

КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИНСТИТУТ ЭКОЛОГИИ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЯ

Кафедра прикладной экологии

С.Ю. СЕЛИВАНОВСКАЯ, В.З. ЛАТЫШОВА

МИКРООРГАНИЗМЫ В КРУГОВОРОТЕ
БИОГЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

Часть 1. Азот

**Методические указания к курсу «Агроэкологический
мониторинг»**

Казань – 2014

УДК 504.064
ББК С29

*Принято на заседании кафедры прикладной экологии
Протокол № 5 от 26 декабря 2014 года*

Рецензент:

кандидат химических наук,
доцент кафедры прикладной экологии КФУ **О.Г. Яковлева;**

Селивановская С.Ю., Латыпова В.З.

Микроорганизмы в круговороте биогенных элементов. Часть 1.

**Азот/ С.Ю. Селивановская, В.З. Латыпова. – Казань: Казан. ун–т,
2014. – 38 с.**

Учебно–методическое пособие для сопровождения работ по курсу «Агроэкологический мониторинг». В пособии рассмотрены основные звенья круговорота азота – одного из основных биогенных элементов. Приведены основные способы культивирования микроорганизмов, осуществляющих процессы азотфиксации, аммонификации, нитрификации и денитрификации, а также методы контроля интенсивности процессов.

Предназначено для студентов, специализирующихся в области экологии и охраны окружающей среды.

© Селивановская С.Ю., Латыпова В.З., 2014
© Казанский университет, 2014

Содержание

1	Введение	5
2	Отбор и подготовка почвенных образцов для бактериологических исследований	8
3	БИОЛОГИЧЕСКАЯ ФИКСАЦИЯ АЗОТА	9
4	Выявление азотфиксирующих бактерий рода <i>Azotobacter</i>	10
5	Выявление азотфиксаторов рода <i>Clostridium</i>	11
6	АММОНИФИКАЦИЯ	12
7	Выявление аммонифицирующих бактерий	14
8	Проба на аммиак	15
9	Проба на сероводород	15
10	Проба на индол	15
11	НИТРИФИКАЦИЯ	15
12	Проба на аммиак	18
13	Проба на нитриты	18
14	ДЕНИТРИФИКАЦИЯ	19
15	ВЛИЯНИЕ АНТРОПОГЕННЫХ ФАКТОРОВ НА ПРОЦЕССЫ ПРЕВРАЩЕНИЯ АЗОТА	21
16	Минеральные соединения	21
17	Металлы	23
18	Нефтяное загрязнение	24
19	Осадки сточных вод	24
20	ЛИТЕРАТУРА	26

ВВЕДЕНИЕ

Азот – один из главных биофильных элементов, который входит в состав основных полимеров любой живой клетки: структурных белков, белков–ферментов, нуклеиновых и аденозинфосфорных кислот. Кроме того, азот определяет первичную продуктивность большинства экосистем. В атмосфере, почве, воде азот находится в виде следующих соединений: NH_3 , NH_4 , N_2O , NO , NO_2 , HNO_2 , HNO_3 . Питание всех растений и животных, а также большинства микроорганизмов зависит от источников связанного азота. Связанный азот в форме NH_4 , нитрата, органических соединений, относительно дефицитен в почве. Поэтому он представляет собой фактор, ограничивающий развитие живых организмов в природе. В то же время, молекулярный азот имеется в атмосфере в избытке – 78,9%. Однако этим запасом могут воспользоваться только микроорганизмы, т.к. ни растения, ни животные не располагают системой, связывающей молекулярный азот. В почве азот может быть заключен в недоступных растениям сложных органических соединениях, которые минерализуются очень медленно, что приводит к необходимости подкормки растений азотными удобрениями. В то же время, коэффициент использования удобрений растениями не превышает 50%. При широком применении азотных удобрений большое количество азота не включается урожай и избыток азота вызывает загрязнение отдельных экосистем и биосферы в целом. Таким образом, проблема азота превращается в глобальную проблему, в связи с чем должны решаться следующие важнейшие задачи жизнеобеспечения:

снижение расходов на энергозатраты при производстве минеральных удобрений;

охрана природной среды;

разработка оптимизированных режимов обработки почв;

создание новых способов контроля и управления биологическим азотом.

Круговорот азота в природе можно условно разбить на несколько основных звеньев, в которых главными агентами выступают микроорганизмы (рис.1). Азот в этом цикле участвует в газообразной форме, в виде минеральных и органических соединений.

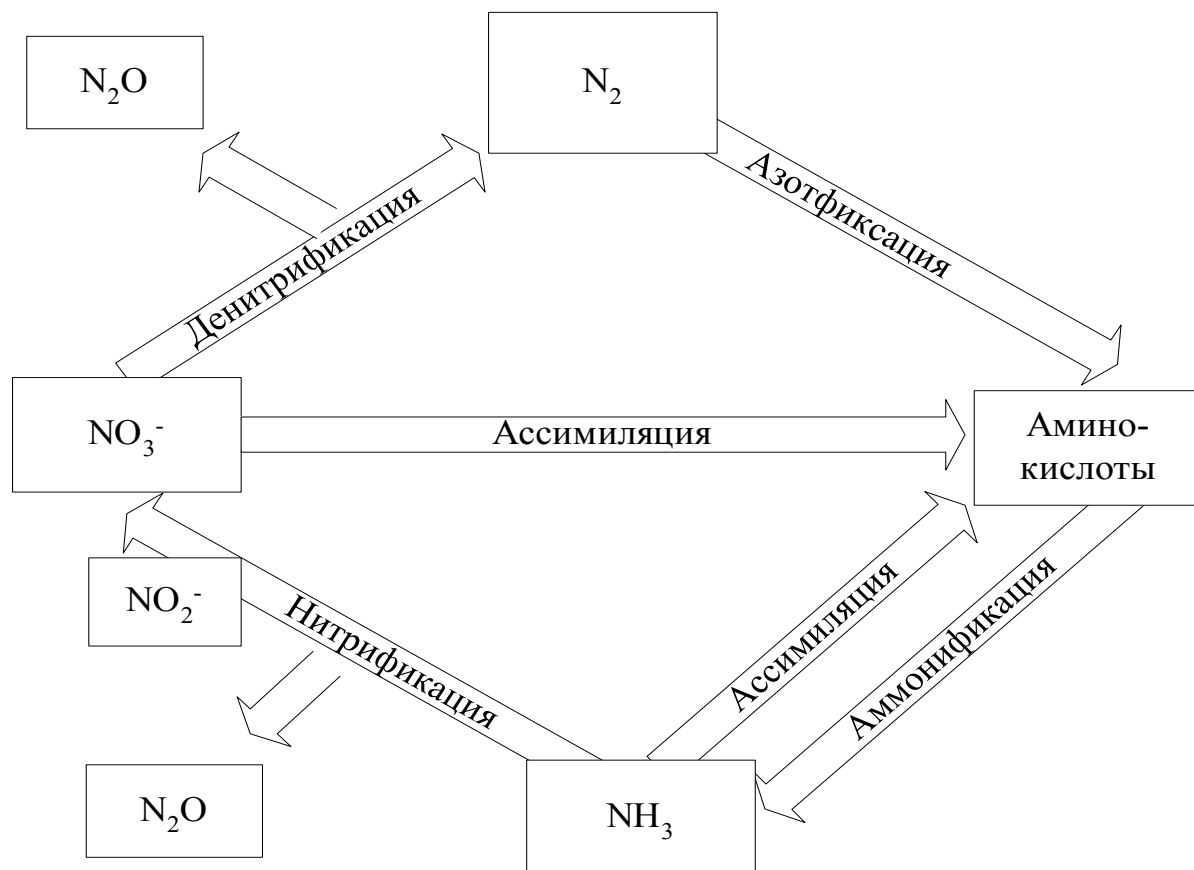


Рис.1 Основные этапы круговорота азота

При фиксации азота микроорганизмами происходит его восстановление (азотфиксация); разложение органических азотсодержащих соединений (аммонификация) приводит к освобождению азота в форме аммиака, который далее последовательно окисляется до нитритов и нитратов (нитрификация). Окисленный азот восстанавливается до N_2 в процессе денитрификации. Аммонийные и нитратные формы азота ассимилируются растениями и

микроорганизмами, что приводит к временному закреплению азота в органических веществах, его иммобилизации в микробной биомассе.

Другими словами, круговорот азота в природе осуществляется следующим образом. Высшее растение синтезирует белок в своем теле из связанного азота и углеводов. Растения поедаются животными, которые сами не в состоянии синтезировать белки из углеводов и минерального азота. Отмирая, животные и растения становятся пищей гнилостных бактерий, разлагающих белки до аммиака, эти же бактерии разлагают и белки, находящиеся в навозе. Аммиак усваивается растением или нитрифицируется. Азотфиксаторы фиксируют атмосферный азот и переводят его опять в белковый, который в дальнейшем может разлагаться гнилостными бактериями. Денитрификаторы, разлагая нитраты, выделяют азот в атмосферу. Так происходит круговорот азота в природе; он переходит из одной формы в другую, подтверждая закон сохранения вещества, открытый гениальным М.В. Ломоносовым.

Поскольку основные этапы круговорота азота осуществляются почвенными микроорганизмами, именно почвенные образцы являются источниками возбудителей процессов азотного обмена.

Отбор и подготовка почвенных образцов для бактериологических исследований

Для получения наиболее правильного представления о возбудителях процессов метаболизма азота берется несколько проб с площадки от 100 м² до 1га (в количестве от 5 до 15).

Почвенные образцы отбирают в стерильные пергаментные или холщевые пакеты. Для отбора почвенных образцов используют титановые совки, маленькие лопаты, почвенный бур. Оборудование протирают ватным тампоном, смоченным спиртом, и обжигают на пламени. Для отбора средней

пробы методом конверта выкапывают стерильной лопатой цельный монолит почвы до нужной глубины. Затем с одной из боковых поверхностей стерильным ножом срезают пласт толщиной 1–1,5 см и из середины куска на заданной глубине от верха отделяют стерильной ложкой 200–300 г почвы в стерильную тару.

Средние смешанные образцы почвы должны весить не менее 1 кг. На мешок или банку, куда помещают среднюю пробу, наклеивают этикетку с указанием даты и места взятия образца, горизонта, площади обследуемой территории.

Отобранные образцы укладывают в деревянный ящик с гнездами для каждой пробы и немедленно доставляют в лабораторию, где приступают к обработке в тот же день. Допускается хранение почвенных образцов в холодильнике в течение 48 час. При температуре 2–4⁰С.

Перед исследованием образцы почв высыпают на стерильную плотную бумагу и освобождают от крупных включений: корней, щебня, стекла и т.п. Затем на стерильном часовом стекле взвешивают 10 г почвы. Чтобы при взвешивании в почву не попали бактерии из воздуха, часовое стекло накрывают другим часовым стеклом (предварительно стекла тарируют). Часовые стекла, шпатели, фарфоровые чашки стерилизуют фламбированием.

Предварительно для приготовления почвенной суспензии для каждого образца готовят две стерильные колбы емкость 250 мл; одна из них содержит 90 мл стерильной водопроводной воды, другая – пустая. Навеску почвы переносят в стерильную фарфоровую чашку, увлажняют стерильной водой из первой колбы и растирают пальцем в стерильной перчатке до пастообразного состояния. Такая обработка почвы преследует три цели: разрушение почвенных агрегатов, расчленение микроколоний на клетки, десорбцию микроорганизмов с поверхности почвенных частиц. Затем пастообразную навеску почвы смывают оставшимся количеством воды во вторую стерильную

колбу. Колбу с почвенной суспензией встряхивают на протяжении 10–15 мин. (не смачивая пробку), оставляют на 30 сек. Полученную почвенную суспензию используют в качестве источника микроорганизмов, возбудителей процессов превращения азота.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ФИКСАЦИЯ АЗОТА

Азотфиксация – процесс лимитирующий все остальные звенья азота. По масштабам этот процесс соизмерим с процессом фотосинтеза. В естественных экосистемах растения используют азот из разных источников: из почвенного раствора, из гумуса после его разложения микроорганизмами, и от бактерий, связывающих молекулярный азот, который в форме аминокислот поступает в клетки корня. Азот, который включается в биомассу растений в результате фиксации его бактериями, называется биологическим, а сами бактерии, связывающие молекулярный азот – азотфиксаторами или diaзотрофами.

Биологический процесс восстановления азота – цепь ферментативных реакций, в которых главную роль играет фермент нитрогеназа. Активный центр фермента состоит из двух белков, содержащих Fe, S и Mo в соотношении 6:8:1. Процесс сопряжен с разложением АТФ.

Азотфиксирующие микроорганизмы в зависимости от их связи с растениями делятся на свободноживущих и симбиотических. Микроорганизмы первой группы обитают в сфере прямого влияния растения, в прилегающей к корням почве (ризосфере) или на поверхности корней и листьев (ризоплане). К симбиотическим относятся те, которые живут в тканях растений, стимулируя образование клубеньков или узелков. Среди свободноживущих в почве микроорганизмов наибольшее значение имеют бактерии родов *Azotobacter* (аэробный азотфиксатор) и *Clostridium* (анаэроб, возбудитель масляно–кислого брожения).

Выявление азотфиксирующих бактерий рода *Azotobacter*

В настоящее время описан ряд видов азотобактера – *Az. chroococcum*, *Az. vinelandii*, *Az. agilis* и др. Для выделения азотобактера используют метод посева почвенных комочков на безазотистую агаризованную среду Эшби.

Состав среды Эшби (г/л водопроводной воды):

Маннит или глюкоза	или сахароза	или	20,0
K_2HPO_4			0,2
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$			0,2
NaCl			0,2
KH_2PO_4			0,1
$CaCO_3$			5,0
агар–агар			20,0

Приготовленную питательную среду стерилизуют при 0,5 атм. 20 мин. и разливают в стерильные чашки Петри. Небольшое количество почвы увлажняют до пастообразного состояния стерильной водопроводной водой и хорошо растирают в ступке резиновым пестиком или пальцем в резиновой перчатке. Бактериологической петлей берут небольшие комочки из приготовленной почвы и раскладывают их по трафарету на поверхность агаризованной среды Эшби. На одну чашку помещают 25–50 комочков почвы. Чашку помещают во влажную камеру, которую ставят в термостат при 28–30°C на 6–8 суток.

О наличии азотобактера судят по образованию характерных колоний вокруг комочков почвы. Колонии рассматривают, описывают, готовят из них мазки для микроскопирования морфологии клеток.

На агаризованных средах *Az. chroococcum* растет в виде бесцветных (в молодом возрасте) густослизистых капель, которые по мере старения приобретают бурый, темно–коричневый или черный цвет. *Az. vinelandii* образует колонии желтовато–зеленого цвета. Пигмент, выделяемый им,

проникает в питательную среду. Для *Az. agilis* характерны бесцветные колонии в любом возрасте.

Морфология клеток азотобактера специфична, что позволяет отличать его от клеток других организмов. Молодые клетки имеют форму крупных палочек (3×6 мкм) одиночных или сцепленных попарно, с округлыми концами. Подвижны. С возрастом они превращаются в крупные кокки (до 4 мкм в диаметре), напоминающие восьмерки (в случае попарного сцепления). Кокковидные клетки обычно покрываются капсулой, теряют подвижность, начинают выделять пигмент.

После установления наличия колоний азотобактера в почвенных комочках рассчитывают процентное содержание азотобактера по формуле:

$$X = \frac{A}{B} \times 100, \text{ где}$$

A – число комочков с ростом азотобактера;

B – общее число комочков почвы.

Выявление азотфиксаторов рода *Clostridium*

Обнаружение в почве анаэробных азотфиксаторов проводят на безазотистой среде С.Н.Виноградского.

Состав среды Виноградского (г/л):

глюкоза	20,
K ₂ HPO ₄	0,1
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,5
FeSO ₄ , NaCl, MnSO ₄	следы
CaCO ₃	20,0

Среду разливают высоким столбиком в пробирки с поплавками по 10мл и стерилизуют при 0,5 атм. 20 мин. Перед посевом в пробирки со средой Виноградского стерильно доливают ту же среду из колбы так, чтобы уровень среды был в пробирке на расстоянии 4–5 см от пробки. Пробирки прогревают в кипящей водяной бане 20–30 мин., охлаждают резко до 50⁰С в холодной воде

для удаления O_2 и сразу делают посев. Вносят образцы почв в виде почвенной болтушки (1:10) в количестве 1 мл на дно пробирки. Пробирки помещают в термостат при $28-30^{\circ}$ на 10–12 суток или при 37° на 6–7 суток. О развитии бактерий судят по помутнению среды, выделению пузырьков газа, запаху масляной и уксусной кислот, которые образуются в результате масляно–кислого брожения.

Микроскопированием осадка выявляют подвижные клетки клостридиальной формы. В молодых культурах *Clostridium pasteurianum* имеет вид прямых палочек с закругленными концами размером $2,5-7,5 \times 0,5$ мкм. Палочки одиночные или парные. При старении культуры клетки приобретают характерную веретенообразную форму с округлой спорой, расположенной ближе к одному из концов.

В цитоплазме клеток накапливается большое количество крахмалоподобного вещества – гранулы, дающей с йодом синее окрашивание. Наличие гранулы обнаруживают добавлением раствора Люголя в препарату клеток.

Образование масляной кислоты регистрируют по реакции с хлоридом железа. Для этого 5 мл культуральной жидкости переносят в чистую сухую пробирку, добавляют 2 мл 10%-ного раствора хлорида железа и нагревают до кипения. При наличии масляной кислоты раствор в проходящем свете имеет кроваво–красную или вишнево–красную окраску.

АММОНИФИКАЦИЯ

Валовое содержание азота в почве может достигать 10т/га. Однако 99% его связано в органических соединениях, в том числе в гумусе, т.е он является недоступным для растений. Доступным становится азот лишь в процессе минерализации органического вещества. Процесс минерализации азотсодержащих органических веществ с выделением аммиака называется

аммонификацией. Процессу разложения подвержены белки и их производные –пептиды и аминокислоты, нуклеиновые кислоты и их производные – пуриновые и пиримидиновые основания, мочевины и мочевая кислота, хитин и гумусовые кислоты.

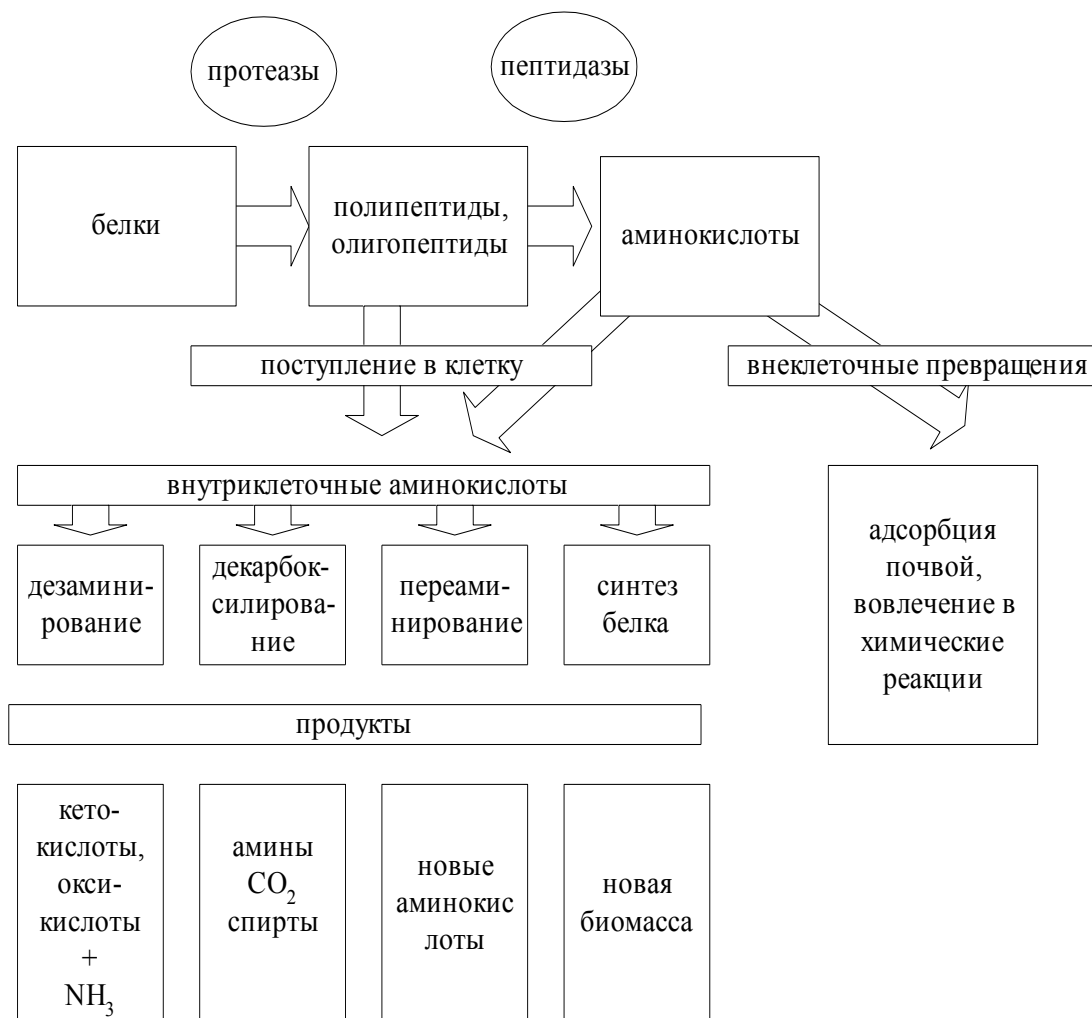


Рис.2 Схема аммонификации белков.

В процессе микробного разложения азотсодержащих соединений выделяется аммиак, который претерпевает различные превращения: частично адсорбируется на глинисто–гумусовых комплексах или нейтрализует почвенные кислоты; потребляется растениями как источник азота и иммобилизуется в метаболизме почвенных микроорганизмов; выделяется в атмосферу; окисляется в нитриты и нитраты.

Разложение азотсодержащих органических соединений с выделением аммиака осуществляют аммонифицирующие микроорганизмы. Процесс аммонификации может происходить в аэробных и анаэробных условиях, при этом образуются различные соединения: NH_3 , CO_2 , H_2O , H_2S , соли фосфорной кислоты (при аэробном разложении) и NH_3 , CO_2 , H_2S , меркаптаны, индол скатол, спирты, органические кислоты и т.д. (при анаэробном разложении) (рис.2).

Выявление аммонифицирующих бактерий

Мясо–пептонный бульон, содержащий 3% пептона, разливают в пробирки по 9мл и стерилизуют при 1 атм. в течение 30 мин. Затем производят посев 1 мл почвенной суспензии (1:10). После посева между пробкой и горлышком пробирки закрепляют полоску стерильной красной лакмусовой бумаги и полоску фильтровальной бумаги, ранее смоченную насыщенным раствором уксуснокислого свинца. Бумага не должна касаться среды. Чтобы воспрепятствовать улетучиванию аммиака, сероводорода, меркаптанов и т.д. пробирки плотно закрывают целлофановым колпачком, закрывая его резиновым колечком.

Пробирки культивируют при температуре 28–30⁰С в течение 3–5 суток. По окончании инкубации в пробирках определяют образование аммиака, сероводорода и меркаптанов. При наличии положительной реакции делается заключение о наличии в почвенном образце аммонифицирующих бактерий.

Для обнаружения возбудителей готовят препарат живых бактерий. Чаще других в препарате встречаются подвижные клетки *Proteus vulgaris*, преобладающие на первых стадиях распада белков. Это неспорообразующие, неодинаковой длины палочки. Кроме того, на препарате много спорообразующих клеток *Bacillus micoides*, *Clostridium putrificus*. У последних споры расположены терминально и диаметр их шире клетки.

Проба на аммиак

Выделяющийся в атмосферу аммиак улавливают при помощи подвешенной красной лакмусовой бумаги, которая при этом синееет.

Накопление аммиака в субстрате устанавливают при помощи реактива Несслера. На фарфоровую пластинку с лунками помещают каплю реактива Несслера и затем каплю культуральной жидкости. В контрольную лунку к капле реактива Несслера добавляют каплю исходной среды. При большом количестве аммиака образуется оранжевая или желтая окраска.

Проба на сероводород

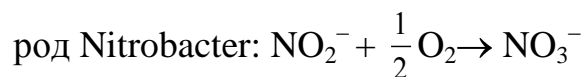
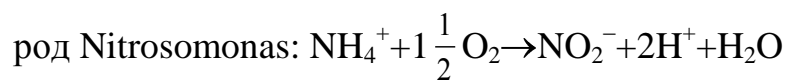
Сероводород обнаруживают с помощью подвешенной фильтровальной бумаги, смоченной раствором уксуснокислого свинца. При наличии сероводорода происходит почернение бумаги. В том случае, если бумага покрывается серебристым налетом, это свидетельствует о том, что наряду с сероводородом выделяются еще и меркаптаны.

Проба на индол

Выявление индола проводят по методу Грициана. В пробирку с 2мл культуральной жидкости добавляют 10 капель реактива А (смесь 1 части формалина и 2 частей концентрированной серной кислоты) и после тщательного перемешивания 5 капель реактива Б (0,5%-ный раствор бихромата калия). При наличии индола через несколько секунд развивается розовая или вишневая окраска.

НИТРИФИКАЦИЯ

Под нитрификацией понимают процессы окисления аммиака до нитрита и нитрата. Классическими возбудителями нитрификации являются автотрофные нитрифицирующие бактерии, осуществляющие превращение аммиака в две фазы. Процесс нитрификации вызывают главным образом нитрифицирующие бактерии двух родов:



Энергию, выделяющуюся при окислении аммиака и нитрита, бактерии используют для ассимиляции углекислого газа. Благодаря жизнедеятельности нитрифицирующих бактерий огромные массы газообразного аммиака, образующегося в процессе аммонификации, фиксируются в нитраты, которые являются источником питания для растений. С другой стороны, нитраты обладают некоторыми отрицательными свойствами, так, соли азотной кислоты легко вымываются из почвы в нижние почвенные горизонты и грунтовые воды, а также могут легко восстанавливаться в результате денитрификации до N_2 , что обедняет почву азотом.

Наряду с автотрофной нитрификацией в почве осуществляются и процессы гетеротрофной нитрификации, которую осуществляют представители различных групп микроорганизмов (бактерии, микромицеты). Гетеротрофная нитрификация протекает в условиях отличных от условий автотрофной нитрификации. Так, для гетеротрофной нитрификации необходимо присутствие органического вещества, слабокислой реакции среды и дефицита кислорода. В отличие от автотрофной нитрификации гетеротрофная не является источником энергии для роста клеток и продукции биомассы. Гетеротрофная нитрификация более характерна для лесных почв, тогда как автотрофная – для окультуренных.

Для выделения и культивирования автотрофных нитрифицирующих бактерий пользуются средой Виноградского (г/л):

среда для бактерий первой фазы нитрификации:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,0
K_2HPO_4	1,0
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
NaCl	2,0

FeSO ₄	0,4
CaCO ₃	5,0

среда для бактерий второй фазы нитрификации:

NaNO ₂	1,0
Na ₂ CO ₃	1,0
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,3
NaCl	0,5
FeSO ₄	0,4

Среды наливают тонким слоем (1,0–1,5 см) в конические колбы емкостью 150–200 мл и стерилизуют в автоклаве 30 мин. при 1 атм. В питательную среду вносят 0,5 г почвенного образца и помещают колбы в термостат при температуре 25–28⁰С на 21 сутки.

О ходе процесса нитрификации судят по изменению состава питательных сред. Для этого на 7,14,21 после посева отбирают пробы и анализируют их содержание. В колбах со средой для культивирования бактерий первой фазы нитрификации определяют содержание аммиака и нитритов. В колбах со средой для культивирования бактерий второй фазы нитрификации определяют содержание нитритов и нитратов.

О наличии нитрификаторов первой фазы свидетельствует снижение содержания аммиака и обнаружение нитритов (в среде для культивирования бактерий первой фазы нитрификации). О наличии нитрификаторов второй фазы свидетельствует снижение содержания нитритов и обнаружение нитратов (в среде для культивирования бактерий второй фазы нитрификации).

При микроскопировании возбудителей первой фазы нитрификации можно обнаружить овальные клетки, похожие на ноль – Nitrozomonas и Mirozospira. Возбудители второй фазы нитрификации – Nitrobacter – мелкие, слегка искривленные и угловатые клетки.

Проба на аммиак

Наличие аммиака устанавливают при помощи реактива Несслера. На фарфоровую пластинку с лунками помещают каплю реактива Несслера и затем каплю культуральной жидкости. При большом количестве аммиака выпадает коричневый или буроватый осадок, при небольшом количестве появляется оранжевая или желтая окраска.

Реактив Несслера применяется или промышленного производства или готовится в лаборатории следующим образом: 20г КJ растворяют в 50 мл дистиллированной воды, постепенно, до насыщения добавляют HgCl_2 (около 32 г), затем приливают 460 мл дистиллированной воды и вносят в этот раствор 134 г КОН. Реактив хранят при 4°C в темной склянке.

Проба на нитриты

На фарфоровую пластинку помещают 1 каплю 20%-ного раствора серной кислоты, добавляют 3 капли реактива цинк-йод-крахмал и 1 каплю исследуемой питательной среды. В присутствии нитритов смесь окрашивается в синий цвет. Это происходит вследствие вытеснения азотистой кислотой свободного йода из йодисто-водородной соли. Свободный йод вступает во взаимодействие с крахмалом, обуславливая синюю окраску.

Раствор цинк-йод-крахмала готовят следующим образом: 2 г хлористого цинка растворяют в 10 мл дистиллированной воды, нагревают до кипения и приливают растворенный крахмал (400 мг крахмала в 10 мл воды). Объем смеси доводят до 100 мл, кипятят до тех пор, пока она не станет прозрачной, охлаждают и добавляют равный объем (100мл) 0,3%-ного раствора йодистого калия или йодистого цинка. Реактив хранят в темной посуде с притертой крышкой.

Нитриты можно обнаружить и с помощью реактива Грисса. Для выполнения реакции к капле реактива Грисса добавляется капля питательной среды. Появление красного окрашивания свидетельствует о наличии нитритов.

Реакция основана на образовании в кислой среде в присутствии нитритов азосоединения, окрашенного в красно–розовый цвет.

Реактив Грисса состоит из двух растворов: А – 0,5 г сульфаниловой кислоты растворяют в 150 мл 32%–ной уксусной кислоты (уд. вес 1,04). Б – 0,1 г нафтиламина растворяют в 20 мл дистиллированной воды, затем добавляют 150 мл 32%–ной уксусной кислоты. Растворы хранят в темных склянках с притертой пробкой. Перед проведением реакции оба раствора смешивают в равных количествах.

Проба на нитраты.

Наличие нитратов определяют в реакции с дифениламином. Принимая во внимание, что дифениламин дает синее окрашивание не только в присутствии азотной, но и азотистой кислоты, перед определением нитратов необходимо исключить мешающие влияния с помощью мочевины. Для этого к 1 мл питательной среды добавляют несколько кристаллов мочевины (на кончике скальпеля), 10 капель концентрированной серной кислоты и несколько кристаллов дифениламина. Интенсивное синее окрашивание свидетельствует о присутствии азотной кислоты.

ДЕНИТРИФИКАЦИЯ

Под термином «денитрификация» в широком смысле подразумевают природные процессы восстановления нитратов независимо от механизма и продуктов процесса. Многие бактерии способны использовать нитрат в качестве источника азота, при этом они восстанавливают его до аммиака с последующим включением в конструктивный метаболизм. Такое восстановление называется ассимилятивным. В более узком смысле денитрификаторами называют микроорганизмы, способные к нитратному дыханию или диссимиляционному восстановлению нитрата до молекулярного азота. Классическая схема восстановления нитрата имеет следующий вид:

$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NH}_3$ ассимиляция

$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ диссимиляция

Для оценки интенсивности процесса денитрификации бактерии выращивают на среде Гильтая (г):

раствор 1	
KNO_3	2,1
аспарагин	1,0
дистиллированная вода	250 мл
раствор 2	
лимоннокислый натрий	5,0
KH_2PO_4	2,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,0
CaCl_2	2,0
FeCl_3	следы
дистиллированная вода	500 мл

После растворения солей растворы сливают вместе, устанавливают рН 6,8–7,0, доводят объем до 1000 мл и добавляют индикатор (бромтимоловый синий) до появления зеленого цвета среды. Среду разливают по 9 мл в пробирки, опускают поплавки для улавливания газов и стерилизуют при 0.5 атм. 20 мин. Пробирки со средой заражают внесением 1 мл почвенной болтушки (1:10). Для создания анаэробных условий после посева поверхность жидкости в пробирках покрывают тонким слоем стерильного нейтрального масла, вазелинового или парафинового. Посевы помещают в термостат при температуре 30–35⁰С и через 7–10 дней приступают к анализу среды.

О наличии процесса денитрификации судят по изменению окрашивания среды (зеленый цвет превращается в синий в результате подщелачивания продуктами восстановления нитритов) и по обильному газообразованию (смесь молекулярного азота и углекислоты).

Для знакомства с возбудителями денитрификации из середины пробирки берут каплю и готовят препарат. На препарате преобладают

неспоробразующие палочки *Pseudomonas denitrificans*, *P. fluorescens* и *P. stutzeri*.

В качестве продуктов метаболизма денитрифицирующих бактерий в культуральной жидкости производят идентификацию следующих соединений:

нитратов (реакцией с дифениламином);

нитритов (реакцией с цинк–йод–крахмалом или реактивом Грисса;

аммиака (реакцией с реактивом Несслера).

ВЛИЯНИЕ АНТРОПОГЕННЫХ ФАКТОРОВ НА ПРОЦЕССЫ ПРЕВРАЩЕНИЯ АЗОТА

Минеральные соединения

В погоне за высокими урожаями количество применяемых удобрений постоянно растет и в последнее десятилетие достигает ежегодно свыше 30 млн. тонн. Основные используемые минеральные удобрения – аммиачная селитра, мочевины, двойной суперфосфат, хлористый калий. В настоящее время наблюдается тенденция к снижению объема вносимых удобрений, что связано с их отрицательными последствиями от их применения. Несбалансированное, с нарушением агротехнических норм и приемов внесение минеральных удобрений приводит к загрязнению почв, эвтрофикации водоемов, изменению качества растительной продукции и т.д. Наиболее опасными по последствиям является применение азотных удобрений, поскольку они напрямую включаются в метаболизм микроорганизмов круговорота азота. Азотные удобрения в первую очередь являются материалом для процессов микробной нитрификации. Внесение минеральных удобрений является причиной появления 50% нитратов в почве. В процессе как автотрофной, так и гетеротрофной нитрификации образуются нитраты и нитриты, которые поступают в растительную продукцию и мигрируют в грунтовые воды и поверхностные воды. Потребление воды и пищи, содержащей избыточное

количество нитратов приводит к заболеваниям, особенно опасным для детей (нитраты переводят двухвалентное железо в составе гемоглобина в трехвалентное, соответственно из гемоглобина образуется метгемоглобин, неспособный к переносу кислорода, и как следствие развивается анемия). Кроме этого присутствие высокого содержания нитратов обуславливает предрасположенность к канцерогенным заболеваниям. Опасными последствиями гетеротрофной нитрификации могут быть не только увеличение содержания нитратов, но и синтез микроорганизмами промежуточных соединений – гидроксилamina и нитрозосоединений, которые даже в небольших количествах могут оказывать токсичный и канцерогенный эффект.

Внесение минеральных удобрений, особенно в больших дозах, снижает активность азотфиксации. Этот эффект имеет отрицательное значение, поскольку биологический азот по сравнению с минеральными безвреден для человека, интенсивнее повышает урожай растений и экономические затраты необходимые для его получения несравнимо ниже. Наибольший подавляющий эффект оказывает мочевины.

Неблагоприятный эффект оказывает внесение несбалансированных количеств минеральных соединений и с позиции потери азота из почв в процессе денитрификации. Так, в почвах с анаэробными условиями, при переувлажнении и наличии большого количества легкодоступного органического вещества внесение минеральных удобрений, особенно нитратных способствует усилению процесса денитрификации и, как следствие увеличению потери почвенного азота в виде газообразного N_2 .

Таким образом, внесение минеральных удобрений может приводить к изменению состава почвенной биоты, вымыванию и улетучиванию соединений азота и появлению токсичных соединений.

Металлы

Загрязнение тяжелыми металлами выступает в роли экотоксикологического фактора, определяющего направление и характер развития почвенных ценозов. Такое явление наблюдается как при однократном внесении высоких концентраций, так и при систематическом внесении малых доз. Наиболее сильное загрязнение наблюдается возле источников выбросов, где образуются «техногенные аномалии». Основными источниками загрязнения тяжелыми металлами являются

выбросы промышленных предприятий

транспортное загрязнение

сельскохозяйственные мероприятия (биоциды, протравители семян, минеральные удобрения).

Токсичность тяжелых металлов различается для почв различных составов. Наибольшую опасность представляют металлы в почвах легкого механического состава, где их миграционная способность выше, чем в тяжелых почвах. Аккумуляция тяжелых металлов зависит от кислотности и гумусности почв. В нейтральных почвах с высоким содержанием гумуса тяжелые металлы закрепляются сильнее и, соответственно, проявляют меньшую токсичность. В целом, степень влияния тяжелых металлов на микробные сообщества определяется типом металла, его дозой, формой соединения и свойствами загрязненных почв. Наиболее сильно металлы влияют на процессы, которые осуществляются узкоспециализированными группами микроорганизмов. Так, металлы подавляют азотфиксацию и нитрификацию, причем концентрации металлов, вызывающие ингибирующий эффект могут колебаться на уровне почвенных ПДК.

Нефтяное загрязнение

Нефть является одним из основных загрязнителей биосферы. Загрязнение нефтью в основном происходит в районах нефтедобычи, при авариях на нефтепроводах. Загрязнение нефтью приводит к ухудшению физических (водно–воздушный режим) и изменению химических свойств почвы. В низких концентрациях нефть может несколько стимулировать развитие почвенных микроорганизмов, т.к. служит органическим субстратом для их развития, а также может содержать ряд соединений, которые можно расценивать как биологически активные вещества. Однако загрязнение нефтью в высоких дозах отрицательно воздействует на почвенную биоту. Особенно это проявляется в первый период, что, видимо, связано с наличием в нефти токсичных, часто летучих углеводородов (толуол, ксилол, бензол).

В результате нефтяного загрязнения изменяется круговорот азота. Так, наиболее чувствительны к этому виду загрязнения автотрофные нитрифицирующие бактерии. Снижение их активности связано с наличием в почве легкодоступных С–соединений в виде углеводородов нефти. При этом, увеличивается численность и активность азотфиксаторов, аммонификаторов и денитрификаторов, т.к. эти микроорганизмы могут использовать продукты метаболизма нефтеокисляющих микроорганизмов.

Осадки сточных вод

Осадки сточных вод образуются на станциях очистки и характеризуются высоким содержанием углерода, азота, фосфора. Это позволяет использовать их после предварительной обработки в качестве органоминеральных удобрений. В то же время применение осадков сдерживается присутствием в осадках токсичных соединений, таких как тяжелые металлы. Исключить отрицательное воздействие металлов возможно при помощи или предварительной обработки осадков, обеспечивающей их иммобилизацию или

механического разбавления массы осадков с целью снижения концентрации металлов. Широкая практика последних двух десятилетий подтвердила возможность сельскохозяйственного использования, однако обязательным условием является соблюдение агрономически оправданной дозы внесения осадков. Таким образом, влияние осадков на процессы превращения азота определяется двумя факторами, во-первых, неблагоприятным воздействием токсичных соединений, во-вторых, избыточным количеством азотсодержащих органических соединений и минеральных форм азота. Характер воздействия тяжелых металлов идентичен таковому при внесении с минеральными удобрениями, промышленными выбросами и т.д. Микро количества могут даже стимулировать процессы превращения азота, тогда как высокие вызывают тормозящее действие. Такой эффект усугубляется тем, что в отличие от металлов, иммобилизованных в почве, металлы, поступающие с необработанными осадками сточных вод, находятся в более подвижной форме и, следовательно, могут оказывать более выраженное ингибирующее действие. Внесение аммонийного азота может стимулировать процессы нитрификации, что приводит к образованию нитратов и нитритов, оказывающих отрицательное воздействие на окружающую среду и здоровье населения. Помимо выщелачивания потеря азота из почвы может происходить в результате активации процесса денитрификации, ведущей к диффузии газообразного N_2 в атмосферу. В то же время осадки могут стимулировать указанные процессы и как дополнительный источник органического вещества, поскольку процессы превращения азота являются энергоемкими процессами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Теппер В.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. –М.:Колос, 1979. –238 с.
2. Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв.– Изд-во МГУ, 1990.
3. Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии.– М.: Изд–во Московского университета, 1991. –303с.
4. Марфенина О.Е. Микробиологические аспекты охраны почв. – Изд-во МГУ, 1991. 128с.
5. Мишустин Е.Н. Микроорганизмы как компоненты биогеоценоза.– М.: Наука. –1984.–245с.

Учебное издание

**Селивановская Светлана Юрьевна
Латыпова Венера Зиннатовна**

**МИКРООРГАНИЗМЫ В КРУГОВОРОТЕ
БИОГЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ**

Часть 1. Азот

Методические указания к курсу «Агроэкологический мониторинг»

Подписано в печать 14.09.2013.
Бумага офсетная. Печать цифровая.
Формат 60x84 1/16. Гарнитура «Times New Roman». Усл. печ. л. .
Тираж экз. Заказ

Отпечатано с готового оригинал-макета
в типографии Издательства Казанского университета

420008, г. Казань, ул. Профессора Нужи́на, 1/37
тел. (843) 233-73-59, 233-73-28