

Научно-исследовательская работа по

Экологии

**Анализ изменения микробиологического состояния снежного и почвенного
покрова Мурманской области**

Выполнила:

Дядик Тамара Владимировна

Учащаяся 10 класса

МБОУ СОШ № 15, город Апатиты

Коркачева Дина Александровна,

Научный руководитель

учитель информатики МБОУ СОШ

№ 15, город Апатиты

Корнейкова Мария Владимировна,

Научный консультант

кандидат биологических наук,

заведующий лаборатории экологии

микроорганизмов Института

проблем промышленной экологии

Севера КНЦ РАН

Введение

Одна из важнейших проблем городов – все возрастающее загрязнение окружающей среды химическими элементами, которое представляет опасность для живых организмов и, в первую очередь, для человека. Невнимание к проблемам меняющейся под воздействием человека экологической обстановки способно привести к непоправимым последствиям.

Микроорганизмы являются биоиндикаторами загрязнения окружающей среды, а их исследование одним из наиболее информативных методов анализа окружающей среды. Микробиологический анализ нужен нам для того, чтобы своевременно констатировать изменения в окружающей человека экосистемах.

Объектом настоящего исследования является микробиологическое состояние почвенного и снежного покрова в трех геолокациях, расположенных на территории Мурманской области: в г. Апатиты (антропогенный ландшафт), в промышленной зоне комбината Североникель (техногенный ландшафт) и на границе Лапландского заповедника в районе реки Чуна (природный ландшафт).

Предметом исследования являются микроорганизмы (колонии грибов), содержащиеся в снежном и почвенном покровах в выбранных для исследования геолокациях.

В ходе исследования была выдвинута следующая гипотеза: в результате длительного антропогенного и техногенного воздействия на природные экосистемы изменяется микробиологическое состояние снежного и почвенного покровов

Целью работы стала оценка изменений микробиологического состояния снежного и почвенного покровов, сформировавшихся под влиянием интенсивного антропогенного и техногенного воздействий на природные экосистемы, формирующие среду обитания и жизнедеятельности человека.

Для достижения поставленной цели в работе были решены следующие задачи:

1. Изучены снег и почва как места обитания микроорганизмов

2. Изучены и освоены методики посева и учета микроорганизмов на плотных питательных средах

3. Проведен микробиологический анализ снежного и почвенного покровов

4. Проанализированы различия в микробиологическом состоянии снежного и почвенного покрова

Микроорганизмы почвы

Основные среды обитания микроорганизмов в природе – вода, воздух и почва. В целях данного исследования в качестве среды обитания микроорганизмов будут изучены почва и снег.

Почва является естественным местом проживания многих микроорганизмов.

В почве они находят все условия, необходимые для развития: питательные вещества, влагу, достаточную аэрацию, защиту от прямых солнечных лучей и высушивания. По мере углубления число микроорганизмов сокращается. На глубине в 25 см количество их в 10-20 раз меньше, чем в поверхностном слое толщиной 1-2 см. На глубине более 1,5 м встречаются лишь единичные особи. Меняется с глубиной и качественный состав микробиоты [1].

Необходимо отметить, что существует преобладание грибов определенных видов в разных типах почв, например, в северной зоне, где слабы минерализационные процессы, — грибы родов *Penicillium* и *Mucor*, размножающиеся на субстратах с большим количеством свежих растительных остатков. По мере продвижений к югу их вытесняют представители рода *Aspergillus*, в южных почвах уменьшается не только общая численность грибов рода *Penicillium*, но и разнообразие их видового состава. В черноземах, каштановых почвах и сероземах обильна развиваются грибы рода *Fusarium*, широко распространенные и в почвах тропических лесов. Некоторые грибы

живут в широком диапазоне щелочно-кислотных условий и встречаются в кислых, нейтральных и щелочных почвах [2].

На количественный и качественный состав микроорганизмов оказывают влияние различные факторы. К основным следует отнести следующие:

- тип почв: наиболее богаты микроорганизмами черноземные почвы (около 1 млрд кл./г почвы), ввиду обильной растительности с богатой корневой системой [3]. Кроме того, характер почв влияет и на глубину проникновения микроорганизмов. Так, в более влажных северных почвах жизнь микроорганизмов как бы «прижата» к поверхности, а в легких, щелочных (южных почвах) – жизнь микроорганизмов «углубляется» [4];

- влажность почвы: во влажных почвах размножение микроорганизмов лучше, чем в сухих. Однако в почвах торфяных болот (несмотря на большое количество влаги и органических веществ), микроорганизмов мало, поскольку эти почвы имеют кислую среду;

- аэрация: песчаные почвы аэрируются лучше, поэтому в них больше микроорганизмов;

- климатические условия и сезонность: в теплое время года микроорганизмов в почве гораздо больше, чем зимой. Биологическая активность всех почвенных микроорганизмов увеличивается осенью и заметно снижается в зимний период.

Микроорганизмы снега

Снег – это форма атмосферных осадков, состоящая из мелких кристаллов льда. Снег обладает высокой сорбционной способностью и поглощает из атмосферы как микроорганизмы, так и вредные вещества (газовые и пылевые массы). Группа ученых из университета Луизианы обнаружила, что за образование почти всех осадков, в том числе и снега, могут отвечать бактерии *Pseudomonas syringae* [5]. Численность бактерий на поверхности снегов варьируется в широких пределах, но в целом сравнительно невысока и

составляет от 100 до 1 млн кл/мл. талой воды. Для сравнения, численность бактерий в 1 грамме почвы достигает 1 млрд.клеток [6].

Снег можно считать «временным» местообитанием живых микроорганизмов, поскольку при изменении температуры он превращается в талую воду и затем, вместе с накопленными веществами поступает в почву.

Количественный состав микроорганизмов в снежных покровах, как и в почве, напрямую зависит от ряда факторов: высоты, плотности, слоистости и продолжительности залегания снежного покрова, а также антропогенной и техногенной нагрузки на экосистему.

Исходя из вышесказанного можно обобщить и систематизировать факторы, влияющие на количество и качество микроорганизмов, обитающих в снежных и почвенных покровах (рис.1)

Почвенные покровы	Снежные покровы
<ul style="list-style-type: none">•тип почв•аэрация•влажность•климатические условия и сезонность	<ul style="list-style-type: none">•высота снежного покрова•плотность•слоистость•продолжительность залегания

Рисунок 1- Факторы, влияющие на количество и качество микроорганизмов

Оценка состояния обитающих в почве и снеге микроорганизмов, их биоразнообразие имеет важное значение при экологическом мониторинге: выделении зон экологического неблагополучия, расчете ущерба, нанесенного деятельностью человека, определении устойчивости экосистемы и воздействию тех или иных антропогенных, техногенных и природных факторов. Поэтому в качестве объектов исследования были выбраны снежные и почвенные покровы как биоиндикаторы загрязнения окружающей среды.

Содержание методики посева и учета на плотных питательных средах

В лабораторной практике применяются два метода количественного учета микроорганизмов [5]:

1. Метод посева и учет на плотных питательных средах;
2. Методы прямого учета под микроскопом.

Выбор метода зависит от цели исследования. Используемая нами в данной работе методика посева на плотные питательные среды позволяет учесть не только численность микроорганизмов, но и получить чистые культуры. В большинстве случаев для изучения и учёта микроорганизмов проводится поверхностный посев на чашки Петри. Глубинный посев проводится реже, как правило, для учёта грибов.

Для получения сравнимых результатов подсчёт колоний определённой группы микроорганизмов проводят через одно и тоже время. Обычно учёт микрофлоры на мясопептонном агаре проводят через трое суток после посева, актиномицетов через 7-15, грибов и дрожжей 5-7 суток. Колонии считают с обратной стороны чашки, отмечая их чернилами. В случае непрозрачности сред, учет ведется сверху чашки. После подсчета числа колоний на параллельных чашках, находится среднее и, исходя из полученных данных, определяется количество клеток в 1 мл исследуемой суспензии (предполагается, что условно 1 клетка, спора или обрывок гифы дают 1 колонию).

На каждой чашке проводят внимательное сравнение и описание морфологии колоний под лупой. Далее составляется описание колоний по следующей схеме:

1. Форма колоний: округлая, неправильная, амёбовидная, ризойдная.
2. Профиль колоний: плоский, выпуклый, конусовидный, каплевидный, вогнутый
3. Цвет колоний
4. Форма края колонии: дольчатый, выпуклый-зубчатый, цельный, бахромчатый, разорванный, спиралевидный, ветвистый, и т.п.
5. Структура колонии: крупнозернистая, мелкозернистая, струйная, волокнистая
6. Вид микрогрибов (определялся по справочнику [Index Fungorum]).

Для разведений готовят пробирки со стерильной водой по 9 мл в каждой. Стерильной пипеткой берут 1 мл исследуемого материала и вносят в пробирку, и получают разведение 1:10 или первое разведение, далее 1 мл полученной суспензии переносят в следующую пробирку и получают разведение 1:100 или третье разведение и т.д. Таким образом, в 1 мл суспензии во втором разведении содержится в 10 раз меньше клеток, чем в первом, а в третьем разведении – в 100 раз меньше клеток и т.д.

В данной работе очень важно провести тщательное перемешивание суспензии при помощи пипетки. После подготовки разведения проводится посев на нужные среды из подходящего разведения.

Характеристика места взятия проб почвенного и снежного покровов

Для проведения эксперимента нами было определено 3 места отбора снежных и почвенных проб, расположенных в разных районах Мурманской области. Почвенные и снежные пробы для микробиологического анализа брали в течение двух лет. Для оценки последствий антропогенного и техногенного воздействия на природные экосистемы взятие проб осуществлялось в зоне длительного техногенного воздействия - район города Мончегорска вблизи комбината «Североникель», в относительно чистой экологической зоне (без существенного техногенного и антропогенного воздействия) - район Лапландского заповедника вблизи реки Чуна и в зоне сильного антропогенного воздействия - город Апатиты, Академгородок. Выбор пробных площадей был обусловлен выдвинутой ранее гипотезой. Описание мест взятия проб и их характеристика представлены в Приложении 1.

Постановка эксперимента

Взятие снежных и почвенных проб осуществлялось разными способами и в разное время года, исходя из общепринятых методик. С каждого пробного участка взято по три в 2017 году и по пять в 2018 году индивидуальных образцов снега и почвы.

Снежные пробы. Отбор снежных проб был проведен в середине мая. Высота снежного покрова в местах взятия проб составляла не менее метра. Все пробы отбирались с помощью пластиковой трубы диаметром 10 см и длиной 30 см. Затем полученный снежный столб помещался в заранее подготовленные и промаркированные контейнеры. Далее путем естественного снеготаяния при температуре 25 градусов Цельсия, снежные пробы превращались в талую воду для дальнейших исследований.



Рисунок 2 - Результаты посева грибов в пробах снега

Почвенные пробы. В начале сентября 2017 и 2018 гг. были отобраны почвенные пробы. Для этого на пробных площадях мы выкапывали куб земли 30*30*25(22) и срезали с него ножом, заранее подготовленным и обработанным 96% спиртом, слой корней. Далее полученную пробу помещали в стерильную крафт бумагу. Каждая проба была пронумерована, подписана и помещена в полиэтиленовый пакет.

Далее полученный экспериментальный материал исследовался в Лаборатории «Экология микроорганизмов» ИППЭС КНЦ РАН. Микробиологическое исследование выполнено общепринятой в практике стандартной методикой, описанной в теоретической части работы в п.1.3. На рисунке 2 показаны результаты посева грибов в пробах снега в первом и втором разведениях.

Результаты эксперимента и их анализ

Проведенный в 2017-2018 годах эксперимент показал четкую взаимосвязь между видами загрязнения, обусловленными воздействием человека на природные экосистемы, и количеством микроорганизмов и изменением их численности в течение двух лет в снежном и почвенном покровах (табл.1,2).

Таблица 1. Динамика численности колоний грибов в снежном покрове

Место взятия	2017		2018	
	Всего колоний	Площадь взятия проб	Всего колоний	Площадь взятия проб
Экологически чистый район (природный заповедник - Река Чуна):	130	225 м ²	106	225 м ²
Антропогенное (городская черта г.Апатиты - Академический городок)	253	225 м ²	110	225 м ²
Техногенное (вблизи комбината «Североникель»)	21	225 м ²	90	225 м ²

Таблица 2. Динамика численности колоний грибов в почвенном покрове

Место взятия	2017		2018	
	Всего колоний	Площадь взятия проб	Всего колоний	Площадь взятия проб
Экологически чистый район (природный заповедник - Река Чуна):	76	225 м ²	451	225 м ²
Антропогенное (городская черта г.Апатиты - Академический городок)	49	225 м ²	478	225 м ²
Техногенное (вблизи комбината «Североникель»)	19	225 м ²	364	225 м ²

Из таблиц 1 и 2 видно, что наибольшее количество микроорганизмов было обнаружено в снежных и почвенных покровах в районе Академгородка г.Апатиты. Очевидно, данный факт обусловлен спецификой загрязнения снега в городе: бытовые отходы, экскременты, шерсть домашних животных и городских птиц, продукты дыхания человека и животных.

Наименьшее количество микроорганизмов обнаружено в районе комбината «Североникель», это обусловлено большим количеством выбросов, длительным и интенсивным химическим загрязнением атмосферы и почвы солями серной кислоты, что сделало природную среду малоприспособленной для жизни микроорганизмов.

Среднее, очевидно, соответствующее природным «фоновым» концентрациям значение было обнаружено в снежном и почвенном покрове в районе реки Чуна на территории Лапландского заповедника.

Изменение только численности микроорганизмов в почве и в снегу не является достаточной доказательной базой для подтверждения поставленной гипотезы, поэтому мы решили изучить их видовое разнообразие. Изучение видов, полученных образцов осуществлялось под микроскопом, а их вид определялся по справочникам.

Для изучения видового состава микрогрибов рассчитаем их обилие в снежном и почвенном покрове:

$$\text{Обилие} = \frac{\text{количество грибов одного вида}}{\text{общее количество грибов}} \times 100\%$$

Результаты приведены в таблицах(3,4,5)

Таблица 3. Обилие микрогрибов (г. Апатиты)

Место	Вид	Количество (%)	
		2017	2018
Апатиты	<i>Aspergillus repens</i>	-	30
Апатиты	<i>Aspergillus niger</i>	-	9
Апатиты	<i>Areobasidium pullulans</i>	-	22
Апатиты	<i>Penicillium decumbens</i>	-	10
Апатиты	<i>Sterilia mycelia</i>	-	3
Апатиты	<i>Aspergillus fumigatus</i>	36	-

Таблица 4. Обилие микрогрибов (в районе «Североникеля»)

Место	Вид	Количество (%)	
		2017	2018
«Североникель»	<i>Aspergillus niger</i>	-	8
«Североникель»	<i>Penicillium multicolor</i>	-	1
«Североникель»	<i>Penicillium glabrum</i>	19	71
«Североникель»	<i>Penicillium janthirellum</i>	19	1
«Североникель»	<i>Penicillium implicatum</i>	25	8
«Североникель»	<i>Aspergillus repens</i>	-	2

Таблица 5. Обилие микрогрибов (район реки «Чуны»)

Место	Вид	Количество (%)	
		2017	2018
Река «Чуна»	<i>Aspergillus repens</i>	-	2
Река «Чуна»	<i>Aspergillus niger</i>	-	22
Река «Чуна»	<i>Aspergillus sydowii</i>	-	5
Река «Чуна»	<i>Penicillium glabrum</i>	-	27
Река «Чуна»	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	-	2
Река «Чуна»	<i>Cladosporium herbarum</i>	-	2

Река «Чуна»	<i>Strachybotrys chartonum</i>	-	2
Река «Чуна»	<i>Monilia sitophila</i>	6	-
Река «Чуна»	<i>Aspergillus fumigatus</i>	10	-
Река «Чуна»	<i>Penicillum janthinellum</i>	5	-

Из таблиц видно, что в разные периоды взятия проб наблюдается разный видовой состав микроорганизмов. Данное различие может быть обусловлено, прежде всего, разными метеорологическими условиями (влажность, температура, количество осадков и т.п). Кроме того, следует отметить, что летом 2017 года была низкая температура, а летом 2018 года температура была аномально высокой для наших широт, объясняя тем самым резкое увеличение разных видов гриба рода *Aspergillus*, распространённых в более южных широтах. Данный вид микроорганизма является условно-патогенным и его доминирование в городской черте (район Академгородка в г. Апатиты) обусловлено спецификой антропогенных загрязнений.

В районе комбината «Североникель», особых изменений в видовом составе не произошло. Наблюдается отсутствие многообразия различные видов микроорганизмов, доказывая тем самым значительное техногенное воздействие на экосистемы данного района. Незначительное число микрогрибов рода *Penicillum* объясняется их высокой адаптационной способностью.

В районе реки «Чуна», являющимся наиболее чистым районом наблюдается самое большое разнообразие родов (*Penicillum*, *Aspergillus*, *Monilia*, *Strachybotrys*, *Cladosporium*), это может быть обусловлено тем, что в этом районе нет ни сильного антропогенного, ни техногенного воздействий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования поставленная цель была достигнута, а выдвинутая гипотеза - доказана.

В ходе исследования были получены результаты и сделаны следующие выводы:

1. Оценка состояния обитающих в почве и снеге микроорганизмов имеет важное значение при экологическом мониторинге: выделении зон экологического неблагополучия, расчете ущерба, нанесенного деятельностью человека, определении устойчивости экосистемы и воздействию тех или иных антропогенных, техногенных и природных факторов.

2. В результате проведенного эксперимента была обнаружена различная концентрация микроорганизмов в снежных и почвенных покровах. Количество микробов и микробиологическое разнообразие в почве выше по сравнению со снегом. **График численность снег/почва**

3. Анализ показал, что наибольшее количество микроорганизмов обитает в городских снежных и почвенных покровах. Данный факт обусловлен, главным образом, спецификой антропогенного загрязнения снега в городе (бытовые отходы, экскременты и шерсть домашних животных и городских птиц, продукты дыхания человека и животных). Техногенное воздействие, проявляющееся в районе комбината «Североникель» в форме длительного и интенсивного химического загрязнения атмосферы и почвы солями серной кислоты, сделало природную среду малоприспособленной для жизни микроорганизмов. Поэтому численность бактерий и грибов в этих пробах оказалась наименьшей. В пробах снега из экологически благополучного района реки Чуна в результате эксперимента было обнаружено среднее для исследованных пробных территорий количество микроорганизмов, которое можно считать естественным «фоновым» природным значением.

4. Результаты анализа видовой разнообразия микрогрибов также однозначно свидетельствует о более «благоприятной» среде обитания в городе

по сравнению с подвергшейся длительному техногенному воздействию средой в районе комбината «Североникель» и естественной природной средой.

Для кого для грибов или для людей,

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Полянская М.Л., Горбачева М.А., Звягинцева Д.Г. Размеры бактерий в черноземе в ходе микробной сукцессии при инкубировании почвы в аэробных и анаэробных условиях // Почвоведение. - №11. – 2012, с.1181-1187.
2. Микроорганизмы в почве [Электронный ресурс]
URL: <http://www.activestudy.info/mikroorganizmy-v-pochvax/>
3. Анализ жизнедеятельности микроорганизмов почвы [Электронный ресурс] URL: www.newreferat.com/
4. Дождь и снег появляются благодаря бактериям в облаках //Membrana. Люди. Идеи. Технологии. [Электронный ресурс] URL: www.membrana.ru/particle/12352
5. Лабораторный практикум по микробиологии [Электронный ресурс]
URL: www.docme.ru
6. Лопатина А.В. Оценка разнообразия микроорганизмов поверхностного снега прибрежных зон Восточной Антарктиды. Режим доступа.- www.elibrary.ru

ПРИЛОЖЕНИЯ