

Влияние микроорганизмов основных трофических групп на содержание в биодоступных формах макро- и микроэлементов в дерново-подзолистой супесчаной почве Полесского государственного радиационно-экологического заповедника

Е.А. ТАНКЕВИЧ, Ю.К. СИМОНЧИК

В работе исследуется влияние микроорганизмов основных трофических групп на содержание в биодоступных формах макро- и микроэлементов в дерново-подзолистой супесчаной почве в условиях повышенной радиационной нагрузки. Консорциум микроорганизмов, входящий в состав препарата EM-1, и спорообразующие аммонификаторы снизили содержание стабильного изотопа Cs в водорастворимой форме на 40 % и 21,2 %, соответственно. Группа аммонифицирующих микроорганизмов привела к уменьшению содержания данного микроэлемента в ионообменной форме на 15,9 %. Увеличили же содержание Cs в ионообменной форме олигокарбофильные микроорганизмы – на 23 %. Внесение микробиологического препарата EM-1 в дерново-подзолистую супесчаную почву приводит к резкому увеличению содержания в ней K в биодоступных формах, что важно для ослабления корневого поглощения радиоактивных изотопов Cs.

Ключевые слова: почвенные ассоциации микроорганизмов, радиоактивное загрязнение, зона отчуждения Чернобыльской АЭС, биологическая доступность, макроэлементы, микроэлементы.

The work examines the influence of microorganisms of the main trophic groups on the content of macro- and microelements in bioavailable forms in soddy-podzolic sandy loam soil under conditions of increased radiation load. The consortium of microorganisms included in the preparation EM-1 and spore-forming ammonifiers reduced the content of the stable Cs isotope in water-soluble form by 40 % and 21,2 %, respectively. A group of ammonifying microorganisms led to a decrease in the content of this microelement in ion-exchange form by 15,9 %. Oligocarbophilic microorganisms increased the content of Cs in the ion-exchange form by 23 %. The introduction of the microbiological preparation EM-1 into soddy-podzolic sandy loam soil leads to a sharp increase in the content of K in bioavailable forms, which is important for weakening the root absorption of radioactive Cs isotopes.

Keywords: associations of soil microorganisms, radioactive contamination, CNPP exclusion zone, bioavailability, macroelements, microelements.

Введение. Вследствие катастрофы на Чернобыльской АЭС в окружающую среду поступило большое количество радиоактивных изотопов, что привело к загрязнению сельскохозяйственных угодий территории Республики Беларусь радионуклидами техногенного происхождения. Степень поглощения радиоактивных изотопов зависит от их физико-химических форм нахождения в почве.

Одним из важнейших компонентов биогеоценозов является почвенная микрофлора, так как она определяет степень трансформации органических веществ в почве и, таким образом, влияет на скорость круговорота веществ. Микроорганизмы являются важным фактором мобилизации или, наоборот, иммобилизации радионуклидов в почве. Интенсивность почвенных процессов может быть охарактеризована анализом состояния в почве отдельных групп микроорганизмов и их физиологических группировок [1]. Микрофлора оказывает значительное влияние на биологическую доступность микроэлементов и радионуклидов в почве и их поведение в биогеохимических циклах. Почвенные микроорганизмы могут существенно изменять физико-химические формы техногенных радионуклидов в результате биоаккумуляции в живых клетках, биосорбции на клеточных компонентах, прямого восстановления или окисления и биометилирования. Данные процессы в различной степени влияют на подвижность и биодоступность элементов. При этом необходимо учитывать свойства исследуемой почвы и условия окружающей среды [2].

Целью работы являлось изучение влияния микроорганизмов основных трофических групп на содержание в биодоступных формах макро- и микроэлементов в дерново-подзолистой супесчаной почве с повышенным уровнем радиационного воздействия.

Материалы и методы исследований. Объектом исследования являлись микроорганизмы основных трофических групп дерново-подзолистой супесчаной почвы зоны отчуждения Чернобыльской АЭС.

Отбор почвенных образцов проводили в летний период согласно стандартным методикам [3] в частном подворье бывшего населенного пункта Борщевка (Гомельская область, Беларусь, Полесский государственный радиационно-экологический заповедник).

Для модельного эксперимента по изучению влияния основных трофических групп микроорганизмов была использована стерилизованная дерново-подзолистая супесчаная почва. Стерильность почвы была достигнута путем автоклавирования при температуре 127 °С и давлении 1,5 атм. в течение 45 минут. Данной почвой заполняли пластиковые емкости из расчета 50 г сухой почвы на сосуд.

В результате посевов на элективные агаризованные питательные среды, согласно общепринятых в микробиологии методов [3], [4], выделено 9 основных трофических групп почвенных микроорганизмов:

- 1) аммонифицирующие микроорганизмы;
- 2) общий комплекс культивируемых микроорганизмов;
- 3) амилотические микроорганизмы;
- 4) олигонитрофильные микроорганизмы;
- 5) фосфатмобилизующие микроорганизмы;
- 6) спорообразующие аммонифакторы;
- 7) автохтонные олиготрофы;
- 8) целлюлозоразрушающие аэробные;
- 9) олигокарбофильные микроорганизмы.

Также дополнительно исследовали влияние микробиологического препарата ЕМ-1, включающего 5 основных групп микроорганизмов: молочнокислые бактерии (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus lactis*), фотосинтезирующие бактерии (*Rhodospseudomonas palustris* и *Rhodobacter sphaeroides*), дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae* и *Candida utilis*). Кроме того, в небольших количествах препарат включает актиномицеты (*Streptomyces albus* и *Streptomyces griseus*) и ферментирующие грибы (*Aspergillus oryzae*, *Mucor hiemalis*).

Суспензии почвенных микроорганизмов готовили на основе мясо-пептонного бульона (МПБ). Для этого в МПБ вносили из чашек Петри стерильной микробиологической петлей инокулянт, представляющий одну из выделенных групп почвенных микроорганизмов, тем самым были получены 9 опытных суспензий.

Полученные бактериальные культуры помещали в термостат и инкубировали при температуре $37,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ в течение суток до появления визуальной мутности. Мутность этих жидких сред доводили до стандарта ВВЛ (стандарта мутности № 0.5 по МакФарланду) – при длине волны 625 нм оптическая плотность суспензий составляла 0,08-0,10 [5].

Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре ПЭ-5300 ВИ.

В каждую стерильную пластиковую емкость, заполненную 50 г сухой почвы, при помощи стерильного цилиндра вносили по 15 мл готовых суспензий каждой из исследуемых групп почвенных микроорганизмов (содержащих приблизительно $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл), а также дозатором добавляли 1 мл хлорида стабильного цезия (CsCl) в концентрации 0,025 мкг/мл. С помощью этого приема моделировалось поведение изотопа данного элемента на начальных этапах после выпадений, до включения его в биогеохимический круговорот.

В контрольные образцы (К) вносили по 15 мл мясо-пептонного бульона, без инокуляции микроорганизмов.

Пластиковые пробирки закрывали крышками, для дополнительной аэрации в крышках были сделаны небольшие отверстия, которые на время эксперимента были закрыты стерильной гигроскопической ватой.

Через 15 дней после закладки эксперимента в каждую емкость вносили по 5 мл стерилизованной воды, чтобы не допустить пересыхания почвенных образцов. Продолжительность модельного эксперимента составила 30 суток.

Для изучения влияния каждой из основных трофических групп микроорганизмов на содержание в биодоступных формах макро- и микроэлементов в дерново-подзолистой супесчаной почве проводили последовательную экстракцию из почвенных образцов [6], [7].

Измерение концентрации изотопов различных элементов в каждом опытном варианте проводили в пятикратной повторности на масс-спектрометре с индуктивно-связанной плазмой ICP-MS Elan-DRCe (Perkin Elmer) согласно СТБ ISO17294-1-2007 и СТБ ISO 17294-2-2007 [8], [9].

Последовательная экстракция из почвенных образцов включала следующие этапы:

1. Водорастворимую форму выделяли посредством экстракции в дистиллированной воде. Образец почвы 20 г помещали в 200 мл дистиллированной воды. Суспензию взбалтывали при комнатной температуре на протяжении 24 ч. Экстракт отделяли от почвы фильтрованием. Почву промывали на фильтровальной бумаге 200 мл дистиллированной воды. Жидкую фазу помещали в центрифужные конические пробирки объемом 15 мл для измерения на ICP-MS.

2. Ионообменную форму выделяли посредством экстракции в растворе ацетата аммония. Твердую фазу с предыдущего шага помещали в 200 мл 1 М раствора ацетата аммония с рН доведенной до 7,0. Суспензию взбалтывали при комнатной температуре на протяжении 24 ч. Экстракт отделяли от почвы фильтрованием. Почву промывали 200 мл дистиллированной воды. Жидкую фазу помещали в центрифужные конические пробирки объемом 15 мл для измерения на ICP-MS.

Агрохимический анализ почвенного образца выполняли согласно ГОСТ [10]–[15].

Результаты исследований и их обсуждение. Удельная активность модельной дерново-подзолистой супесчаной почвы составила 12868 ± 775 Бк/кг.

Агрохимические показатели исследуемой почвы представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Агрохимические показатели модельной дерново-подзолистой супесчаной почвы

Агрохимические показатели почвы, единицы измерения	
рН (в KCl), ед.	6,5
Ca (обм), мг/кг	2430
Mg (обм, подв.), мг/кг	91,2
P ₂ O ₅ (подв), мг/кг	3017
Органическое в-во (гумус), %	3,6
S, сумма поглощённых оснований, ммоль / 100 г	41,8
Hг, гидролитическая кислотность, ммоль / 100 г	0,99
T, ёмкость поглощения, ммоль / 100 г	42,79
V, степень насыщенности почв основаниями, %	97,7
K ₂ O (обм.), мг/кг	708

Уровень рН в ней близок к нейтральному. В модельной почве наблюдалось очень высокое содержание обменного кальция и низкое содержание обменного магния. Содержание подвижного фосфора (P₂O₅), обменного калия (K₂O) и гумуса соответствует очень высоким показателям.

В таблице 2 представлена оценка влияния основных трофических групп микроорганизмов на содержание Cs и Sr в биодоступных формах в модельном эксперименте в образцах дерново-подзолистой супесчаной почвы.

Таблица 2 – Содержание Cs и Sr в модельном эксперименте в образцах дерново-подзолистой супесчаной почвы

Варианты опыта	Cs		Sr	
	Водорастворимая форма, мкг/кг	Ионообменная форма, мкг/кг	Водорастворимая форма, мкг/кг	Ионообменная форма, мкг/кг
Контроль (К)	217,8 ± 30,1	3482,2 ± 443,3	5406,5 ± 1565,7	98195,3 ± 7808,4
Аммонифицирующие (1)	208,5 ± 35,3	2927,2 ± 433,3*	4873,3 ± 1097,1	75570,9 ± 5883,3**
Общий комплекс культивируемых микроорганизмов (2)	185,8 ± 29,5*	3667,2 ± 398,2	4184,2 ± 975,7	91550,4 ± 11551,7
Амилолитические (3)	225,7 ± 33,2	3015,1 ± 598,9	4763,9 ± 1477,8	91144,5 ± 8870,0
Олигонитрофильные (4)	226,6 ± 94,8	3795,5 ± 759,9	9652,9 ± 1976,9**	110208,4 ± 25654,8
Фосфатмобилизующие (6)	187,2 ± 90,2	3719,6 ± 714,8	4483,6 ± 1274,8	104056,0 ± 12637,9
Спорообразующие аммонификаторы (7)	171,7 ± 47,2*	3582,8 ± 606,0	7013,8 ± 2614,1	110887,8 ± 5572,7**
Автохтонные. Олиготрофы (10)	184,8 ± 30,4*	3628,6 ± 771,3	5378,3 ± 1823,0	110498,3 ± 14099,6*
Целлюлозоразрушающие аэробные (11a)	190,4 ± 40,2	3730,9 ± 808,7	7504,2 ± 3082,0	109429,3 ± 7823,6*
Олигокарбофильные (14)	214,5 ± 69,1	4283,4 ± 500,5*	5001,3 ± 1840,9	119622,9 ± 17476,4*
ЕМ-1 (ЕМ)	128,4 ± 31,7**	4069,8 ± 465,5	10503,7 ± 2282,3**	120361,0 ± 10171,7**

Примечание: значимые отличия от контроля отмечены звездочками * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Существенное снижение содержания Cs в водорастворимой форме отмечалось в варианте с внесением в дерново-подзолистую супесчаную почву комплекса микроорганизмов, входящих в состав препарата ЕМ-1. Падение концентрации Cs при этом произошло на 40 % относительно контрольного варианта опыта, однако на содержание Cs в ионообменной форме данный препарат не оказал значимого влияния.

Спорообразующие аммонификаторы уменьшили данный показатель на 21,2 % по сравнению с контролем.

Увеличили же содержание Cs в ионообменной форме олигокарбофильные микроорганизмы – на 23 %.

Аммонифицирующие микроорганизмы снизили (на 15,9 %) вклад данной формы нахождения в валовый запас Cs в дерново-подзолистой супесчаной почве. При этом для данных опытных вариантов характерны достоверные различия относительно контрольного образца.

К некоторому снижению содержания водорастворимой формы Cs также привела активность автохтонных олиготрофов, общего комплекса культивируемых микроорганизмов и фосфатмобилизующих микроорганизмов.

Повышенное содержание Sr в водорастворимой форме отмечалось в следующих вариантах опыта: микробиологический препарат ЕМ-1 – на 94,3 %, группа олигонитрофильных микроорганизмов – на 78,5 %, относительно контроля.

Значительного снижения содержания данного микроэлемента в водорастворимой форме в исследуемых вариантах опыта не отмечалось.

В ионообменной форме содержание Sr повысилось практически во всех вариантах опыта. Однако на снижение уровня данного микроэлемента повлияли следующие группы: аммонифицирующие микроорганизмы – на 23 %, амилитические микроорганизмы – на 7,2 % и общий комплекс культивируемых микроорганизмов – на 6,8 %.

В таблице 3 представлена оценка влияния основных трофических групп микроорганизмов на содержание Са и К в биодоступных формах в модельном эксперименте в образцах дерново-подзолистой супесчаной почвы.

Таблица 3 – Содержание Са и К в модельном эксперименте в образцах дерново-подзолистой супесчаной почвы

Варианты опыта	Са		К	
	Водорастворимая форма, мг/кг	Ионообменная форма, мг/кг	Водорастворимая форма, мг/кг	Ионообменная форма, мг/кг
Контроль (К)	704,9 ± 189,4	16987,0 ± 1379,8	1191,1 ± 119,9	1148,1 ± 75,5
Аммонифицирующие (1)	641,9 ± 171,1	13360,2 ± 961,0**	1042,5 ± 128,7*	1118,9 ± 221,5
Общий комплекс культивируемых микроорганизмов (2)	565,9 ± 153,0	15682,3 ± 1100,9*	928,4 ± 193,0*	1143,0 ± 73,7
Амилитические (3)	767,8 ± 118,2	14030,8 ± 2840,9*	1187,1 ± 250,4	910,5 ± 137,8**
Олигонитрофильные (4)	1436,1 ± 343,9**	17800,4 ± 2963,7	1698,1 ± 875,6	988,2 ± 174,1*
Фосфатмобилизующие (6)	593,7 ± 160,8	14943,0 ± 1946,3*	1107,6 ± 255,9	1083,9 ± 170,7
Спорообразующие аммонификаторы (7)	1266,3 ± 602,6*	15882,3 ± 1067,5	1120,6 ± 260,2	1286,3 ± 454,1
Автохтонные. Олиготрофы (10)	952,3 ± 375,1	16081,7 ± 2058,2	822,8 ± 88,5**	1125,5 ± 390,6
Целлюлозоразрушающие аэробные (11а)	1181,8 ± 517,9*	15989,3 ± 1194,7	948,1 ± 167,1*	1138,9 ± 336,3
Олигокарбофильные (14)	763,5 ± 307,6	17426,5 ± 2310,5	943,8 ± 300,8*	1063,5 ± 143,0
ЕМ-1 (ЕМ)	1718,9 ± 374,7**	16943,9 ± 1695,9	2400,0 ± 1184,6*	2548,5 ± 703,7**

Примечание: значимые отличия от контроля отмечены звездочками * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

При внесении исследуемых групп микроорганизмов в дерново-подзолистую супесчаную почву существенное повышение содержания Са в водорастворимой форме относительно контрольного образца характерно для следующих опытных вариантов: ЕМ – в 1,4 раза, олигонитрофильных микроорганизмов – в 1,1 раз, спорообразующих аммонификаторов – на 79,6 %, целлюлозоразрушающих аэробных – на 67,7 %.

Снижение количества данного макроэлемента в водорастворимой форме отмечено в варианте опыта с внесением общего комплекса культивируемых микроорганизмов и фосфатмобилизующей группы – на 19,7 % и 15,8 %, соответственно. В ионообменной форме содержание Са снизилось при воздействии аммонифицирующей микрофлоры – на 21,3 % относительно контрольного варианта опыта. Существенного повышения содержания Са в ионообменной форме по сравнению с контролем в исследуемых опытных вариантах не наблюдалось. Внесение в дерново-подзолистую супесчаную почву микробиологического препарата ЕМ-1 повысило содержание К как в водорастворимой, так и в ионообменной формах практически в два раза. Такие группы почвенных микроорганизмов, как аммонифицирующие, целлюлозоразрушающие аэробные, олигокарбофильные, общий комплекс культивируемых микроорганизмов и автохтонные олиготрофы снижают содержание К в водорастворимой форме в дерново-подзолистой супесчаной почве на 13–30 %, соответственно, при этом во всех опытных вариантах наблюдаются достоверные различия относительно контрольного. На увеличение же содержания К относительно контрольного образца в водорастворимой форме значимое влияние оказала олигонитрофильная группа микроорганизмов – на 42,5 %. В отношении ионообменной формы К в дерново-подзолистой супесчаной почве слабый негативный эффект проявляют амилолитические и олигонитрофильные группы микроорганизмов.

Заключение. В ходе исследований оценено воздействие основных трофических групп микроорганизмов на содержание в исследуемой почве стабильных изотопов К, Са, Sr, Cs в биодоступных формах. Консорциум микроорганизмов, входящий в состав препарата ЕМ-1, и спорообразующие аммонификаторы снизили содержание стабильного изотопа Cs в водорастворимой форме на 40 % и 21,2 %, соответственно. Группа аммонифицирующих микроорганизмов привела к уменьшению содержания данного макроэлемента в ионообменной форме на 15,9 %. Повышенное содержание Sr в водорастворимой форме отмечено при внесении микробиологического препарата ЕМ-1 – на 94,3 % и олигонитрофильной группы микроорганизмов – на 78,5 %. При внесении исследуемых групп микроорганизмов в дерново-подзолистую супесчаную почву существенное повышение содержания Са в водорастворимой форме относительно контрольного образца характерно для следующих вариантов: ЕМ – в 1,4 раза, олигонитрофильных микроорганизмов – в 1,1 раз, спорообразующих аммонификаторов – на 79,6 %, целлюлозоразрушающих аэробных – на 67,7 %. Внесение микробиологического препарата ЕМ-1 в дерново-подзолистую супесчаную почву приводит к резкому увеличению содержания в ней К в биодоступных формах, что важно для ослабления корневого поглощения радиоактивных изотопов Cs.

Раскрытие роли почвенных микробиологических процессов в изменении биологической доступности макро- и микроэлементов позволит предложить принципиально иные подходы к регулированию потоков загрязнителей в агроэкосистемах.

Литература

1. Жизнь микробов в экстремальных условиях / Под ред. Д. Кашнера ; пер. с англ. – М. : Изд-во «Мир», 1981. – 521 с.
2. Bioremediation of radioactive waste: radionuclide-microbe interactions in laboratory and field-scale studies / J. R. Lloyd, J. C. Renshaw // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2005. – № 16. – P. 254–260.
3. Основные микробиологические и биохимические методы исследования почв / под ред. Ю. М. Возняковской. – Л. : ВНИИСХМ, 1987. – 47 с.
4. Теппер, Е. З. Практикум по микробиологии / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. – 3-е изд., перераб. и доп. – М. : Агропромиздат, 1987. – 239 с.
5. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам : Методические указания. – М. : Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 91 с.
6. Chemical speciation in the environment / Ed. by A. M. Ure, C. M. Davidson. – Second edition. – Wiley-Blackwell, 2002. – 452 p.
7. Hou X. Iodine-129 and caesium-137 in Chernobyl contaminated soil and their chemical fractionation / X. Hou [et al.] // *Science of The Total Environment*. – 2003. – Vol. 308, № 1–3. – P. 97–109.
8. Качество воды. Применение масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой. Часть 1. Общие требования : СТБ ISO 17294-1-2007. – Введ. 01.05.2008. – Минск : БелГИСС, 2008. – 32 с.

9. Качество воды. Применение масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. Часть 2. Определение 62 элементов : СТБ ISO 17294-2-2007. – Введ. 01.05.2008. – Минск : Госстандарт, 2007. – 21 с.
10. Приготовление солевой вытяжки и определение ее pH по методу ЦИНАО : ГОСТ 26483-85 ; введ. 01.07.1986. – М. : Издательство стандартов, 1985. – 6 с.
11. Определение гидролитической кислотности по методу Каппена в модификации ЦИНАО : ГОСТ 26212-2021. – Взамен ГОСТ 26212-91 ; введ. 01.08.2022. – М. : Российский институт стандартизации, 2021. – 12 с.
12. Определение суммы поглощенных оснований по методу Каппена : ГОСТ 27821-2020. – Взамен ГОСТ 27821-88 ; введ. 01.01.2022. – М. : Стандартиформ, 2020. – 9 с.
13. Определение обменного кальция и обменного (подвижного) магния методами ЦИНАО : ГОСТ 26487-85 ; введ. 01.07.1986. – М. : Издательство стандартов, 1985. – 14 с.
14. Определение подвижных соединений фосфора и калия по методу Кирсанова в модификации ЦИНАО : ГОСТ 26207-91 ; введ. 01.07.1993. – М. : Издательство стандартов, 1992. – 13 с.
15. Методы определения органического вещества : ГОСТ 26213-2021. – Взамен ГОСТ 26213-91 ; введ. 01.08.2022. – М. : Российский институт стандартизации, 2021. – 12 с.

Институт радиобиологии НАН Беларуси

Поступила в редакцию 05.04.2024