

МИКРОБНО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЧВЫ, ДЛИТЕЛЬНОЕ ВРЕМЯ ЗАГРЯЗНЕННОЙ ХЛОРОРГАНИЧЕСКИМИ ПОЛЛЮТАНТАМИ

Пьянкова А. А.¹, Андреев Д. Н.², Егорова Д. О.^{1,2}

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН;

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Изучен уровень токсичности и микробного разнообразия образцов почв кварталов 11 и 32 ООПТ «Осинская лесная дача», в которых длительное время (более 40 лет) присутствуют хлорорганические вещества группы «Стойкие органические загрязнители». Показано, что водные вытяжки исследуемых почв оказывают среднетоксическое действие на *Chlorella vulgaris* Beijer. Для *Daphnia magna* Straus установлено острое токсическое действие образцов квартала 11, и отсутствие токсического воздействия образцов квартала 32. Все почвенные образцы характеризуются высоким уровнем микробного разнообразия. При этом из 30 описанных морфотипов только 3 присутствуют во всех почвенных образцах. Показано, что данные морфотипы различаются и на генетическом уровне.

Ключевые слова: СОЗ, штаммы, токсичность, почва.

Актуальность и цель работы. Сохранение окружающей среды и восстановление уже загрязненных территорий является одним из приоритетных направлений в настоящее время. Производство и широкое применение в течение длительного времени соединений хлорорганического ряда привело к загрязнению ими обширных территорий. В связи с этим, а также из-за высокой токсичности соединений данного класса для живых организмов, мировым сообществом принят ряд документов направленных на очистку окружающей среды. Одним из таких документов является ратифицированная в 176 странах, в том числе в РФ, Стокгольмская конвенция об уничтожении Стойких органических загрязнителей (СОЗ) [1, 2].

Реализация положений данной конвенции предполагает оценку уровня опасности почв, загрязненности соединениями группы СОЗ, разработку технологий по уничтожению СОЗ и технологий по ремедиации загрязненных объектов. Одними из основных показателей возможности восстановления почвы являются уровень ее токсичности, а также микробное разнообразие.

Цель работы – проанализировать состояние почвы, более 40 лет загрязненной соеди-

нениями группы «Стойкие органические загрязнители», и дать оценку перспективности ее ремедиации.

Материалы и методы. Образцы почв отобраны с территории ООПТ «Осинская лесная дача» в точках 57°17'16,861"N 55°09'0,13"E (квартал 32, выдел 9), 57°17'25,994"N 55°08'21,998"E (квартал 32, выдел 11), 57°18'33,733"N 55°10'39,343"E (квартал 11, выдел 1). В период 1968–1970 гг. данная территория была обработана инсектицидными препаратами хлорорганического ряда марок «Гексохлоран» и «ДДТ».

Пробоотбор осуществлен в соответствии с государственной нормативной документацией (ГОСТ 12071-2000, ГОСТ 17.4.3.01-83, ПНД Ф 12.1:2:2.2:3.2-03). Все образцы отобраны по методу «конверта» с соблюдением правил асептики в радиусе 100 м от указанной точки. Для дальнейшего анализа брали усредненную пробу.

Уровень токсичности образцов почв определяли элюатными методами биотестирования по методикам, зарегистрированным в реестре природоохранной нормативной документации (ПНД Ф 14.1:2:4.16-09 16.1:2.3.3.14-09; ФР.1.31.2012.12372; ФР.1.39.2007.03222; ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04 Т 16.1:2.3:3.7-04), рекомендованным для целей государственного

экологического контроля с использованием тест-объектов различных таксономических групп (*Chlorella vulgaris* Beijer, *Daphnia magna* Straus).

Острое токсическое действие исследуемых водных вытяжек из почвенных образцов на дафний определяли по их смертности за определенный период экспозиции. Критерием острой токсичности служила гибель 50% и более дафний за 48 часов в исследуемой пробе при условии, что в контрольном эксперименте все рачки сохраняли свою жизнеспособность.

Маточную культуру дафний выращивали в Климатостате Р-2 согласно «Методике определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний» (ФР.139.2001.00283). Биотестирование водных вытяжек проводили только на синхронизированной культуре дафний (одновозрастная культура, полученная от одной самки путем ациклического партеногенеза в третьем поколении). Учет смертности дафний в опыте и контроле проводили через 1 час и каждые 24 часа.

Определение токсичности каждой пробы без разбавления и после каждого разбавления проводили в трех параллельных сериях. В качестве контроля использовали три параллельные серии с культивационной водой.

Микробное разнообразие изучали с применением классических микробиологических методов (накопительное культивирование, рассев до чистых культур, описание морфологии колоний и клеток), а также генетических методов (типирование с применением RFLP и ВОХ-ПЦР).

Результаты. Токсикологический анализ почв кварталов 11 и 32, обработанных препаратами «Гексохлоран» и «ДДТ» в 1968–1970 гг., с применением *Chlorella vulgaris* Beijer показал, что все образцы среднетоксичны (3 степень из 6 возможных). Вытяжки из почв проявляют токсическое действие без разбавления и при разбавлении в 3 раза. При дальнейшем разбавлении токсическое действие не наблюдается.

Установлено, что образцы почв квартала 11 вызывают острую токсическую реакцию тест-объекта *Daphnia magna* Straus. При этом средняя летальная концентрация водной вытяжки почв данного квартала, вызывающая гибель

50% и более тест-организмов (ЛКР₅₀₋₄₈) составила 141,25%, а безвредная кратность разбавления водных вытяжек, вызывающую гибель не более 10% тест-объектов за 48-часовую экспозицию (БКР₁₀₋₄₈) – 16,77%. Водные вытяжки почв квартала 32 не оказали токсического действия на *Daphnia magna* Straus.

Микробиологический анализ почв показал, что в них присутствует значительное количество штаммов бактерий. В результате посева накопительных культур установлен высокий уровень разнообразия бактериальных штаммов, описано 30 морфотипов, отличающихся морфологией колоний и клеток. Установлено, что три морфотипа присутствуют во всех образцах почв:

морфотип 3 – колонии круглые, выпуклые, блестящие, не прозрачные, грязно-белые с желтым оттенком, 2-4мм диаметром; 4% от общего количества КОЕ в образцах почв квартала 32, < 1% – в образцах почв квартала 11.

морфотип 8 – колонии круглые, ровные, каплевидные, матовые, желто-оранжевые, не прозрачные, структура мелкозернистая, 1-2 мм в диаметре; 37% от общего количества КОЕ в образцах почв квартала 32, 88% – в образцах почв квартала 11;

морфотип 15 – колонии круглые, края с концентрическими кругами, в центре колония шероховатая, к краям гладкая, выпуклая, не прозрачная, бежевая, 7-9мм в диаметре; 56% от общего количества КОЕ в образцах почв квартала 32, 4% – в образцах почв квартала 11.

ДНК-типирование показало, что выделенные морфотипы отличаются друг от друга и на генетическом уровне.

Таким образом, выявленный уровень токсичности почв для растительных и животных тест-объектов, а также высокий уровень бактериального разнообразия позволяет предположить возможность эффективной ремедиации почв кварталов 11 и 32 ООПТ «Осинская лесная дача».

Работа поддержана грантом РФФИ-Урал № 14-04-96021p_урал_a.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. <http://chm.pops.int>
2. Федеральный закон РФ № 164-ФЗ

MICROBIAL-TOXICOLOGICAL ANALYSIS OF SOIL CONTINUOUSLY POLLUTED BY ORGANOCHLORINE SUBSTANCES

Pjankova A. A.¹, Andreev D. N.², Egorova D. O.^{1,2}

¹Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, RAS;

²Perm State University, Perm, Russia

The level of toxicity and microbial diversity of soil samples from quarters 11 and 32 PAs "Osinskaya forest cottage", which for a long time (over 40 years) have been containing the organochlorine group of "Persistent organic pollutants" was studied. It was shown that aqueous extracts of investigated soils had on the average a toxic effect on *Chlorella vulgaris* Beijer. For *Daphnia magna* Straus acute toxic effects of samples from quarter 11, and the absence of toxic effects of samples from quarter 32 was found. All soil samples were characterized by high levels of microbial diversity. Of 30, only 3 described morphotypes were present in all soil samples. It was shown that these morphotypes differed at the genetic level.

СОСТАВ АЛЬГО-БАКТЕРИАЛЬНОГО СООБЩЕСТВА ЭПИЛИТОНА ПРЕДГОРНОЙ РЕКИ СЫЛВА

Семейкина П. И.¹, Беляева П. Г.¹, Козяева В. В.²,
Кузнецов Б. Б.², Саралов А. И.¹

¹ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь;

²ФГБУН Центр «Биоинженерия» РАН, Москва, Россия

Разнообразие бактерий и водорослей в эпилитоне предгорной р. Сылва оценено с использованием общепринятых в альгологии методов и анализа последовательностей генов 16S рРНК. В перифитоне выявлено 102 таксона водорослей из 6 отделов. Диатомовые водоросли составляли более 90% общей численности и 86% биомассы. С помощью методов молекулярной экологии идентифицированы лишь хлоропласты и клоны, филогенетически сходные с диатомеями рода *Symbella*. По результатам филогенетического анализа выявлено 34 ОТУ, относящихся к 7 бактериальным филам. Наиболее многочисленными оказались представители филы Proteobacteria (23 ОТУ). Большинство идентифицированных последовательностей 16S рРНК проявляли гомологию именно с культивируемыми бактериями из различных пресноводных мест обитания.

Ключевые слова: эпилитон, водоросли, Proteobacteria, клонирование.

Актуальность и цель работы. Современные исследования альго-бактериальных сообществ обрастающих каменистых субстратов (эпилитон) и макрофитов (эпифитон) речных экосистем направлены на их комплексный анализ, включающий изучение функциональной роли перифитона, учет численности микроорганизмов методами прямого счета или предельных разведений на питательных средах, выделение чистых культур, молекулярную *in situ* детекцию прокариот и водорослей [1–4]. Фито- и бактериоперифитону водотоков Камского бассейна, в частности в наиболее изученной предгорной р. Сылва, принадлежит ведущее положение

в самоочищении и биопродуктивности, азотфиксации и денитрификации [1, 2]. В последние десятилетия за рубежом начаты исследования разнообразия сообществ эукариот и прокариот в речных биопленках с использованием молекулярно-генетических методов *in situ*, позволяющих выявить отдельные клетки без использования методов культивирования [3–4].

Цель данной работы – оценка разнообразия бактерий и водорослей с использованием общепринятых в альгологии методов и филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей 16S рРНК в образцах эпилитона р. Сылва.