

(¹Казахский национальный педагогический университет им. Абая, Алматы, Республика Казахстан,

² Казахстанский экономический университет им. Т. Рыскулова, Алматы, Республика Казахстан)

МИКРОБНЫЕ КУЛЬТУРЫ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ПОЧВ Г. АЛМАТЫ И ПРОЯВИВШИЕ РАЗЛИЧНУЮ РЕАКЦИЮ НА ПРИСУТСТВИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Аннотация. В статье представлены результаты микробиологических исследований по определению таксономической принадлежности культур, выделенных из почв г.Алматы. Эти культуры были объединены в 3 группы по их реакции к тяжелым металлам: чувствительные к ним, относительно устойчивые и устойчивые. К 1-й группе было отнесено 10 видов бактерий, 4 – актиномицетов и 4 – дрожжей из различных родов; ко 2-й – 3 вида спорообразующих и 1 вид целлюлозоразрушающих бактерий; к 3-й группе – почвенные микроскопические грибы родов *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*.

Ключевые слова: микробоценоз, городские почвы, бактерии, актиномицеты, дрожжи, микроскопические грибы.

Тірек сөздер: микробоценоз, қала топырағы, бактериялар, актиномицеттер, ашытқылар, микроскопиялық саңырауқұлақтар.

Keywords: microbocenosis, urban soils, bacteria, actinomycetes, yeasts, fungi.

ВВЕДЕНИЕ. Функционирование почвенного покрова в городах в современных условиях его загрязнения нарушено в связи с концентрацией в почвах различных поллютантов, в том числе и тяжелых металлов (ТМ). Общеизвестна токсичная и канцерогенная роль ТМ, особенно таких как кадмий, свинец, ртуть, медь и др. для почвенной микробиоты [1-4 и др.]. В целом, загрязнение почв ТМ и их соединениями негативно воздействовало на жизнедеятельность микроорганизмов и на экологическое состояние почв [5]. В урбанизированных почвах, загрязненных ТМ, изменялись микробные комплексы, зависящие от экологических условий почвенной среды. Исследования микробных ценозов городских почв немногочисленны [2, 6, 7].

Ранее нами было установлено, что почвы г.Алматы содержат большой спектр ТМ: Pb, Cd, Cu, Zn, Cr, Mn, Co, Be, Ni, Sr, V в различных концентрациях [8]. Поэтому в течение длительного времени проводилось изучение микрофлоры почв г.Алматы по сравнению с фоновыми почвами, чтобы получить наиболее яркие различия. В наших исследованиях была получена закономерность: в незагрязненной фоновой почве обитало больше бактерий, а в городских почвах – микроскопические грибы [8].

Цель настоящих исследований: составить коллекцию чувствительных и устойчивых к тяжелым металлам культур микроорганизмов, выделенных из почв г. Алматы.

Объекты и методы исследования

Микробные сообщества городских почв изучали микробиологическими методами. Представители микробных сообществ выделяли на твердых (2% агара) селективных питательных средах в чашках Петри, на поверхность которых вносили почвенные вытяжки из урбанизированных (городских) почв. Почвенные образцы брали методом «конверта» (т.е. в 5 точках на одном

участке) из 4 участков городской территории, соблюдая стерильные условия для сохранения нативных структур почвенных микробоценозов. Затем смешивали эти пробы, просеивали через сита определенного диаметра. В этих объединенных образцах провели предварительно определение содержания в них ТМ, поскольку было необходимо знать уровень загрязнения почв ТМ.

Объектами исследования служили все выделенные из почвенных образцов свободноживущие почвенные микроскопические грибы, бактерии, дрожжи, актиномицеты, выделенные из почв г. Алматы, т.е. весь спектр возможных микроскопических обитателей почв.

Выделение бактериальных форм проводили обычными микробиологическими методами [9], при внесении почвенных вытяжек в качестве селективной среды МПА (или РПА) [10]. Азотфиксирующие бактерии выделяли на агаризованной безазотной среде Эшби, в состав которой входили, г/л: маннит – 15; K_2PO_4 – 0,2; $MgSO_4$ – 0,2; NaCl – 0,2; K_2SO_4 – 0,1; мел – 5; бактериальный агар – 15. Продолжительность культивирования чашек Петри: 5-10 дней при температуре $27\pm 3^\circ C$ [9]. Целлюлозоразлагающие бактерии были выделены с использованием селективной твердой питательной среды Гетчинсона, г/л: K_2HPO_4 – 1,0; $CaCl_2$ – 0,1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,3; NaCl – 0,1; $FeCl_3$ – 0,01; $NaNO_3$ – 2,5; целлюлозный порошок – 5; агар – 20 [10].

Микроскопические грибы также выделяли с помощью микробиологических методов с использованием агаризованной среды Чапека или Сабуро, г/л: глюкоза – 30,0; $NaNO_3$ – 2,0; KH_2PO_4 – 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5; KCl – 0,5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,01; $CaCO_3$ – 3,0; агар – 20. Инкубацию посевного материала (водную суспензию культур в объеме 0,25 мл с концентрацией клеток 10^6 - 10^8 кл/мл) проводили в термостате при температуре $28^\circ C$ в течение 10-30 суток [10].

Для выделения дрожжей использовали сусло-агар (СА) с 4 мл/л молочной кислоты для ингибирования роста бактерий [9]. Инкубацию чашек Петри проводили при температуре $+5^\circ C$ в течение 14-20 суток. При пересеве дрожжей использовали разведение 1:10 и 1:100.

Сначала мы получали чистые культуры многократным пересевом из единичных колоний культур. Родовое и видовое определение выделенных культур мы проводили по морфо-физиологическим и биохимическим признакам с помощью известных определителей, ссылки на которые поставлены в соответствующих местах текста, и микробиологического анализатора «Multiscan Ascent» (Финляндия). Считаем это необходимыми исследованиями для создания коллекции микробных культур, обладающих либо чувствительностью, либо устойчивостью к ТМ.

Результаты исследований

Из почвенных образцов г. Алматы было выделено 129 штаммов микробных культур. Часть из них была определена до родового и видового названий и вошла в коллекцию. Для составления коллекции чувствительных или устойчивых к ТМ культур мы придерживались нескольких принципов:

- популяция культуры должна быть многочисленной и типичной для городских почв;
- обладать либо чувствительностью, либо устойчивостью к ТМ;
- проводить определение родового и видового названий (или таксономии) культуры микробиологическими методами.

Все микробные культуры были выделены из почв г. Алматы в течение 2012-2013 гг. и депонированы в лаборатории биомониторинга Института магистратуры и PhD докторантуры КазНПУ им. Абая.

Выделенные культуры мы разделили на 3 большие группы, отличающиеся по реакции к ТМ: первая группа обладала чувствительностью по отношению к ТМ, вторая – условно устойчивая, третья – с хорошо выраженной устойчивостью к ТМ.

Группа чувствительных к ТМ микроорганизмов. Установление культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств бактерий произведено согласно определителю Берджи [11, '2], актиномицетов – определителю Г. Ф. Гаузе с соавт. [13], дрожжей – по определителям [14, 15].

Таксономия этой группы чувствительных к ТМ микроорганизмов представлена в таблице 1.

Характеристику этой группы лучше начать с азотфиксирующих бактерий, которые считаются индикаторами загрязнения почв. Бактерии рода *Azotobacter* относятся к аэробным почвенным организмам с широким спектром метаболической активности, главным из которого является способность в результате процесса азотфиксации переводить газообразный азот в растворимую форму, доступную для усваивания растениями. *Azotobacter* предпочитали в наших исследованиях температуру 20-25°C с аэрацией воздуха. Колонии имели приподнятую и округлую форму, ровные края, консистенцию гладкую, маслянисто-блестящую, сильно ослизненную, на поздних стадиях роста происходило образование коричневого пигмента. 2 штамма бактерий были отнесены к роду *Pseudomonas* и *Bacterium*, которые имели типичные для этих родов культурально-морфологические признаки, видовое название было установлено по физиолого-биохимическим свойствам. Еще 2 штамма бактерий мы отнесли к роду *Arthrobacter*, которые имели разные окраску колоний и биохимические характеристики, и по совокупности признаков были отнесены к разным видам. Сходные исследования позволили нам 2 штамма бактерий отнести к одному роду *Micrococcus*, а их свойства – к 2 разным видам. Оставшиеся 2 штамма по своим характеристикам были отнесены к *Escherichia coli* и *Xanthomonas malvacearum*.

Таблица 1 – Чувствительные к тяжелым металлам микробные культуры, выделенные из почв г. Алматы

№	Бактерии
1	<i>Azotobacter chroococcum</i> ИМД-3 (Beijerinck 1901)
2	<i>Azotobacter vinelandii</i> ИМД-1 ((Lipman 1903)
3	<i>Pseudomonas lasia</i> ИМД-1 (Fuller and Norman 1943)
4	<i>Bacterium cellaseum</i> ИМД-7 (Kellerman, McBeth, Scales and Smith) Krasil'nikov 1949
5	<i>Arthrobacter teregenses</i> ИМД-2 (Conn 1928) Connand and Dimmick 1947
6	<i>Arthrobacter globiformis</i> ИМД-1 и ИМД-2 (Conn 1928) Conn and Dimmick 1947
7	<i>Escherichia coli</i> ИМД-4 (Escherich 1885) Migula 1895, Castellani and Chalmers 1919
8	<i>Xanthomonas malvacearum</i> ИМД-3 (Ashby 1929) Dowson 1943
9	<i>Micrococcus auranticus</i> ИМД-6 (Migula 1900)
10	<i>Micrococcus luteus</i> ИМД-1 (Schroeter 1872) Cohn 1872
	Актиномицеты
1	<i>Streptomyces coelicolor</i> ИМД-1 (Müller 1908) Waksman and Henrici 1948
2	<i>Streptomyces albocyanus</i> ИМД-6 (Lindenbein 1952)
3	<i>Streptomyces chrysomallus</i> ИМД-3 (Frommer 1959)

4	<i>Streptomyces fuscus</i> ИМД-1 и ИМД-2 (Söhngen and Fol.Pridham et al., 1958)
	Дрожжи
1	<i>Rhodotorula glutinis</i> ИМД-3 (Fresenius 1863) Harrison 1927
2	<i>Sporobolomyces roseus</i> ИМД-2 (Kluyver et van Niel 1924)
3	<i>Cryptococcus terreus</i> ИМД-5 (di Menna 1954)
4	<i>Candida humicola</i> ИМД-5 (Castellani 1910) Berkhout 1923

4 штамма актиномицетов были отнесены к одному роду *Streptomyces*, но к разным видам.

Выделенные дрожжи были сгруппированы по культурально-морфологическим и физиологическим признакам в 4 группы, из которых были выбраны наиболее типичные штаммы, имеющие хорошую популяционную численность. Результаты работы показаны в таблице 1, в которой представлены 4 родовых и видовых названий дрожжей.

Таким образом, чувствительностью к ТМ обладали, в основном, представители бактерий, некоторые актиномицеты и дрожжи.

Группа условно устойчивых к ТМ микроорганизмов. В эту группу вошли разнообразные культуры, отнесенные к различным классам, родам и видам. Их объединение связано с реакцией на присутствие ТМ в почвенных образцах, которую можно охарактеризовать как сдержанную (таблица 2).

Таблица 2 – Группа условно устойчивых к тяжелым металлам микробных культур, выделенных из почв г. Алматы

Бактерии
<i>Bacillus subtilis</i> ИМД-1 (Ehrenberg 1835) Cohn 1872
<i>Bacillus album</i> ИМД-3 (Sternberg 1890)
<i>Bacillus cerulatum</i> ИМД-5 (Bienstock, Sternberg 1892)
<i>Cytophaga hutchinsonii</i> ИМД-5 (Winogradsky 1929, South and Tittley 1986)
Актиномицеты
<i>Streptomyces fradiae</i> ИМД-4 (Waksman and Curtis 1916)
<i>Streptomyces helvolus</i> ИМД-1 (Waksman and Henrici 1948)

Таким образом, к условно устойчивым культурам отнесены, в основном, спорообразующие бактерии рода *Bacillus* и целлюлозоразлагающие бактерии рода *Cytophaga*. Из актиномицетов только 2 вида обладали свойствами относительной устойчивости.

Группа устойчивых к ТМ микроорганизмов. Устойчивыми к ТМ оказались, в основном, почвенные микроскопические грибы. Определение родовой и видовой принадлежности представителей микробной группы, относящихся к микроскопическим грибам, проводили по определителям М. А. Литвинова и В. И. Билай [16, 17]. Изучаемые почвенные микроскопические грибы относятся к классу несовершенных грибов, представляли собой большую обособленную группу многокле-

точных микроскопических грибов, осуществляющих репродуктивное размножение только в виде бесполого (гаплоидного) конидиального спороношения. Основаниями для определения родового и видового названий микромицетов служили, в основном, культурально-морфологические признаки: структура мицелия и его окраска, форма конидиеносцев и макроконидий и др. Биоразнообразие микроскопических грибов, выделенных из почв г. Алматы, представлено в таблице 3.

Таблица 3 – Группа устойчивых к тяжелым металлам микробных культур, выделенных из почв г. Алматы

Микроскопические грибы
<i>Fusarium oxysporum</i> ИМД-2 (Schlechtendal 1824) Wollenweber 1913, Snyder et Hansen 1940
<i>Penicillium cloroleucen</i> ИМД-1 (Berk. and Broome 1881)
<i>Penicillium casei</i> ИМД-1 (W. Staub 1911)
<i>Aspergillus niger</i> ИМД-1 (van Tieghem 1867) Raper et Fennell, 1899
<i>Aspergillus varians</i> ИМД-4 (Raper et Fennell, 1899)
<i>Aspergillus clavatus</i> ИМД-2 (Desmazières 1834)
<i>Aspergillus pseudoclavatus</i> ИМД-5 (Purjewicz, 1899)

Таким образом, выделенные микромицеты были отнесены к 1 виду *Fusarium*, 2 видам *Penicillium* и 4 видам *Aspergillus*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Произведено более 1000 посевов на различные селективные питательные среды. Осуществлены пересевы для получения чистых культур. Выделены в чистые культуры 129 штаммов микробных культур. Описана морфология изучаемых культур. Произведено изучение физиолого-биохимических свойств выделенных культур с использованием различных методик. И, наконец, мы проанализировали множество признаков и характеристик изучаемых культур по нескольким определителям. В результате продолжительной и объемной работы мы создали коллекцию микробных культур почв г. Алматы, обладающих чувствительностью или устойчивостью по отношению к ТМ.

На основании изучения культурально-морфологических свойств выделенных популяций микробных культур мы обратили внимание на низкий уровень таксономического разнообразия микрофлоры городских почв. Нами также отмечена низкая обогащенность почв бактериями и высокая – микромицетами.

Таким образом, изучение микробных сообществ бактерий, актиномицетов, микромицетов и др. микроорганизмов позволило выделить чувствительные и устойчивые к ТМ микроорганизмы.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов ректора КазНПУ им. Абая МОН РК по фундаментальным исследованиям (договор № 1 от 01 апреля 2013 г.).

ЛИТЕРАТУРА

1 Costa C., Morel J.L. Cadmium uptake by *Lupinus albus* (L.): cadmium excretion, a possible mechanism of cadmium tolerance // J. Plant Nutr. – 1993. – Vol. 16. – P. 1921-1929.

² Свистова И.Д., Талалайко Н.Н., Щербаков А.П. Микробиологическая интоксикация урбаноземов г. Воронежа // Вестник ВГУ. Сер. Химия. Биология. – 2003. – № 2. – С. 146-150.

³ Olayinka A., Babalola G.O. Effects of copper sulphate application on microbial numbers and respiration, nitrifier and urease activities, and nitrogen and phosphorus mineralization in an alfisol // Biol. Agr. Hort. – 2001. – Vol. 19. – № 1. – P. 1-5.

⁴ Kelly J.J. et al. Changes in soil microbial communities over time resulting from one time application of zinc: a laboratory microcosm study // Soil Biol. Biochem. – 1999. – Vol. 31, N 10. – P. 1455-1465.

- 5 Колесников С.И. и др. Экологические функции почв и влияние на них загрязнения тяжелыми металлами // Почвоведение. – 2002. – № 12. – С. 1509-1514.
- 6 Сковорода И.Н., Строганова М.Н., Николаева Д.А. Азотобактер в почвах города Москвы // Почвоведение. – 1997. – № 3. – С. 1-8.
- 7 Павлова Н.Н., Егорова Е.И. Некоторые показатели биологической активности почвенных микроорганизмов как индикаторы антропогенного загрязнения почв тяжелыми металлами и радионуклидами // Тезисы докл. II междунар. конф. «Современные проблемы загрязнения почв», 2007, май. – М., 2007. – Т. 2. – С. 146-147.
- 8 Мынбаева Б.Н. и др. Оценка токсического эффекта тяжелых металлов на почвенную биоту // Вестник НАН РК. – 2013. – № 1. – С. 41-47.
- 9 Нетрусов А.И. и др. Практикум по микробиологии. – М.: МГУ, 2005. – 608 с.
- 10 Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д. Г. Звягинцева. – М.: МГУ, 1991. – 303 с.
- 11 Определитель бактерий Берджи. Т.1 / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, С. Уильямса. – М.: Мир, 1997. – 432 с.
- 12 Краткий определитель бактерий Берги / Под ред. Дж. Хоулта. – М.: Мир, 1997. – 496 с.
- 13 Определитель актиномицетов. Роды *Streptomyces*, *Streptoverticillium* / Ред. Г. Ф. Гаузе и др. – М.: Наука, 1983. – 248 с.
- 14 Бабьева И.П., Голубев В.И. Методы выделения и идентификации дрожжей. – М.: Пищевая промышленность. – 1979. – 120 с.
- 15 The Yeasts: A Taxonomic Study. 3rd Ed. / Edit.: N. J. W. Kregervan Rij. – Amsterdam: Elsevier, 1984. – 1082 p.
- 16 Билай В.И. Фузари. – Киев: Наукова думка, 1977. – 443 с.
- 17 Литвинов М.А. Определитель микроскопических почвенных грибов. – Л.: Наука, 1967. – 311 с.

REFERENCES

- 1 Costa C., Morel J.L. Cadmium uptake by *Lupinus albus* (L.): cadmium excretion, a possible mechanism of cadmium tolerance. J.Plant Nutr. **1993**. 16. 1921-1929.
- 2 Svistova I.D., Talalajko N.N., Shherbakov A.P. Mikrobiologicheskaja intoksikacija urbanozemov g.Voronezha. Vestnik VGU. Ser. Himija. Biologija. **2003**. 2. 146-150 (in Russ.).
- 3 Olayinka A., Babalola G.O. Effects of copper sulphate application on microbial numbers and respiration, nitrifier and urease activities, and nitrogen and phosphorus mineralization in an alfisol. Biol. Agr. Hort. **2001**. 1. 1-5.
- 4 Kelly J.J. et al. Changes in soil microbial communities over time resulting from one time application of zinc: a laboratory microcosm study. Soil Biol. Biochem. **1999**. 10. 1455-1465.
- 5 Kolesnikov S.I. i dr. Jekologicheskie funkicii pochv i vlijanie na nih zagrjaznenija tjazhelymi metallami. Pochvovedenie. **2002**. 12. 1509-1514 (in Russ.).
- 6 Skvorcova I.N., Stroganova M.N., Nikolaeva D.A. Azotobakter v pochvah goroda Moskvy. Pochvovedenie. **1997**. 3. 1-8 (in Russ.).
- 7 Pavlova N.N., Egorova E.I. Nekotorye pokazateli biologicheskoy aktivnosti pochvennyh mikroorganizmov kak indikator antropogennogo zagrjaznenija pochv tjazhelymi metallami i radionuklidami. Tezisy dokl. II mezhd. konf. «Sovremennye problemy zagrjaznenija pochv», 2007, maj. M. **2007**. 2. 146-147 (in Russ.).
- 8 Mynbaeva B.N. i dr. Ocenka toksicheskogo jeffekta tjazhelyh metallov na pochvennuju biotu. Vestnik NAN RK. **2013**. 1. 41-47 (in Russ.).
- 9 Netrusov A.I. i dr. Praktikum po mikrobiologii. M.: MGU. **2005**. 608 (in Russ.).
- 10 Metody pochvennoj mikrobiologii i biohimii. Pod red. D.G.Zvjaginceva. M.: MGU. **1991**. 303 (in Russ.).
- 11 Opredelitel' bakterij Berdzhii. T.1. Pod red. Dzh.Houlta, N.Kriga, P.Snita, S.Uil'jamsa. M.: Mir. **1997**. 432.
- 12 Kratkij opredelitel' bakterij Bergi. Pod red. Dzh.Houlta. M.: Mir. **1997**. 496 (in Russ.).
- 13 Opredelitel' aktinomicetov. Rody *Streptomyces*, *Streptoverticillium*. Red. G.F.Gauze i dr. M.: Nauka. **1983**. 248 (in Russ.).
- 14 Bab'eva I.P., Golubev V.I. Metody vydelenija i identifikacii drozhzhej. M.: Pishhevaja promyshlennost'. **1979**. 120.
- 15 The Yeasts: A Taxonomic Study. 3rd Ed. / Edit.: N.J.W.Kregervan Rij. – Amsterdam: Elsevier, 1984. – 1082 p.
- 16 Bilaj V.I. Fuzarii. Kiev: Naukova dumka. **1977**. 443 (in Russ.).
- 17 Litvinov M.A. Opredelitel' mikroskopicheskikh pochvennyh gribov. L.: Nauka. **1967**. 311 (in Russ.).

Резюме

Б. Н. Мынбаева¹, Г. Б. Әсемқұлова²

(¹Абай атындағы Қазақ ұлттық педагогикалық университеті, Алматы, Қазақстан Республикасы,

² Т. Рысқұлов атындағы Қазақ экономикалық университеті, Алматы, Қазақстан Республикасы)

АЛМАТЫ ТОПЫРАҒЫНАН АЛЫНҒАН ЖӘНЕ АУЫР МЕТАЛҒА ӘРҚАЛАЙ СЕЗІМТАЛ

МИКРОБ ДАҚЫЛДАР

Мақалада Алматы топырағынан алынған дақылдың түрін ажырату бойынша жүргізілген микробиологиялық зерттеу нәтижесі баяндалады. Бұл дақылдардың ауыр металдарға сезімталдығы бойынша 3 топқа біріктірілген. 1 топқа бактерияның 10 түрі жатады, 4 – актиномицеттер және 4 ашытқылар әртүрлі түрден; 2 топқа – споратүзушілердің 3 түрі жатады және 1 түрі жатады целлюлозақиратушы бактерия; 3 топқа – *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* топырақ микроскопиялық саңырауқұлақтары жатады.

Тірек сөздер: микробоценоз, қала топырағы, бактериялар, актиномицеттер, ашытқылар, микроскопиялық саңырауқұлақтар.

Summary

*B. N. Mynbayeva, G. B. Asemkulova*²

(¹Kazakh national pedagogical university named after Abai, Almaty, Republic of Kazakhstan,

² Kazakh economic university after T. Ryskulova, Almaty, Republic of Kazakhstan)

MICROBIAL CULTURES ISOLATED FROM ALMATY CITY SOILS, AND SHOWED DIFFERENT REACTIONS TO THE PRESENCE OF HEAVY METALS

In the article are presented the results of microbiological tests to taxonomic identify keys for cultures isolated from Almaty city soils. These cultures have been merged into 3 groups according to their response to heavy metals: sensitive to them, relatively stable and resistant. To group 1 was classified 10 species of bacteria, 4 – actinomycetes and 4 – yeast from different genera; to the 2-nd – 3 species of spore-forming bacteria and 1 type cellulose-decomposing bacteria; to 3-rd group – the microscopic soil fungi of the genera *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*.

Keywords: microbocenosis, urban soils, bacteria, actinomycetes, yeasts, fungi.

Поступила 19.09.2013 г.