

# Биоиндикация почв на основе анализа биологической активности Азтофиксирующих бактерий в гор. Химки

Хомяков Тимур Дмитриевич  
Лицей номер 11 г. Химки, 11 класс

Костина Наталья Викторовна  
Московский Государственный Университет  
имени Ломоносова, Факультет Почвоведения, Руководитель

Рост городов и развитие экономики очень часто приводят к загрязнению различных экосистем, а именно почвы, воздуха, грунтовых вод и т.д. Именно поэтому, необходимо тщательное наблюдение, т.е. постоянный мониторинг экологической обстановки.

Цель работы: Определить интенсивность микробной трансформации азота и углерода в дерново-подзолистой почвы, в зависимости от степени загрязнения окружающей среды.

Задачи проекта:

- 1) Проанализировать литературу на темы биоиндикация почв, трансформация азота и углерода, влияние на биологическую активность почвы различных агентов.
- 2) Определить потенциальную активность азотфиксации и денитрификации, эмиссию CO<sub>2</sub> и N<sub>2</sub> в дерново-подзолистой почве в районе г. Химки
- 3) Оценить активность азотфиксации и денитрификации в зависимости

от экологической обстановки.

Для этого можно использовать совокупность методов, называемой биоиндикацией (Реймерс Н.Ф., 1990). Биондикация - оценка состояния различных объектов окружающей среды по наличию тех или иных индикаторных организмов и их сообществ (Криволицкий Д.А. и др., 1988). Многие организмы весьма чувствительны и избирательны по отношению к изменениям среды обитания (химическому составу почвы, вод, атмосферы, климатическим и погодным условиям, присутствию других организмов и т.д.) могут существовать в узких границах изменения этих факторов (М.С Гиляров. "Биологический энциклопедический словарь", 1989). Их особенности развития служат показателями естественных процессов, условий или антропогенных изменений среды обитания.

Почва в настоящее время наиболее подвержена негативным воздействиям, а именно высоких концентраций противогололедных реагентов, тяжелых металлов и т.д, но в то же время из-за высокого количества органических веществ, а именно гумуса, способна выдерживать длительное загрязнение (Хомяков Д.М., 2015)

В настоящее время существуют различные способы биоиндикации почвы. Одним из методов оценки биологического состояния почвы является оценка интенсивности процессов трансформации таких важнейших элементов как углерод и азот.

### Цикл азота

Молекулы азота в атмосфере  $N_2$  обладают крайне крепкой связью. Неферментативный разрыв связи требует громадных затрат энергии. Поэтому сами растения не могут использовать необходимый им элемент. В результате в экологическую систему встроились особые микроорганизмы, которые способны  $U$  азотофиксаторов в этой реакции участвует особый фермент нитрогеназа, который использует энергию АТФ, и превращают атмосферный азот в аммиак  $NH_3$ , этот процесс получил название азотофиксация. В последствии Аммиак переходит в

соединения аммония  $\text{NH}_4^+$ , из них с помощью бактерий *Nitrosomonas* в нитриты  $\text{NO}_2^-$ , в свою очередь благодаря деятельности *Nitrobacter* в нитраты  $\text{NO}_3^-$ , в свою очередь нитраты переходят в атмосферный азот  $\text{N}_2$ , данный процесс получил название денитрификации. Именно за счет азотфиксации и денитрификации можно и провести биоиндикацию.

Азотфиксация - усвоение молекул азота воздуха азотфиксирующими бактериями (*Azotobacter* sp., *Beijerinckia* sp., *Clostridium* sp. и др.), с образованием соединений азота (нитратами) доступных для использования другими организмами (М.С.Гиляров. Биологический энциклопедический словарь., 1989). Азотфиксирующие бактерии крайне чувствительны к различным изменениям экологической обстановки и увеличению антропогенной нагрузки (М.С.Гиляров. Биологический энциклопедический словарь., 1989): увеличению концентрации тяжелых металлов почве (Умаров М.М., 1996), азотосодержащих удобрений (Дурихина Н.В., 2007). В связи с этим, мы можем использовать изменение активности азотфиксации в качестве биоиндикации, что может нам с достаточной точностью показать, степень загрязнения почвы и экологической обстановки в целом.

Денитрификация-микробиологический процесс, играющий важную роль в азотном балансе почв, это сумма микробиологических процессов восстановления нитратов до нитритов и далее до газообразных оксидов и молекулярного азота. ("Биологический энциклопедический словарь"., 1989)

Цикл углерода-углерод-элемент в большом количестве содержащийся в земной коре, но также это один из 4 наиболее распространенных элементов, содержащихся в живых организмах. Соответственно живые организмы выделяют углерод в основном в результате двух процессов: дыхания и метаногенез. Первый происходит с участием кислорода и выделяется углекислый газ, второй-бескислородный, конечным продуктом является метан.

CO<sub>2</sub>, благодаря фотосинтезу в зеленых растениях и сине-зеленых водорослях(цианобактерий)переходит в органические вещества. ("Биология". Н.Грин и др., 1990)Рассмотрим по-подробнее почвенное дыхание-одна из разновидностей дыхания.

Почвенное дыхание - сложное, многофункциональное природное явление, проявляющееся в процессах газообмена междуосновными компонентами биосферы, почвообразования, трансформации геологических пород, диссипации энергии, накопленной в почвенном органическом веществе и биомассе почвообитающих организмов.(Наумов А.В., 2004). Почвенное дыхание включает в себя два способа образования CO<sub>2</sub>-биотический и абиотический. Абиотический процесс-получение углекислого газа из неорганических веществ,зависит от многих факторов: окисления гумусовых веществ,углекислый газ может выделяться из воды и т.д.("Биология". Н.Грин и др., 1990),но так как образцы брались одного типа почвы(дерново-подзолистый),образцы брались достаточно близко друг от друга,то учитывание абиотических процессов в ходе исследования не влияет на конечный результат.

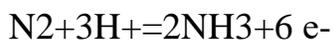
Биотические же процессы включают прежде всего дыхание организмов и микроорганизмов,и в меньшей степени окисление биологического материала.В своей работе я измерял активность выделения углекислого газа, т.е. "почвенное дыхание" и активность азотфиксации в различных образцах почвы г. Химки Московской области, и на основании полученных данных попытался дать оценку биологической активности почвы.Так как в моей работе проводятся исследования,связанные с газами,самым удобным методом для исследований является газовая хроматография.

Газовая хроматография -физико-химический метод разделения веществ,основанный на распределении компонентов анализируемой смеси между двумя несмешивающимися движущимися относительно друг друга фазами,где в качестве подвижной фазы выступает газ(газ-

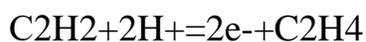
носитель) в качестве неподвижной фазы-твердый сорбент или жидкость, нанесенная на инертный твердый носитель или внутренние стенки колонки. (Основы аналитической химии. Ю.А. Золотов, Е.Н. Дорохова, В.И. Фадеева и др. 2000, Г. Юинг Инструментальные методы химического анализа. 1989)

метод-Ацетиленовый метод.

Нитрогеназа-азотфиксирующий ферментный комплекс diaзотрофных бактерий-способна не только восстанавливать молекулярный азот до аммиака, но и ряд других соединений, имеющих в молекуле тройную связь, в частности ацетилен. Катализируемая нитрогеназой реакция восстановления молекулярного азота описывается следующим уравнением



Наиболее важным преимуществом использования ацетилена является тот факт, что конечным продуктом реакции является этилен



Константа Михаэлиса для реакции восстановления ацетилена примерно в 10 раз ниже, чем для редукции  $\text{N}_2$ , а растворимость  $\text{C}_2\text{H}_4$  почти в 60 раз выше, чем у молекулярного азота. Вследствии этого, при наличии в газовой фазе хотя бы 5% ацетилена, восстановление молекулярного азота полностью тормозится и протекает только образование этилена. Этилен анализируется на газовом хроматографе, при этом чувствительность обнаружения нитрогеназы составляет примерно  $10^{-12}$  степени.

Для выполнения метода необходимы

А) реактивы: ацетилен технический в баллонах, этилен и пропан, хроматографически чистые, для эталонирования, карбид кальция  $\text{CaC}_2$

Б)Оборудование:Газовый хроматограф,с пламенно-ионизационным детектором,аргон,водород в баллонах,сжатый воздух из компрессора с ресивером или из баллона,шприцы медицинские туберкулиновые или инсулиновые на 0,5-1 мл,а также 15-20 мл,флаконы пенициллиновые с пробками и зажимами к ним.Разовые колпачки из алюминия и закаточная машинка.

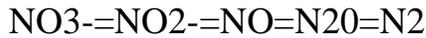
### Ход анализа

1)5 г освобожденной от корешков и просеянной,увлажняют примерно до 80% от полной влагоемкости,добавляют 2%глюкозы, тщательно перемешивают и инкубируют в течение суток при температуре 28 градусов С.Через сутки во флакон вводится приблизительно 0,5 мл ацетилена и снова помещают в термостат на час. По истечении срока извлекают пробу объемом точно 1 мл и помещают в газовый анализатор.Кроме того в дополнительной навеске проводят контрольное определение неспецифического выделения ацетилена. Определяют также содержание этилена в ацетилене.Среднее значение активности азотфиксации для трех параллельных проб и характеризует потенциальную активность азотфиксации в почве.Ее выражают в миллиграммах или в микрограммах фиксированного азота на килограмм почвы за час.(мг/ кг/час).

Денитрификация-микробиологический процесс,играющий важную роль в азотном балансе почв. Существуют различные приемы оценки денитрофицирующей активности почвы.Хорошо известный метод балансовых расчетов с определением концентрации азота в почве перед началом инкубации почвы и после ее окончания.При этом используется традиционными методами оценки почвы(метод Кьельдаля),что делает определение очень трудоемким и непроизводительным.

Способ с применением изотопа  $^{14}\text{N}$  требует специального оборудования, для его фракционирования,которого к сожалению в

моем распоряжении нет. Поэтому мы воспользуемся методом, основанном на использовании ацетилена в качестве ингибитора редуктазы закиси азота в газовой фазе.



Этот метод позволяет определять активность денитрификации в почве.

Реактивы: Закись азота в баллоне для эталонирования, глюкоза, нитрат калия

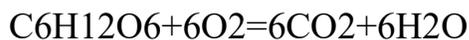
Оборудование: газовый хроматограф с детектором теплопроводности или с электронным захватом, гелий в баллонах, шприцы для газовой хроматографии, флаконы объемом 250 и 50 мл.

Определение потенциальной активности денитрификации

Ход анализа: Навеску почвы, очищенной от инородных включений, объемом 5 г. помещают во флакон объемом 15 мл. Образец почвы увлажняют 6 мл. водного раствора глюкозы и нитрата калия из расчета 2.5 мг глюкозы на 1 г. почвы и 0.3 мг нитрата калия на 1 г. почвы. Флаконы фиксируются и промываются инертным газом (Ar или He P=1 атм.) в течение 30 секунд. В каждый флакон вводят по 1.5 мл ацетилена. Флаконы встряхивают, переворачивают пробкой вниз и инкубируют в течение 24 ч. После ведут анализ газовой пробы на газовом хроматографе.

3) Дыхание почв.

Выделение CO<sub>2</sub> определили следующим методом.



Реактивы

Раствор глюкозы

газовый хроматограф, флаконы 5 мл, шприцы для хроматографии

Ход анализа: Навеску очищенной почвы 5 мг. помещают во флакон, добавляют раствор глюкозы (избыток) и помещают в термостат на 24 часа. По истечению срока производят замеры в газовом хроматографе.

Исследования проводились в лабораторных условиях на дерново-подзолистой почве. Мною были отобраны образцы из различных, по моему мнению, загрязненных участках, а именно, около крупных автомобильных магистралей. Контролем был выбран образец, взятый в центральной части парка им. Л.Н. Толстого.

Интенсивность почвенного дыхания и азотфиксации определял методами газовой хроматографии в модификации кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ (Методы почвенной микробиологии...., 1991). Повторность аналитических определений 3-х кратная.

1) Были отобраны образцы дерново-подзолистой почвы в трех повторностях в парке им. Толстого (город Химки), который был принят за контрольный, т.к. место наименее подвержено различным загрязнениям. Также были взяты образцы на ул. Проспект Мира (город Химки), как на загрязненной территории. Образцы были очищены от инородных тел (камни, корни растений и т.д.). Исследования проводили на кафедре Биологии почв факультета почвоведения МГУ имени Ломоносова были проведены исследования на дыхание почв, азотофиксацию и нитрификацию. (Методы почвенной микробиологии...., 1991).

### **Результаты исследований.**

**Анализ результатов исследования показал, что в образцах, отобранных на ул. Проспект Мира выделение углекислого газа**

гораздо ниже, чем в контрольных образцах, в частности среднее значение CO<sub>2</sub> актуальной эмиссии в контроле=6.8 (мкг/г сутки), а в образцах с проспекта Мира=5.84(мкг/г сутки), Потенциальной эмиссии в контроле=18.9 мкг/г сутки, а на проспекте Мира=12.79 мкг/г сутки. На основании этого факта, мы можем сделать вывод, что биологическая активность на Проспекте Мира значительно ниже, чем на территории Парка им. Толстого. Безусловно, это связано с загрязнением почвы, но так как мы не проводили химический анализ почвы, нельзя с уверенностью сказать, что конкретно является источником загрязнения, мы можем только предположить что загрязнение вызвано продуктами горения углеводородов, в частности ГСМ (Горючесмазочные материалы), а также антигололедными реагентами. Аналогично выделение метана на Проспекте Мира значительно ниже образцов, взятых в парке им. Л.Н.Толстого. Анаэробное дыхание крайне мало. Это также подтверждает факт загрязнения. Результаты исследований показали, что процессы азотфиксации ниже на проспекте Мира, чем в парке: как актуальная, так и потенциальная (потенциальная контроль-0.007 мкг/г сутки, а на проспекте Мира-0.048 мкг/г сутки, актуальная  $4.18 \cdot 10^{-6}$  в контроле, на проспекте Мира  $3.21 \cdot 10^{-6}$ ), аналогично с процессами денитрификации ( актуальная,контроль-3.23 мкг/г сутки, на проспекте Мира 4.15 мкг/ г сутки, потенциальная..).

### Выводы.

Исследования показали что:

1)Биологическая активность почвы в гор. Химки различается по районам. В образцах парковой зоны активность процессов трансформации азота и углерода выше чем в «загрязненных».

2)Почва на Проспекте Мира постепенно обедняется азотом.

Рекомендации. Экологическая ситуация в городе Химки требует дальнейшего, более тщательного исследования, так как на

**основаниях данных нашей работы выявлена значительная трансформация почвенных процессов в точке антропогенного воздействия.**