

Экологический мониторинг воздушного бассейна жилых зон Нижнего Новгорода микробиологическими методами

Доронин Арсений Дмитриевич, 10 класс МАОУ Школа №44, ГБУДО ЦРТДиЮ НО
Научный руководитель И.В. Кузнецова, методист Экостанции ГБУДО ЦРТДиЮ НО

В работе представлены результаты двухлетнего исследования микрофлоры воздуха крупного города. Микробиологические методы применялись в комплексе с биолюминесцентным экспресс-методом определения токсичности среды. В воздухе одного из районов города найдены условно-патогенные микроорганизмы. Низкие индексы биологического разнообразия микроорганизмов и высокий уровень токсичности среды возможно связаны с загрязнением атмосферы вблизи трасс с интенсивным транспортным потоком.

В условиях урбанизации одной из наиболее важных экологических проблем является сохранение безопасной среды обитания для человека, поэтому важной задачей является оценка качества воздушной среды. Методы микробиологического анализа требуют значительного времени для получения результата. Применение экспресс-метода выявления токсичности среды может существенно упростить и ускорить процедуру мониторингового исследования.

Цель работы – исследование качества воздуха в разных районах города различными методами микробиологического мониторинга.

Известно большое количество исследований микрофлоры воздуха открытых пространств, проведенных в основном методом седиментации [4]. Метод же смывов используется для исследований в закрытых помещениях [3]. В любом случае, микрофлора воздуха открытых пространств, в том числе и в селитебных зонах городов, не рассматривается как патогенная [7]. В то же время загрязнение воздуха городов промышленными выбросами, копотью и сажей теплоэлектростанций, выхлопными газами машин делает воздушную среду источником токсической опасности для человека и других живых организмов [7].

Принято считать, что районы нагорной части Нижнего Новгорода имеют более благоприятную экологическую обстановку, чем районы, расположенные в заречной. Это связано с размещением промышленных предприятий, близким расположением крупного химического комбината в Дзержинске и находящейся неподалеку огромной мусорной свалки [14].

Атмосферный воздух исследуют в жилой зоне на уровне 0,5-2,0 м от земли, поскольку именно эта часть атмосферы является основной средой обитания человека [7], поэтому смывы было решено взять с оконных карнизов первых этажей жилых домов.

Нами было проведено исследование микроорганизмов воздуха в разных районах города.



Всего взято 16 проб в 8 районах города в 2020 году и повторно 16 проб из двух районов города (Приокского и Советского) в 2021 году.

В 2020 году пробы отбирались случайным образом в двух точках в каждом районе города вдали от крупных автомобильных трасс.

В 2021 году мы нанесли на карту города сеть с расстоянием между точками 2 км. Всего на площади Советского и Приокского районов получилось 17 точек, равномерно покрывающих участок протяженностью 10 км в длину и 8 км в ширину (рис. 1), что позволит проводить градиентный анализ данных. В январе 2021 года были взяты пробы из первых восьми точек.

Смывы брали с поверхности 100 см², используя трафарет 10х10 см. Перед каждым употреблением трафарет стерилизовали ватным диском, смоченным в спирте.

В чашку Петри на стандартную питательную среду, - мясо-пептонный агар (МПА), - стерильной пипеткой наносили 1 см³ смывной жидкости. Засевали по три чашки Петри на один смыв.

Рис. 1. Расположение точек отбора проб, 2021 год

В работе 2020 года мы применяли стандартное инкубирование неразведенной пробы при температуре 37° С в течение 36 часов, в результате которого

получили сплошной рост колоний на всех чашках, и далее пересчет количества колоний производился путем соотношения площади одиночной колонии определенного вида к площади сплошного роста колонии того же вида. Несомненно, это снижало точность подсчета колоний, что можно видеть при сравнении количества полученных колоний в 2020 и 2021 году.

В 2021 году был применен метод 1000-кратного разведения исходной пробы. Посевы инкубировали при 25°С в течение 48 ч. Дополнительно инкубировали одну чашку Петри со стерильной средой – контроль (К).

Микроорганизмы подсчитывались методом стандартного подсчета колоний [1]. В дальнейшем исследовании использовалось среднее арифметическое число подсчета колоний со всех чашек Петри для данного района.

По внешнему виду колоний условно подсчитывалось видовое богатство микроорганизмов.

Пробы были зафиксированы и окрашены стандартным методом по Граму [1]. Полученные препараты исследованы под микроскопом, результаты занесены в таблицы (таб. 1-2).

Таблица 1. Виды и разнообразие колоний микроорганизмов, метод смывов (данные 2021 года)

	Точки отбора проб								
	Советский район				Приокский район				
Виды колоний	6	7	8	14	5	11	12	15	Итого
Мелкие, светло-бежевые, глянцевые, ровный край	3762	8706	4648	12190	6912	3761	3659	6564	50202
Сухая, с неровным краем, матовая					1				1
Плесень, белая, пушистая		1	4	2	2	2	5	4	20
Матовая, белая, круглая		1		2	1	3		1	8
Глянцевая, круглая, ровная, белая			1	1			2	2	6
Белая с желтой серединкой и зеленой окантовкой, неровный край			1						1
Желтая, круглая, ровный край						1			1
Сухие, матовые, складчатые, молочные							7		7
Матовая, неровный край, белая								1	1
Итого колоний (N)	3762	8708	4652	12195	6916	3767	3673	6572	50246
Итого видов колоний	1	3	4	4	4	4	4	5	
Индекс Шеннона (H)	0,002	0,002	0,01	0,003	0,004	0,09	0,03	0,01	
Индекс Маргалефа (I Mg)	0	0,22	0,36	0,32	0,34	0,24	0,37	0,46	
Токсичность	2	1	3	1	2	1	1	3	

Таблица 2. Виды и разнообразие колоний микроорганизмов, метод смывов (данные 2020 года)

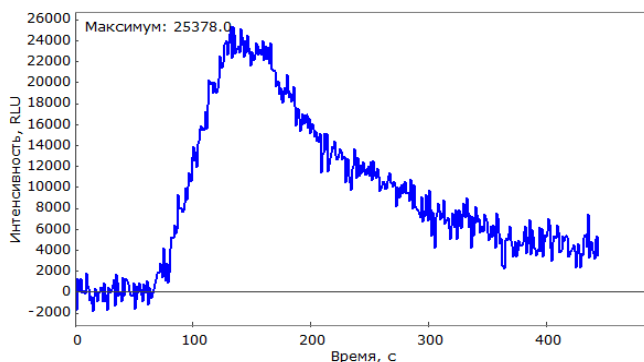
Внешний вид колонии	Районы города	Нижегородский	Сормовский	Ленинский	Московский	Канавинский	Автозаводский	Приокский	Советский	Итого
матовая светло-коричневая		6		150	4	166	9	152	18	505
матовая темно-коричневая									1	1
глянцевая светло-бежевая		11	7		1		19		3	41
матовая светло-бежевая			79	33	35					147
глянцевая желтая									12	12
матовая молочная морщинистая									1	1
матовая желтая									15	15
морщинистая коричневая				1					1	2
светло-коричневая с точкой посередине			14			3				17
морщинистая светло-бежевая					3					3
глянцевая светло-коричневая								21		21
Итого колоний (N)		17	100	184	43	169	28	173	51	765
Итого видов колоний (n)		2	3	3	4	2	2	2	7	11
Индекс Шеннона (H)		0,65	0,65	0,50	0,66	0,09	0,63	0,37	1,46	1,31
Индекс Маргалефа (I Mg)		0,35	0,43	0,38	0,53	0,20	0,30	0,25	1,78	1,51
Токсичность		2	2	1	1	3	1	3	1	

Водную суспензию, полученную методом смывов, тестировали с помощью портативного люминометра LumiShot в соответствии с инструкцией «Тестирование загрязнения воды» методического пособия для пользователей люминометра, разработанного ООО «НПП «Прикладные Биосистемы», г. Красноярск, в трех повторностях.

Люциферазный индекс токсичности вычисляли по формуле:

$$\text{ЛИТn} = (I_k - I_n) / I_k \times 100\%,$$

где n – номер пробы, k – контроль, I – индекс светимости



На основании графика интенсивности свечения (рис. 2) пробам были присвоены следующие значения токсичности в баллах: «0» – отсутствие токсичности, контроль (дистиллированная вода); «1» – слабая токсичность (20000 RLU и выше); «2» – средняя токсичность (от 15000 до 20000 RLU); «3» – высокая токсичность (ниже 15000 RLU)

Рис.2. График интенсивности люциферин-люциферазного свечения в пробе из Советского района

Пробы 2021 года для анализа на наличие патогенных и условно-патогенных микроорганизмов были переданы в лабораторию ГемоХелп, где высевались на кровяной агар и инкубировались в течение 48 часов при температуре 37° С. Затем пробы исследовались на масс-спектрометре.

На основании предварительных данных были вычислены индекс видового разнообразия Шеннона, индекс видового богатства Маргалефа [6]. Результаты внесены в таблицу 2.

По данным 2020 года низкая токсичность проб и высокое видовое разнообразие микроорганизмов было выявлено в Советском районе, высокая токсичность и низкое видовое разнообразие – в Приокском районе Нижнего Новгорода.

В 2021 году подавляющее большинство (99,9%) колоний микроорганизмов во всех пробах составляют мелкие светло-бежевые глянцевые колонии с ровным краем, образованные грамположительными одиночными кокками, что может быть связано с низкими зимними температурами 2021 года, которые возможно послужили максимальному обеднению видового разнообразия микробиоты.

Точка №7 Советского района и точка №5 Приокского района совпадают с местами забора проб 2020 года. В обоих случаях подтверждаются данные предыдущего исследования относительно токсичности среды.

В пробе из точки 11 (Приокский район, ул. Ларина) были выявлены условно-патогенные микроорганизмы - грамтрицательные бактерии рода *Enterobacter*.

В пробе из точки 12 (Приокский район, ул. Ботаническая) были выявлены грамтрицательные неферментирующие палочки.

Точки 11 и 12 расположены вблизи дубравы Ботанического сада ННГУ, что делает экологическую обстановку в этой части города благоприятной. Близлежащую территорию занимает частный сектор, где ведется приусадебное земледелие, отсутствует подключение к центральной канализации. Наличие в пробах условно-патогенных организмов можно объяснить последними двумя факторами.

Устойчивость экосистемы увеличивается с ростом видового разнообразия. Низкое разнообразие колоний и микроорганизмов свидетельствует о низкой устойчивости экосистемы, что может привести к появлению или увеличению числа патогенных микроорганизмов и грибов.

Литература

1. Еремина И.А., Кригер О.В. Лабораторный практикум по микробиологии: Учебное пособие для студентов вузов. Кемерово, 2005. – 34 с.

2. Есимбекова Е.Н., Римацкая Н.В., Суковатая И.Е., Кратасюк В.А. Биоллюминесцентный экспресс-метод определения интегральной токсичности воды и загрязнения воздуха// Вестник ОГУ №10 (159). - 2013. – С. 122-127.
3. Кондакова Г.В. Биоиндикация. Микробиологические показатели: Учебное пособие. – Ярославль: ЯрГУ, 2007. – 136 с.
4. Микробиологические методы контроля качества пищевых продуктов: программа, метод. указания, контрольные задания и лаб. работы для студентов специальности 1-54 01 03 «Физико-химические методы и приборы контроля качества продукции» заочной формы обучения / сост. А. В. Игнатенко. – Минск : БГТУ, 2012. – 112 с.
5. Мишустин Е.Н., Емцев В.Т. Микробиология. – М., 1987. – 384 с.
6. Одум Ю. Экология — М.: Мир, 1986. — Т. 1. — 328 с.
7. Павлович С.А., Пяткин К.Д. Медицинская микробиология. – Минск: Высшая школа, 1993. – 200 с.
8. Петросян Л. А., Захаров В. В. Математические модели в экологии. — СПб.: Изд-во СПбГУ, 1997. — 256 с.
9. Поляк М.С., Сухаревич В.И., Сухаревич М.Э. Питательные среды для медицинской микробиологии, Санкт-Петербург, 2002 г. – 24 с.
10. Природа Горьковской области. – Горький: Волго-Вятское книжное издательство, 1974.-416 с.
11. Черемисинов Н.А., Боева Л.И., Семихатова О.А. Практикум по микробиологии.– М.: Высшая школа, 1967.– 168 с.
12. Шлегель Г.Х. Общая микробиология.– М.: Мир, 1987.– 566 с.
13. Экология микроорганизмов, под ред. проф. А.И. Нетрусова. - М.: Юрайт, 2015. - 268 с.
14. Раздел «Проблемные территории» сайта Экологического центра «Дронт» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://dront.ru/item/dront-locals/>, свободный - (26.10.2020)