



## ПРОУЧВАНЕ НА ЕКОЛОГИЧНИТЕ СВОЙСТВА НА МИКРОФЛОРАТА И МЕЗОБИОНТНАТА ФАУНА НА ПОЧВИ ЗАМЪРСЕНИ С ТЕЖКИ МЕТАЛИ

*Стефан Шилев<sup>1</sup>, Татяна Билева<sup>2</sup>, Илиана Велчева<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>*Катедра „Микробиология и екологични биотехнологии“, Факултет по РЗА,  
Аграрен Университет – Пловдив, ул. „Менделеев“ № 12, 4000, Пловдив,  
stefan.shilev@au-plovdiv.bg*

<sup>2</sup>*Катедра „Агроекология“, Факултет по РЗА, Аграрен Университет – Пловдив,  
ул. „Менделеев“ № 12, 4000, Пловдив, tbileva@abv.bg*

<sup>3</sup>*Катедра „Екология и опазване на околната среда“, Биологически факултет,  
Пловдивски Университет „Паисий Хилендарски“, ул. „Цар Асен“ № 24,  
4000, Пловдив, anivel@pu.acad.bg*

**Abstract.** Four types of soils and contamination were studied. We found that in high contaminated soils the number of viable microorganisms of different physiological groups, the soil respiration and mesobiota had been reduced by the toxic effect of the metals. Higher content of organic compounds conducted to a partial overcome of the toxic effect of the heavy metals related to the total number of bacteria, the bacteria utilizing mineral nitrogen and cellulose-degrading bacterial. On the other hand, the organic matter load in the soil during the autumn ameliorated the microclimate of soil communities and decrease of negative effect of the toxic elements.

**Key words:** contaminated soils, heavy metals, microorganisms, mesobiota, soil respiration.

### ВЪВЕДЕНИЕ

Оценката на замърсяванията и прогнозирането на измененията в почвите разположени в близост до зони с развита промишлена инфраструктура е една от основните задачи в програмите за опазване на околната среда. В резултат на интензивното развитие на промишлеността естествената среда на живот на организмите се оказва силно замърсена с тежки метали, които не се разлагат, а се биоакумулират в околната среда. Това означава, че при хронично въздействие нивото им в почвата, растенията и организмите се повишава с течение на времето, което увеличава токсичният им ефект. Те могат да постъпят във всички нива на хранителните вериги и затова живите организми са изложени на риск от дългосрочното и хронично въздействие на тежките метали, някои от

които са силно токсични и канцерогенни като живак, кадмий, мед, олово, цинк и други халогеносъдържащи органични съединения и разтвори.

В редица статии се изследват проблемите свързани със замърсяването на почвата с тежки метали и влиянието им върху почвената микрофлора и мезобиота (VELCHEVA & KOSTADINOVA, 2001; VELCHEVA *et al.*, 2001a; VELCHEVA *et al.*, 2001b; ШИЛЕВ, 2006).

Микробиалната биомаса и микробиалната ензимна активност, почвеното дишане, както и различните функционални групи микроорганизми (бактерии, актиномицети, гъби) са реални индикатори на почвеното плодородие и състоянието на почвата. Като цяло, бактериите са по-чувствителни на замърсяването на почвата с тежки метали в сравнение с гъбите и актиномицетите. Поради тази причина се наблюдава и повишаване на съотношението гъби:бактерии в почвата (GREMION *et al.*, 2004), докато при продължително замърсяване преобладават грам-отрицателните бактерии (CARLOT *et al.*, 2002). Други изследвания показват, че силното замърсяване с Zn понижава количеството на гъбите, актиномицетите и Грам-положителните бактерии. KELLY *и др.* (2003) съобщават като основна причина за намаляване на съотношението гъби:бактерии, наблюдаваните щети по корените на растенията в резултат от замърсяването.

Микроорганизмите, както висшите растения и животните, са развили стратегии, които им позволяват успешно да се развиват в съобществата. Една изкуствено създадена система на тези стратегии класифицира организмите според градиент, наречен *r-K*. Схемата *r-K* представлява непрекъснат процес, при който еволюцията облагодетелства адаптирането при висока степен на възпроизвеждане (стратегия *r*) или оптималното използване (консервация) на природните ресурси (стратегия *K*). Това е екологична догма, при която организмите оптимизират своята способност за възпроизводство или запазването на ресурсите, но никога двете заедно (KOZDROJ & VAN ELSAS, 2000).

Целта на настоящото изследване е да се проучат екологичните свойства и сезонната динамика на микрофлората и мезогеобионтите в почви замърсени с тежки метали в района на гр. Рудозем.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Почвените проби бяха взети през пролетта (месец май) и есента (месец октомври) от седем пункта разположени на различно разстояние от фабриката за обогатяване на руда в гр. Рудозем. Три от пробите бяха взети на разстояние 150 m от фабриката S – образно, като отделните карета бяха на разстояние 300 m едно от друго. Взета бе и една междинна проба на разстояние 600 m от фабриката. Останалите 3 опитни проби се взеха от района на хвостохранилището на разстояние 900 m. Паралелно с това бяха взимани контролни проби от пасище разположено в началото на с. Чепинци (на 9 300 m от фабриката). Обработвана бе средна почвена проба от карета с размери 50 на 50 см и дълбочина 10 см. Химичният анализ на почвата за остатъчни

количества олово, цинк, кадмий, мед беше извършен в ЛКИ на АУ-Пловдив по метода на Атомно-абсорбционната спектрофотометрия.

Броят на колонии образуващите единици (к.о.е.) на изследваните систематични групи микроорганизми в почвените проби беше установен по метода на пределните разреждания върху агаризирани хранителни среди (КОЛЕШКО, 1981). Общата биологична активност беше определена по количеството на отделения  $\text{CO}_2$  (STOTZKY, 1965) при разграждане на органичната материя използвана в микробния метаболизъм, за единица време. От друга страна, *екофизиологичният индекс* (EPI) се изчисли по метода на KUNITO *et al.*, (2001), като изменение на *индекса на разнообразие* на Shannon (DE LEIJ *et al.*, 1993), докато *индексът на развитие на колонии* се определи посредством метода на SARATHCHANDRA (1997).

От почвените проби ръчно бяха изолирани представители на мезогеобионтите. Материалите бяха фиксирани в 70 % спирт и обработвани в лабораториите по Екология към ПУ и Зоология към АУ. Освен това, бяха изчислени следните екологични свойства на мезогеобионтното съобщество: плътност, обилие и честота, както и индексите за разнообразие и изравненост по Симпсън, характеризиращи екологичното състояние на съобществото (БИГОН *и др.*, 1989) Биологичната характеристика на установените почвени безгръбначни е представена по АНГЕЛОВ (1992).

Настоящото проучване се извърши през периода 2006-2007 г. в кат. Екология на ПУ, кат. Микробиология и екологични биотехнологии и кат. Агроекология на АУ-Пловдив.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

В Таблица 1 е представено съдържанието на тежките метали в изследваните почвени проби, както и ПДК за съдържание в земеделски земи. Прави впечатление по-високите стойности на изследваните метали в пробите взети от района на фабриката, като всички те превишават ПДК, особено в случая на кадмия и оловото. Концентрации на металите от пробите взети от района на хвостохранилището и междинният, бяха значително под нивото на ПДК и се доближиха до стойностите на контролния вариант. В тези проби само стойностите оловото се доближиха до ПДК.

Таблица 1. Съдържание на тежки метали в почвата на изследвания район.

Пункт	№ на проба	Олово (Pb) mg/kg	Цинк (Zn) mg/kg	Мед (Cu) mg/kg	Кадмий (Cd) mg/kg
Фабрика	1	170	400	342	5
	2	150	460	342	6
	3	190	470	409	12
Междинен	1	60	90	101	0,51
Хвостохранилище	1	50	80	98	0,3
	2	50	60	47	0,34
	3	40	120	47	0,36
Контролен	1	60	70	28	0,38
ПДК (рН 7.5)		<b>80</b>	<b>340</b>	<b>260</b>	<b>2,5</b>

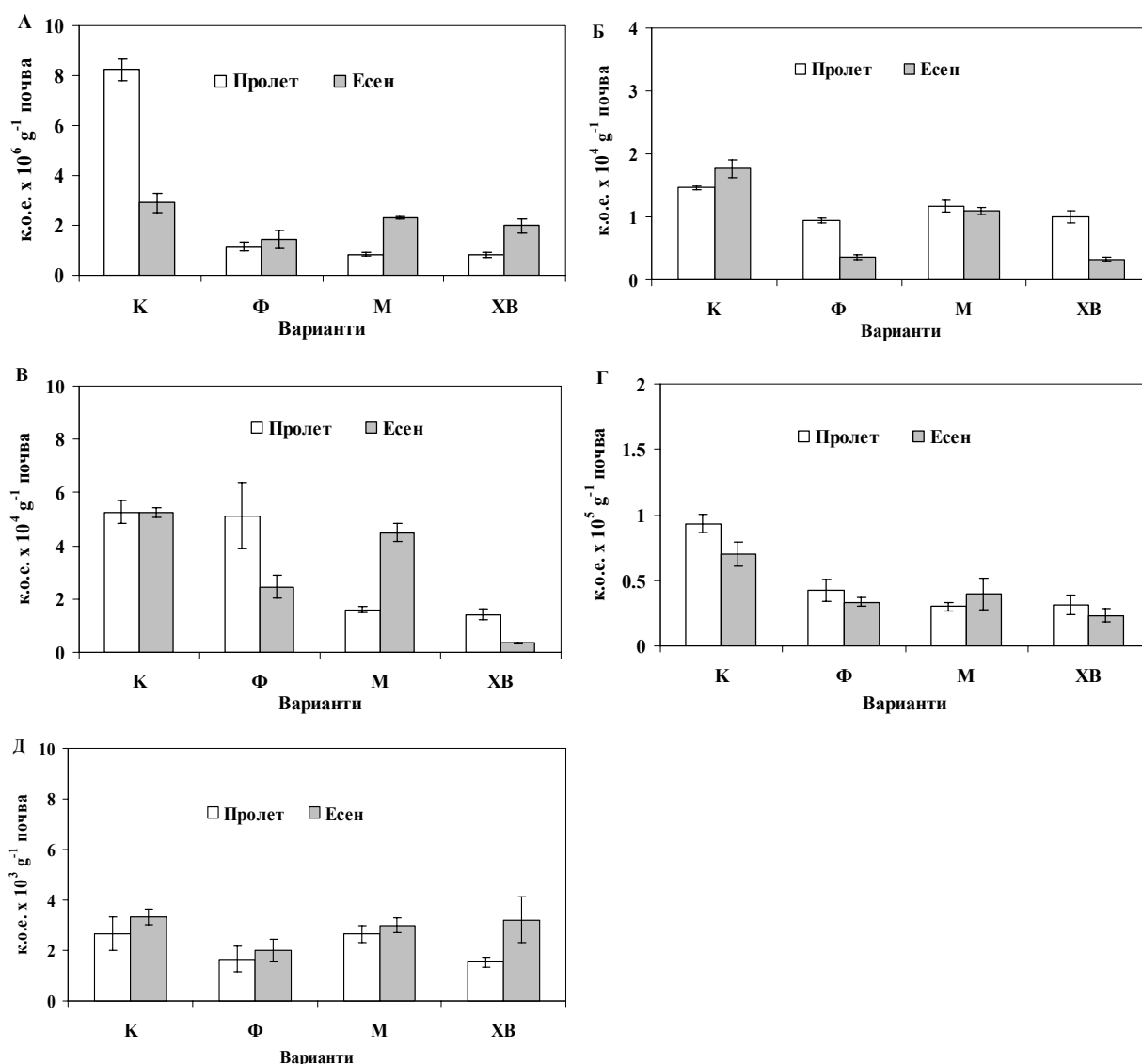
Спецификата на индустриалната дейност в района се характеризира с високи стойности на остатъчни количества от различни по вид и концентрация тежки метали – Pb, Zn, Cu и Cd. Тези елементи предизвикват различни типове токсичност при микроорганизмите, характеризиращи се с нарушения на клетъчната мембрана, заместване на важни макро- и микроелементи с токсични такива и др. Поради факта, че замърсяването е дългосрочно, структурата на микробните популации е претърпяла изменения свързани с адаптиране към новите условия на живот и различните абиотични характеристики на средата.

В контролния вариант количеството на амонифициращите бактерии е значително повече през пролетта, отколкото през есента (Фиг. 1 А). Стойностите за останалите варианти отчетени през пролетта са значително по-ниски в сравнение с контролния вариант, основно поради токсичния ефект на тежките метали. От друга страна, броят им през есента не показва големи промени при различните варианти, вероятно поради и характерните особености в сезонната динамика на микробните популации.

Спорообразуващите бактерии са сравнително по-чувствителни към токсичния ефект на тежките метали в сравнение с неспорообразуващите (Фиг. 1 Б). В тази връзка, техният брой през пролетта се характеризираше със слаба зависимост от разликата в концентрацията на тежките метали в почвата ( $1 \cdot 10^4$ - $1,5 \cdot 10^4$ ). За разлика от това, през есента броят на к.о.е. намалява значително (около 10 пъти спрямо контролата) в почвите в близост до фабриката и хвостохранилището. В тези варианти беше наблюдавана и най-голямата разлика между броя на к.о.е. през пролетта и есента.

Броя на микроскопичните гъби и актиномицетите (фиг. 1 В и Г), като цяло претърпя промени в зависимост от сезонната динамика, от една страна, и от друга, поради токсичното действие на достъпните тежки метали в почвата. В контролния вариант броят на двете физиологични групи е в рамките на стандартната грешка поради факта, че през есента в почвите има по-голямо количество на постъпили органични вещества богати на полизахариди. Те са достъпни основно за тези две групи микроорганизми благодарение на екзоензимите отделяни от тях. Токсичното действие на тежките метали доведе до чувствително намаляване на броя на к.о.е в почвите в близост до фабриката и хвостохранилището. За разлика от тях, пробата от междинния пункт през есента е със значително по-висока стойност.

Броят на целулозоразграждащите бактерии отчетени в изследваните проби беше между  $1,5 \cdot 10^3$  и  $3,3 \cdot 10^3$  (Фиг. 1 Д). При пробите взети през пролетта се наблюдава слабо понижение на броя на к.о.е развиващи се при по-висока степен на замърсяване (фабрика и хвостохранилище) в сравнение с контролната и междинната проби. От друга страна, през есента се отчете намаление в броя на жизнеспособните клетки единствено в почвите до фабриката. Прави впечатление удвояване на броя на к.о.е. в почвите до хвостохранилището през есента в сравнение с пролетта, поради по-високата запасеност през периода с органична материя богата на целулоза, довело до стимулиране развитието на тези микроорганизми.



**Фиг. 1.** Общ брой колонии образувачи единици на амонифициращите бактерии (А), спорообразуващите бактерии (Б), микроскопичните гъби (В), актиномицетите (Г) и целулозоразграждащите бактерии (Д), установени в изследваните почви през пролетта и есента. Данните изразяват средната стойност и стандартната грешка от три повторения.

Успоредно с изследване броя на к.о.е. (култивируеми) на различните физиологични групи микроорганизми се извърши и изследване на микробната активност като количество отделен въглероден диоксид от един грам почва за един час (обхваща както култивируеми, така и некултивируеми микроорганизми, Таблица 2).

Като цяло, се установиха по-високи стойности на почвеното дишане през есента, въпреки че статистически значима е единствено разликата получена при резултатите от пробите от района на хвостохранилището и фабриката, докато другите са в рамките на стандартната грешка. Средните

стойности на отделения  $\text{CO}_2$  през пролетта са еднакви за двата пункта, докато през есента беше отчетено значително завишаване на микробиалната активност в почвата от хвостохранилището, като стойностите се изравниха с тези в контролата. Тази завишената микробна активност може да се обясни с наличието на свеж субстрат, чиито макромолекули се подлагат на разграждане до по-прости вещества и до пълно минерализиране. Този процес е особено добре изразен през есента, когато е налично значително количество биомаса, още повече, че температурните разлики не са големи и има достатъчно количество влага, което води до засилена микробиална активност в почвата.

**Таблица 2.** *Количество отделен  $\text{CO}_2$  от 1 g почва за един час през пролетта и есента в изследваните почви. Резултатите изразяват средната стойност и стандартната грешка на три повторения.*

Пункт	Почвено Дишане ( $\mu\text{g CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ почва)	
	Пролет	Есен
Фабрика	$1.9 \pm 0.2$	$2.5 \pm 0.31$
Междинен	$2.5 \pm 0.33$	$3.0 \pm 0.11$
Хвостохранилище	$1.8 \pm 0.1$	$3.4 \pm 0.25$
Контролен	$2.67 \pm 0.67$	$3.33 \pm 0.022$

Екофизиологичният индекс и индексът на развитие на колонии са представени в Таблица 3. Различната скорост на растеж на микроорганизмите ни дава идея за разпределението им във всяка проба, тъй като характеристиката на *r*-стратегите включва бързия растеж в отговор на наличие на хранителни вещества, за разлика от *K*-стратегите, които се определят като бавно растящи. В настоящето изследване, бактериите образувачи видими колонии при  $28^\circ\text{C}$  върху хранителните среди след 48 h инкубиране бяха определени, като „бързо растящи“ (*r*-стратегии), докато другите образувачи колонии в по-късен период се нарекоха „бавно растящи“ (*K*-стратегии). Изследванията върху разнообразието на микробните популации в почвата установиха пряка зависимост между токсичността на металите и ЕРІ. В тази връзка, високите концентрации в пробите от района на фабриката подтиснаха разнообразието на популациите. Този ефект беше по-силно изразен през пролетта, отколкото през есента. Същата закономерност се установи и при микробиотата от района на хвостохранилището.

Стойността на индекса на развитие на колонии е толкова по-ниска, колкото по-равномерно е разпределението на колонии във всеки един от дните. В тази връзка, ниските стойности установени в почвите от района на фабриката говорят за преобладаване на *K*-стратегите, докато в другите проби са налични в по-голяма степен *r*-стратегите, използващи в по-бързо хранителните запаси в ценозата, което им осигурява по-бърз растеж за по-бързо заемане на свободните ареали, като един от малкото приспособителни механизми, които притежават. От друга страна, *K*-стратегите в силно замърсените почви,

притежават адаптивни способности по отношение на толерантността към токсичността на металите, което е силно предимство в борбата за заемане на микробоценозите в тези почви.

**Таблица 3.** Екофизиологичен индекс и индекс на развитие на колонии на микробната популация през пролетта и есента в изследваните почви.

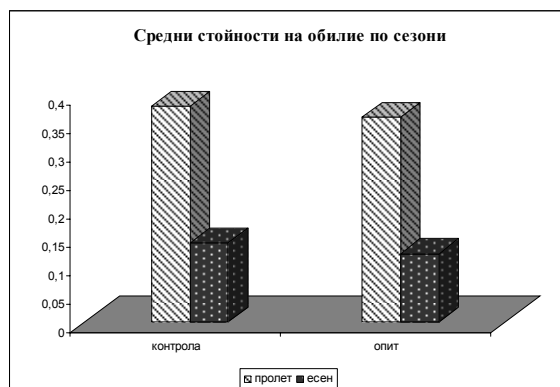
Пункт	Екофизиологичен индекс		Индекс на развитие на колонии	
	Пролет	Есен	Пролет	Есен
Фабрика	0,37	0,41	24,1	24,5
Междинен	0,56	0,51	45,4	48,1
Хвостохранилище	0,40	0,48	40,3	41,1
Контрола	0,60	0,57	52,5	56,3

При изследване на почвените безгръбначни, се установиха представители на следните таксони: Семейство *Lumbricidae*, Род *Lumbricus*, Клас *Myriapoda*, Разред *Geophilomorpha*, Клас *Insecta*- Ларви.

Таксономичния състав на проучените мезогеобионтни ценози е беден. В хода на проучването установихме само 6 таксона. Те са неравномерно разпределени в трите опитни полета и контролния участък. Общи за контролата и опитните участъци са само 3 таксона, а само представителите на сем. *Lumbricidae* и сем. *Elateridae* (ларви) бяха открити във всички извадки. Прави впечатление, че представителите на разред *Geophilomorpha* се установиха само в опитните почви в хода на цялото проучване.

Резултатите от проучването на мезогеобионтите са представени като осреднени стойности за контролния (незамърсен с тежки метали) и опитните варианти с установено замърсяване с тежки метали.

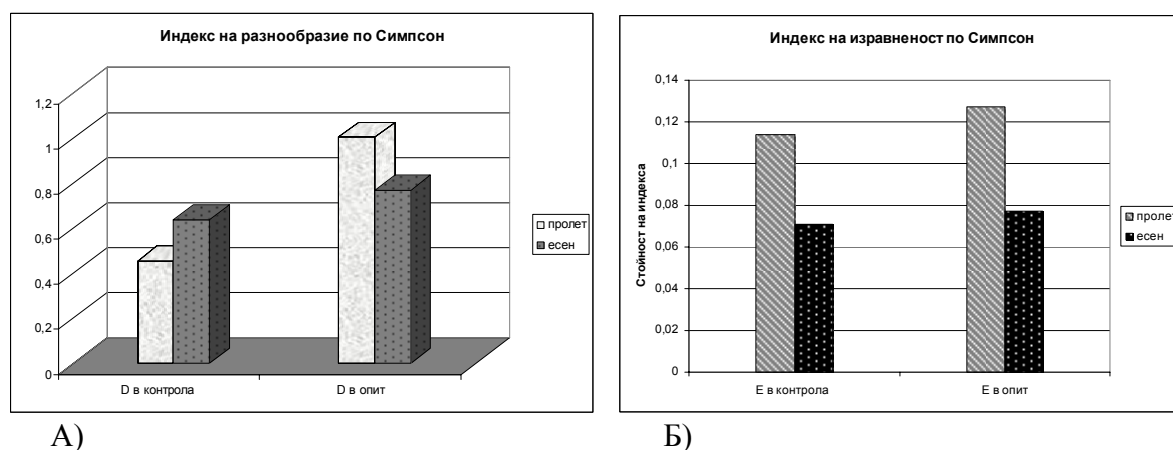
При проследяването на обилието на всички проби и таксони се установи, че като цяло в почвите, които не са замърсени с тежки метали то е по високо за целия период на проучване (Фиг. 2). Наблюдава се тенденция за намаляване на този показател от пролетната към есенната проба. Имайки предвид, че замърсяването на почвата с тежки метали не се е променило значително през периода на проучване, то бихме могли да предположим, че отчетените промени са резултат главно от влиянието на абиотичните фактори. Следователно, разпределението на таксоните е неравномерно и в контролата доминира един таксон с високо обилие, а останалите таксони са с незначителен дял във формирането и функционирането на съобществото. Това води и до по-ниските стойности на D и E установени при нея.



Фиг. 2. Средни стойности на обилието на мезогеобионтите в контролния и опитните варианти през пролетта и есента.

Анализът показва, че семейство *Lumbricidae* се среща във всички сезонни опитни проби и обилието му значително надвишава това в контролните проби. Същото се отнася и за представителите на клас *Myriapoda*. Освен това, в пролетната проба се появяват ларви на клас *Insecta*, чието обилие е малко по-високо в контролните проби.

От друга страна се установи, че *индексът на разнообразие* по Симпсън (Фиг. 3 А) по отношение на мезогеобионтите, е с по-високи стойности в опитните варианти в сравнение с контролата. Независимо от еднакия брой установени таксони в изследваните биогеоценози, поради различната изравненост, стойностите на D и E са по-високи в опитните проби (Фиг. 3 Б).



Фиг. 3. Средни стойности на индекса на разнообразие (А) и индекса на изравненост (Б) по Симпсън на мезогеобионтите в контролния и опитните варианти през пролетта и есента.

Динамиката на плътността на популациите на мезобионтите е в зависимост с тази на съдържанието на тежки метали в почвата. Най-висока плътност за всички таксони отчетохме при есенна проба. Вероятно този резултат е свързан и с по-високата влажност в почвата. Най-чувствително от присъствието на тежки метали се повлияват популациите на представителите



на сем. *Lumbricidae*, при които в три от пробите тя и по-висока в контролата. Представителите на сем. *Elateridae* понасят добре присъствието тежки метали, като плътността им се увеличава. Обратната тенденция установихме и за безгръбначните от разред *Geophilomorpha*, увеличаване на плътността при намаляването на концентрацията на тежките метали в почвата.

В контролата, обратно, доминира един таксон (Сем. *Lumbricidae*) с високо обилие, а останалите таксони са с незначителен дял във формирането и функционирането на съобществото. Това води и до по-ниските стойности на D и E установени за него. В биоценозата бяха установени устойчиви и респективно доминиращи таксони (сем. *Elateridae* – ларви и разред *Geophilomorpha*), и в същото време, такива с по-висока чувствителност (изразена чрез понижаване на плътността и обилието), като представителите на сем. *Lumbricidae*.

### ИЗВОДИ

Замърсяването с тежки метали в почвите около фабриката превишава ПДК по БДС, което доведе до чувствително намаляване на популационното разнообразие, както в микробиоценозите, така и при мезогеобиоценозите.

Силното замърсяване с тежки метали оказва негативно въздействие върху развитието на почвените микробиоценози, особено през пролетта, поради по-бедната растителност и по-слабата запасеност с хранителни вещества. Също така, в по-силно замърсените почви преобладават *K*-стратезите, докато в пунктовете с по-слабо замърсяване същите се намират в равновесие с *r*-стратезите.

Представителите на сем. *Lumbricidae* могат да се използват като биоиндикатори в почви, подложени на антропогенно влияние.

ЛИТЕРАТУРА

АНГЕЛОВ П., 1992. Зоология на безгръбначните животни. Пловдив, изд. ПУ „Паисий Хилендарски“.

БИГОН, М., ДЖ. ХАРПЕР, К. ТАУНСЕНД., 1989. Экология. Особи, популяции и сообщества. Том 2, 477

КОЛЕШКО, О.И., 1981. Экология микроорганизмов почвы. Выш. школа. Минск.

ШИЛЕВ, С. 2006. Микробиална активност в почви замърсени с тежки метали. Сборник с доклади на „4<sup>та</sup> национална младежка научно-практическа сесия“, 19-21 Май 2006 г., София, Стр. 194-199.

CARLOT M., A. GIACOMINI, S. CASELLA. 2002. Aspects of plant-microbe interactions in heavy metal polluted soil. *Acta Biotechnol.*, 22: 13-20.

DE LEIJ, F.A.A.M., J.M. WHIPPS, J.M. LYNCH. 1993. The use of colony development for the characterization of bacterial communities in soil and on roots, *Microb. Ecol.*, 27: 81-97.

GREMION F., A. CHATZINOTAS, K. KAUFMANN, W. VON SIGLER, H. HARMS. 2004. Impacts of heavy metal contamination and phytoremediation on a microbial community during a twelve-month microcosm experiment. *FEMS Microbiology Ecology*, 48: 273-283.

KELLY J.J., M.M. HÄGGBLUM, R.L. TATE. 2003. Effects of heavy metal contamination and remediation on soil microbial communities in the vicinity of a zinc smelter as indicated by analysis of microbial community phospholipid fatty acid profiles. *Biol. Fertil. Soils*, 38: 65-71.

KOZDROJ, J. & J. D. VAN ELSAS. 2000. Response of bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches, *Soil Biology & Biochemistry*, 32: 1405-1417.

KUNITO, T., K. SAEKI, K. NAGAOKA, H. OYAIZU, S. MATSUMOTO. 2001. Characterization of copper-resistant bacterial community in rhizosphere of highly copper-contaminated soil. *Eur. J. Soil Biol.*, 37: 95-102

SARATHCHANDRA, S.U., G. BURCH, N.R. COX. 1997. Growth patterns of bacterial communities in the rhizoplane and rhizosphere of white clover (*Trifolium repens* L.) and perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) in long-term pasture. *Applied Soil Ecology*, 6: 293-299.

STOTZKY G. Microbial respiration. 1965. *In: Methods of soil analysis*. Black C.A. (Ed.), American Society of Agronomy, Wisconsin, U.S.A., Part II, 1562-1565.

VELCHEVA, I, P. KOSTADINOVA, V. POPOV. 2001b. The Heavy Metals impact on Soil Mezobiota, *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 2: 637-641.

VELCHEVA, I., K.SAPUNDJEVA, P. KOSTADINOVA. 2001a. Ecomonitoring Study of the Condition of Soil Cenoses from Heavy Metals Contaminated Grounds. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 7: 319-324.

VELCHEVA, I., P. KOSTADINOVA. 2001. Invertebrates in Soil Polluted with Heavy Metals. *Journal of Balkan Ecology*, 4: 57-63

## A STUDY OF ECOLOGICAL PROPERTIES OF MICROFLORA AND MESOFAUNA FROM SOILS POLLUTED WITH HEAVY METALS

*Stefan Shilev<sup>1</sup>, Tatiana Bileva<sup>2</sup>, Iliana Velcheva<sup>3</sup>*

*1 Department "Environmental Microbiology and Biotechnology", Faculty of PPA, Agricultural University - Plovdiv, 12 Mendeleev Str, 4000, Plovdiv, stefan.shilev@au-plovdiv.bg*

*2 Department "Agroecology", Faculty of PPA, Agricultural University - Plovdiv, 12, Mendeleev Str, 4000, Plovdiv, tbileva@abv.bg*

*3 Department "Ecology and Environment protection", Faculty of Biology, University of Plovdiv Paisiy Hilendarski, 24 Tsar Assen, Str. 4000, Plovdiv, anivel@uni-plovdiv.bg*

### (Summary)

The higher contamination with heavy metals in the last years conducted to changes in the structure of soil communities and in the number of soil organisms, as well as, in suppression of their development during the seasons. Because there is a lack of investigation in our country, the objective of present work was to reveal existing changes in soil microflora and mesofauna of the region of the town of Rudozem, affected by the mine activity. Four types of soils and contamination were studied. We found that in high contaminated soils the number of viable microorganisms of different physiological groups, the soil respiration and mesobiota had been reduced by the toxic effect of the metals. Higher content of organic compounds conducted to a partial overcome of the toxic effect of the heavy metals related to the total number of bacteria, the bacteria utilizing mineral nitrogen and cellulose-degrading bacterial. On the other hand, the organic matter load in the soil during the autumn ameliorated the microclimate of soil communities and decrease of negative effect of the toxic elements.