл (рис. 5).

Использование микроорганизмов для биомониторинга объектов окружающей среды основано на возможности оценки их ответной реакции на влияние факторов внешней среды в природных и техногенно измененных условиях по изменению количественных и качественных показателей их жизнедеятельности в динамике.

Сравнительный анализ микробиологических показателей состояния водных экосистем Атырауского и Мангистауского регионов показал, что в условиях техногенного загрязнения в микроценозах водных объектов и гидробионтов доминируют грамотрицательные бактерии, среди которых ведущее место занимают представители родов *Enterobacter* и *Pseudomonas*.

Литературы

- 1 Kong I.e., Bitton G., Koopman B., Jung K.H. Heavy metal toxicity testing in environmental samples // Reviews on Environmental Contamination Toxicology. – 1995. – Vol. 142. – P. 119-47.
- 2 Пшеничников Р.А., Закиров Ф.Н., никитина Н.М. Микроботест для оценки, мониторинга загрязнения почв // Экология. – 1995. – №4. – С. 332-333.
- 3 Bierkens J., Klein G., Corbisier P., Van Den Heuvel R., Verschaeve L., Weltens R., Schoeters G. Comparative sensitivity of 20 bioassays for soilquality // Chemosphere, 1998. – Dec. – V. 37. – №14-15. – P. 2935-47.
- 4 Сметана Н.Г., Мазур А.Е., Красова О.А. Фитодиагностика типологических единиц почвенного покрова и фитоиндикация почвенных процессов // Вопросы биоиндикации и охраны природы: Сб. науч. тр. – Запорожье: Изд-во ЗГУ, 1997. – С. 100 – 101.
- 5 Харламов А.С. Биоиндикационная оценка состояния почвы селитебных территорий с использованием микробных тест-объектов: автореф. дис... канд. биол. наук. – Калуга, 2000. – 21 с.
- 6 Шигаева М.Х. Экология микроорганизмов. – Алматы: Казак университети, 2002. – 171 с.

References

- 1 Kong I.e., Bitton G., Koopman B., Jung K.H. Heavy metal toxicity testing in environmental samples // Reviews on Environmental Contamination Toxicology. – 1995. – Vol. 142. – P. 119-47.
- 2 Pshenichnov P.A., Zakirov F.N., nikitina N.M. Mikrobotest dlja ocenki, monitoringa zagrjaznenija pochv // Jekologija. – 1995. – №4. – S. 332-333.
- 3 Bierkens J., Klein G., Corbisier P., Van Den Heuvel R., Verschaeve L., Weltens R., Schoeters G. Comparative sensitivity of 20 bioassays for soilquality // Chemosphere, 1998. – Dec. – V. 37. – №14-15. – P. 2935-47.
- 4 Smetana N.G., Mazur A.E., Krasova O.A. Fitodiagnostika tipologicheskikh edinic pochvennogo pokrova i fitoindikacija pochvennyh processov // Voprosy bioindikacii i ohrany prirody: Sb. nauch. tr. – Zaporozh'e: Izd-vo ZGU, 1997. – S. 100 – 101.
- 5 Harlamov A.S. Bioindikacionnaja ocenka sostojanija pochvy selitebnyh territorij s ispol'zovaniem mikrobnih test-ob#ektov: avtoref. dis... kand. biol. nauk. – Kaluga, 2000. – 21 s.
- 6 Shigaeva M.H. Jekologija mikroorganizmov. – Almaty: Kazak universiteti, 2002. – 171 s.