

*На правах рукописи*

ГРИГОРИАДИ АННА СЕРГЕЕВНА

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ  
БИОПРЕПАРАТОВ И ФИТОМЕЛИОРАНТОВ В БИОРЕМЕДИАЦИИ  
НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ**

03.01.06 – биотехнология

03.02.08 – экология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Уфа – 2010

Работа выполнена на кафедре биохимии и биотехнологии ГОУ ВПО «Башкирский государственный университет»

**Научные руководители:** доктор биологических наук, профессор  
**Киреева Наиля Ахняфовна**  
кандидат биологических наук, ст. науч. сотр.  
**Галимзянова Наиля Фауатовна**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
**Кураков Александр Васильевич**  
доктор биологических наук, профессор  
**Габбасова Илюся Масгутовна**

**Ведущая организация:** Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (г. Саратов)

Защита диссертации состоится 3 декабря 2010 г. в 16-00 часов на заседании Регионального диссертационного совета ДМ 002.136.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биологии Уфимского научного центра Российской академии наук по адресу: 450054, г. Уфа, пр. Октября, д. 69, тел.: 235-53-62, e-mail: ib@anrb.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Уфимского научного центра Российской академии наук и на официальном сайте <http://www.anrb.ru/inbio/dissovet/index/htm>

Автореферат разослан « 30 » октября 2010 г.

Ученый секретарь  
Регионального диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Р.В. Уразгильдин

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** В условиях неуклонно возрастающего антропогенного давления на окружающую среду ее защита от техногенного загрязнения является одной из серьезных задач экологии.

Нефть и нефтепродукты, поступая в окружающую среду, оказывают негативное влияние на все компоненты экосистем. Углеводороды являются постоянным источником канцерогенного и мутагенного воздействия. Нефтяное загрязнение почв приводит к выведению обширных территорий из сельскохозяйственного использования.

Исследованиями многих авторов доказано, что естественное восстановление плодородия почв, загрязненных нефтяными углеводородами, занимает длительный период (Хазиев, Фатхиев, 1981; Margesin et al., 1999; Логинов и др., 2000; Габбасова, 2004; Маганов и др., 2006; Кураков и др., 2006). Попытки рекультивации нарушенных почв только физико-химическими методами зачастую не дают желаемых результатов (Суржко и др., 1995; Алексеева и др., 2000; Давыдова, Тагасов, 2006; Мельников и др., 2007). В настоящее время наиболее перспективным считается комплексный подход к биоремедиации (Исмаилов, Пиковский, 1988; Вельков, 1995; Логинов и др., 2000; Карасева и др., 2005; Середина и др., 2008). Еще большую популярность приобретают методы, основанные на использовании объединенного метаболического потенциала микроорганизмов и растений (Турковская, Муратова, 2005). В связи с этим весьма актуальным является изучение процессов восстановления нефтезагрязненных почв с использованием различных методов и приемов рекультивации.

**Цель диссертационной работы** - оценка эффективности микробных препаратов разнонаправленного действия и фитомелиорантов при рекультивации нефтезагрязненных почв по биологическим показателям.

### **Основные задачи исследований:**

1. Выявить изменение биологической активности нефтезагрязненной серой лесной почвы при стимулировании аборигенной микробиоты внесением углеводно-минеральной добавки, являющейся отходом целлюлозно-бумажного производства;

2. Изучить влияние неспецифических микробных препаратов (Азолен, Белвитамил, Елена) на восстановление серой лесной почвы после нефтяного загрязнения;

3. Оценить по биологическим показателям эффективность применения препаратов, основанных на специализированных углеводородокисляющих группах микроорганизмов (Ленойл, Универсал), для восстановления разных типов почв

4. Исследовать возможность использования дягиля лекарственного (*Archangelica officinalis* L.) и бархатцев прямостоячих (*Tagetes erecta* L.) для фиторемедиации нефтезагрязненной серой лесной почвы.

**Научная новизна работы.** Впервые было проведено исследование влияния биопрепарата Универсал на типы почв, характерных для умеренных и южных широт России и рассмотрен комплекс микроскопических грибов при рекультивации препаратом. Впервые была предложена углеводно-минеральная добавка, являющаяся отходом целлюлозно-бумажного производства, для рекультивации нефтезагрязненной почвы. Получены новые данные по использованию дягиля лекарственного (*Archangelica officinalis*) для фиторемедиации почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами. Впервые проведена оценка влияния дягиля на биологические свойства нарушенных почв, а также исследована его устойчивость к действию различных поллютантов.

**Практическая значимость.** Полученные данные могут быть использованы при выборе методов биоремедиации в зависимости от типа почвы и степени ее загрязнения в условиях разных климатических зон России. Для внедрения в практику биоремедиации был предложен дягиль лекарственный в качестве фитомелиоранта. Результаты исследований могут быть применены в учебном процессе в рамках дисциплин «Рекультивация нарушенных земель», «Экология микроорганизмов», «Биоиндикация и биомониторинг» и «Техногенные системы и экориск».

Результаты исследований были апробированы в ССП «НИПИ Нефтегаз» (Акт о внедрении прилагается).

**Личное участие автора.** Автором написан аналитический обзор литературы, получена основная часть фактических данных, проведена их интерпретация и подготовка научных публикаций.

**Обоснованность выводов и достоверность результатов работы** обеспечены большим объемом лабораторных и полевых экспериментов с применением современных математических методов обработки, анализа и оценки полученных результатов.

**Апробация работы.** Основные положения и результаты диссертационной работы были представлены на *Международных конференциях* «Ломоносов-2006» (Москва, 2006), «Экология и биология почв» (Ростов на Дону, 2007), «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2007, 2009, 2010), «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2007, 2008, 2010), «Мировые инновационные технологии восстановления нарушенных и загрязненных техногенных регионов» (Кемерово, 2008), «Актуальные проблемы биоэкологии и биотехнологии» (Москва, 2008; Казань, 2008; Саранск, 2008; Тамбов, 2009, 2010), «Адаптация биологических систем к естественным и экстремальным факторам среды» (Челябинск, 2008), «Экология России и сопредельных территорий» (Новосибирск, 2008, 2009), «Фундамен-

тальные и прикладные исследования в биологии» (Донецк, 2009), «Инновационные процессы в АПК» (Москва, 2009), «Современные проблемы загрязнения почв» (Москва, 2010), «Биотехнология начала III тысячелетия» (Саранск, 2010), на *Всероссийских конференциях и съездах «Актуальные проблемы биологии и экологии»* (Сыктывкар, 2007), «Фундаментальные достижения в почвоведении, экологии, сельском хозяйстве на пути к инновациям» (Москва, 2008; Санкт-Петербург, 2008), «Инновационные подходы к естественнонаучным исследованиям и образованию» (Казань, 2009), «Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды» (Иркутск, 2009), «Экоаналитика-2009» (Йошкар-Ола, 2009), «Экотоксикология - 2009» (Пушино, 2009), «Окружающая среда и проблемы устойчивого развития регионов» (Казань, 2009; Киров, 2008, 2009), «Актуальные проблемы сохранения биоразнообразия» (Апатиты, 2009; Уфа, 2010; Оренбург, 2010). На конкурсе научных работ студентов вузов Республики Башкортостан в 2007 г работа была отмечена дипломом I степени.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 24 научные работы, в том числе в 11 журналах, рекомендованных ВАК.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов, списка литературы, включающего 367 источников, в том числе 106 на иностранных языках, и 4 приложения. Работа содержит 209 страниц основного текста, 19 страниц приложений, иллюстрирована 37 рисунками и включает 16 таблиц.

**Благодарности.** Автор выражает искреннюю благодарность и признательность за неоценимую помощь и поддержку научным руководителям проф. д.б.н. Киреевой Н.А. и к.б.н. Галимзяновой Н.Ф., к.б.н. Башировой Р.М., к.б.н. Бакаевой М.Д., к.б.н. Юмагужину М.С. за активное участие в обсуждении результатов, к.б.н. Г.Ф. Рафиковой за помощь в определении микроскопических грибов, д.б.н. Логинову О.Н. и к.б.н. Маркаровой М.Ю. за любезно предоставленные биопрепараты, а также всем коллегам и соавторам публикаций.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Глава 1. Влияние нефтяного загрязнения и ремедиации на биологические свойства почвы (обзор литературы)**

Дана общая характеристика нефтяных углеводородов как одного из приоритетных поллютантов окружающей среды. Описано влияние нефти и нефтепродуктов на компоненты почвенной экосистемы. Рассмотрены основные методы восстановления и освещены проблемы, связанные с рекультивацией загрязненных почв.

## Глава 2. Объекты и методы исследований

Объектами исследований были серая лесная почва (республика Башкортостан) и чернозем обыкновенный (Краснодарский край), загрязненные нефтью и нефтепродуктами, а так же растения дягиля лекарственного и бархатцев прямостоячих в качестве фитомелиорантов. В лабораторных и полевых условиях изучалось изменение биологической активности нефтезагрязненных и рекультивируемых почв (серая лесная почва и чернозем обыкновенный). Для биоремедиации были использованы: 1) УМД (углеводно-минеральная добавка), образующаяся при производстве целлюлозы из древесины сульфитным способом. Основными компонентами этой добавки являются моносахариды (28-32%); 2) Белвитамил – готовая смесь промышленной ассоциации аэробно-анаэробных микроорганизмов активного ила очистных сооружений целлюлозно-бумажного производства; 3) Азолен – биоудобрение, разработанное на основе штамма *Azotobacter vinelandii* (Пат. 2224791 РФ); 4) Биофунгицид Елена, основу которого составляет культуральная жидкость нового штамма-антагониста фитопатогенных грибов *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 51 (Логинов и др., 2003); 5) Ленойл – препарат для рекультивации нефтезагрязненных почв и водных объектов, основу которого составляет природный консорциум микроорганизмов нефтедеструкторов *Bacillus brevis* и *Arthrobacter sp.* (Логинов и др., 2004); 6) Универсал – бакпрепарат, разработанный на основе нефтеокисляющих бактерий *Rodococcus equi*, выделенных из загрязненных нефтью почв Усинского и Ухтинского районов Республики Коми (Маркарова, 2004).

Оценка биологической активности почвы осуществлялась по следующим параметрам: ферментативная активность, численность различных эколого-трофических групп микроорганизмов и фитотоксичность. Каталазная активность определялась газометрическим методом, пероксидазная, полифенолоксидазная и дегидрогеназная – спектроскопическими методами (Хазиев, 2005). Определение численности микроорганизмов почвы и ризосферы растений проводили в соответствии с общепринятыми методами посева (Методы почвенной ..., 1991). Идентификацию видов микромикетов проводили по определителям (Литвинов, 1967; Пидопличко, 1972; Билай, 1977; Егорова, 1986; Билай, 1988; Raper, Fennel, 1965; Raper, Thom, 1968; Watanabe, 2000). Видовые названия грибов уточняли по пополняемому списку опубликованных видов в базе данных «Index fungorum» ([www.indexfungorum.org](http://www.indexfungorum.org)). Оценку степени фитотоксичности почвы проводили по Гродзинскому (1991) биотестами с помощью проростков редиса (*Raphanus sativus*), сорт Красный с белым кончиком.

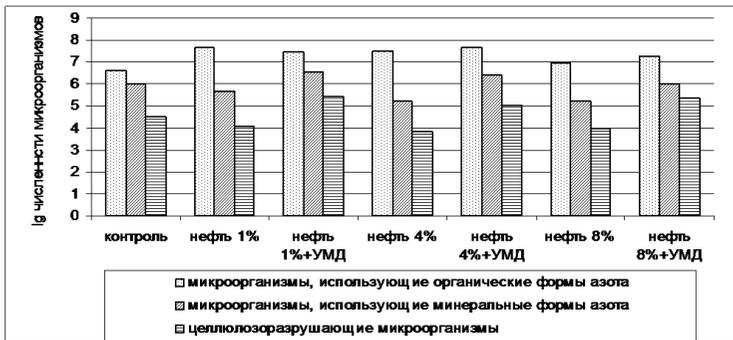
Определение содержания остаточных нефтепродуктов в почве проводили горячей экстракцией хлористым метиленом (McGill, Rowell, 1980). Содержание бенз(а)пирена – спектрофлуориметрическим способом (Трубникова и др., 2006). Пигменты растений экстрагировали метанолом и аце-

тоном и снимали спектры поглощения на приборе UV-2401 PC Shimadzu. Микроскопические исследования корневой системы растений проводили на люминесцентном микроскопе марки ЛОМО Микромед-2 (Россия), степень микотрофности корней рассчитывали методом Травло (Методы исследования..., 1992).

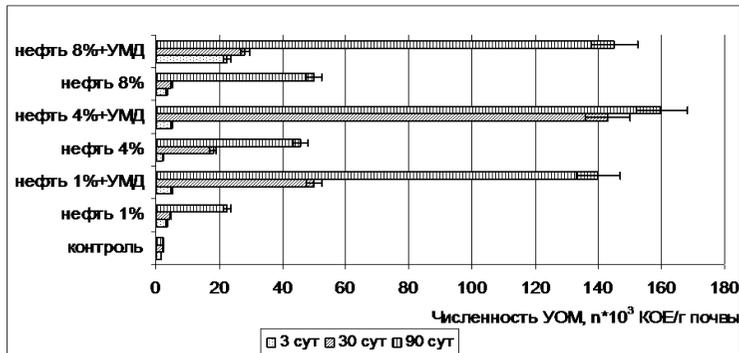
Статистическую обработку результатов производили с применением пакета прикладных программ Statistica V 6.0., Excel-2003. При оценке статистической достоверности средних полученных данных использовали t - критерий Стьюдента на 5% уровне значимости.

### Глава 3. Использование углеводно-минеральной добавки для стимулирования аборигенной микробиоты при восстановлении нефтезагрязненной почвы

Действие УМД основано на стимуляции аборигенной микробиоты нефтезагрязненной почвы. Использование добавки оказало положительное



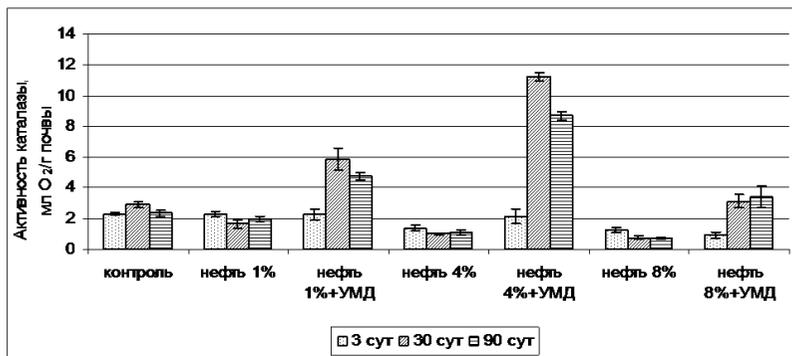
А



Б

Рис.1. Динамика численности целлюлозоразрушающих (А) и углеводородокисляющих (Б) микроорганизмов в нефтезагрязненной и рекультивируемой УМД почве

влияние на численность микроорганизмов, использующих органические и минеральные формы азота, целлюлозолитиков (рис.1А), значительно стимулировало активность каталазы (рис.2).



**Рис. 2. Динамика каталазной активности нефтезагрязненной и рекультивируемой почвы**

Внесение УМД в нефтезагрязненную почву способствовало развитию углеводородокисляющих микроорганизмов (рис. 1Б). Очевидно, благодаря этому деградации при использовании УМД подверглось до 61% углеводов (при начальной концентрации нефти 8%).

Внесение УМД привело к перестройке микологического сообщества серой лесной почвы (табл.1). Во всех вариантах опыта с применением добавки происходило усиленное развитие видов рода *Fusarium* и *Aspergillus*. Для сильнозагрязненной почвы (8%) характерно преобладание представителей р. *Fusarium* (*F. javanicum*, *F. martii*, *F. merismoides*, *F. oxysporum*).

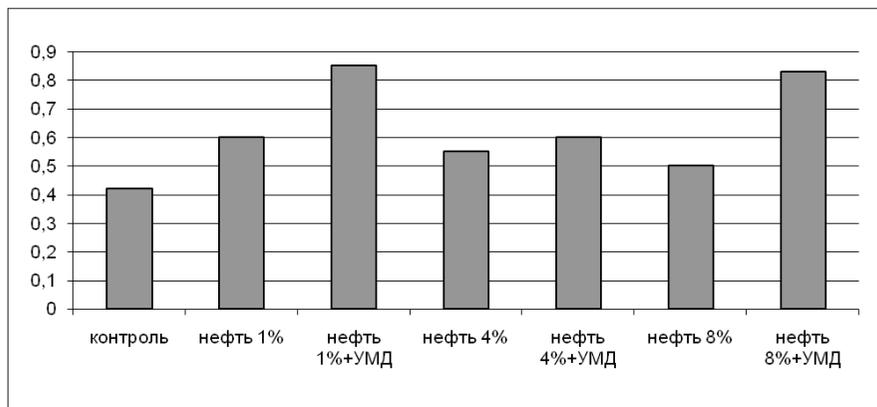
Таблица 1

**Доминирующие и типично частые виды, выделенные из серой лесной почвы при нефтяном загрязнении и рекультивации**

Незагрязненная почва	Почва, загрязненная нефтью	Почва, обработанная УМД
<i>Penicillium corylophylum</i> , <i>P. funiculosum</i> , <i>P. velutinum</i> , <i>Talaromyces flavus</i>	<i>Aspergillus candidus</i> , <i>A. niger</i> , <i>P. atrovirens</i> , <i>P.purpurogenum</i>	<i>A. ustus</i> , <i>P. atrovirens</i> , <i>P. funiculosum</i> , виды рода <i>Fusarium</i>

Однако обработка УМД не приводила к уменьшению токсичности почвы для растений. Даже через 90 суток всхожесть редиса составляла всего лишь 15, 11 и 7% для проб с 1, 4 и 8%-ной концентрацией загрязнителя соот-

ветственно. Это связано с тем, что УМД стимулировала развитие микромикробов, обладающих фитотоксическими свойствами (рис.3).



**Рис.3. Доля фитотоксичных грибов, выделенных из нефтезагрязненной и обработанной УМД серой лесной почве**

#### **Глава 4. Влияние внесения неспецифических микробных препаратов на биологическую активность нефтезагрязненной почвы**

Поскольку другие показатели биологической активности свидетельствуют об оптимизации условий жизнедеятельности микробиоты при внесении УМД, то ее применение в технологиях биорекультивации оправдано в сочетании с фунгицидными биопрепаратами (такими как, Елена и т.п.).

Биопрепараты Азолен, Белвитамил и Елена не содержат в своем составе специализированных углеводородокисляющих микроорганизмов, однако бактерии, составляющие их основу, могут стимулировать биологическую активность нефтезагрязненной почвы (Градова, 2003; Логинов, 2005; Муратова и др., 2005; Онегова, 2006).

Использование каждого из биопрепаратов оказывало положительное влияние на микробиоту нефтезагрязненной серой лесной почвы, однако степень выраженности воздействия была неодинаковой для разных групп микроорганизмов. Белвитамил активнее, чем Азолен и Елена стимулировал развитие УОМ, в том числе и за счет микроорганизмов активного ила, способных разлагать углеводороды (рис. 4).

Аналогичные данные были получены и для группы целлюлозоразлагающих микроорганизмов, весьма чувствительных к загрязнению углеводородами и способных чутко реагировать на изменения условий обитания (Киреева, 1994) (рис. 5).

Активность почвенных ферментов, во многом определяет эффективность процесса биорекультивации. Оценка активности каталазы показала, что выраженное стимулирующее влияние на этот показатель оказывало внесение Белвитамила (рис. 6)

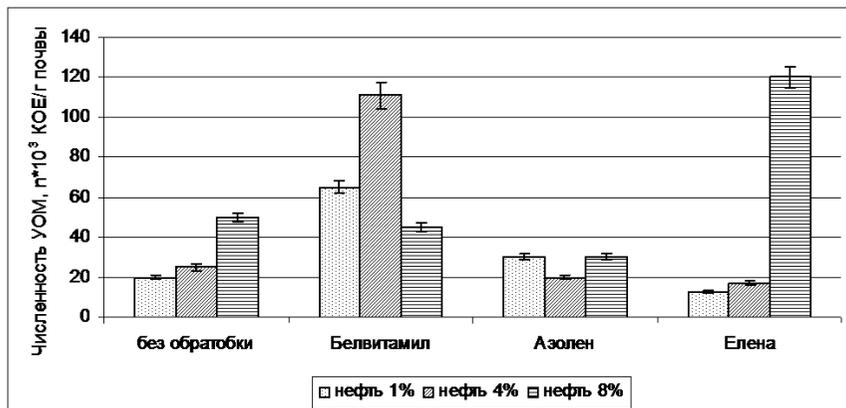


Рис. 4. Численность углеводородокисляющих микроорганизмов нефтезагрязненной серой лесной почвы при использовании биопрепаратов Белвитаил, Азолен, Елена (90 сутки)

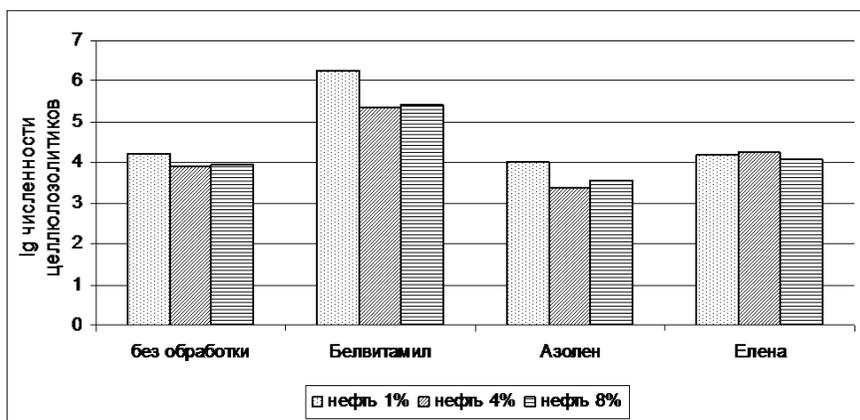


Рис. 5. Численность целлюлозоразлагающих микроорганизмов нефтезагрязненной серой лесной почвы при использовании биопрепаратов Белвитаил, Азолен, Елена (90 сутки)

По эффективности снижения содержания углеводов биопрепараты распределились следующим образом, в зависимости от начальной концен-

трации нефти: 1% – Б > А > Е; 4% – Б > Е > А, 8% – Б > А > Е. Белвитами́л оказался наиболее активным при высокой степени загрязнения - под его влиянием разложилось до 63,7% углеводов, а при внесении Азолен или Елены 46,3% и 32,5% соответственно.

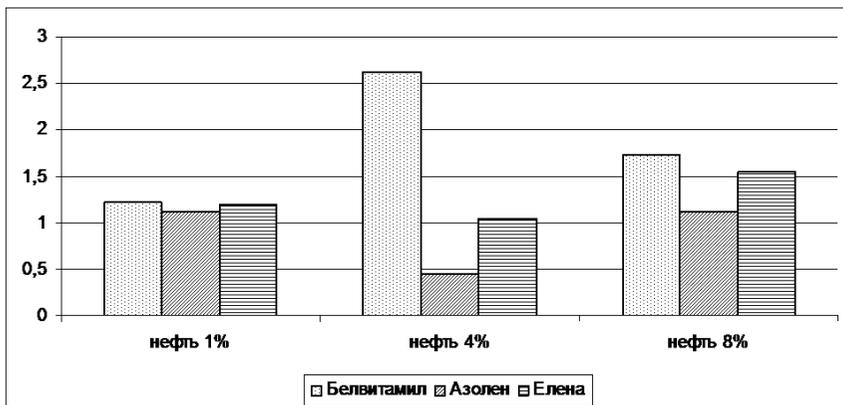


Рис. 6. Относительная активность каталазы при внесении Белвитами́на, Азолена, Елены в нефтезагрязненную серую лесную почву через 90 суток (мл  $O_2$ /г в нефтезагрязненной почве/ мл  $O_2$ /г почвы при биоремедиации)

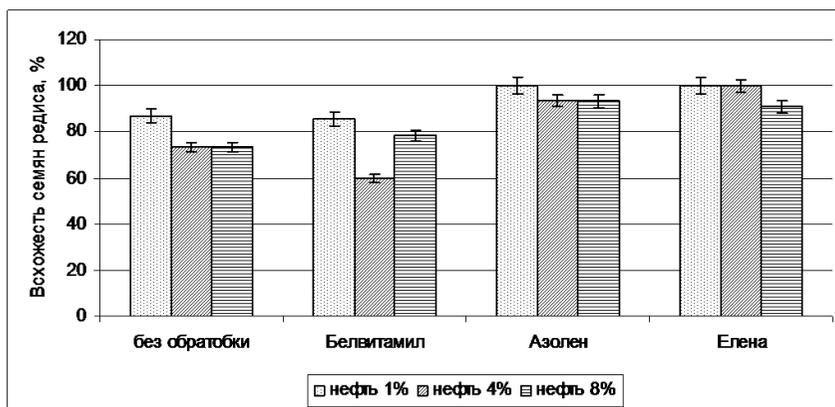


Рис. 7. Всхожесть семян редиса в нефтезагрязненной серой лесной почве при использовании для биоремедиации препаратов Азолен, Белвитами́л, Елена (90 суток)

Одним из важных показателей степени восстановленности рекультивируемых почв является их токсичность по отношению к растениям. Извест-

но, что в нефтезагрязненных почвах токсичность вызвана не только прямым действием углеводов, но и развитием фитотоксичных видов микромицетов (Киреева и др., 2003). Азолен и Елена, в большей степени, чем Белвитамил способствовали снижению плотности популяций микроскопических грибов в нефтезагрязненной почве, уменьшению доли фитотоксичных видов, что явилось одной из предпосылок к устранению токсичности почвы по отношению к тест-растению при 1% загрязнении и значительному снижению при 4% и 8% (рис. 7)

### **Глава 5. Влияние специализированных препаратов на основе углеводородокисляющих микроорганизмов на биологическую активность нефтезагрязненной почвы**

Ленойл и Универсал представляют собой специализированные препараты нефтеокисляющего действия. В автореферате представлены данные, полученные при исследовании Универсала.

Внесение Универсала приводило к увеличению численности УОМ, максимальное их количество наблюдалось в почве загрязненной 10% нефти (полевой опыт - до  $160 \cdot 10^3$  КОЕ/г почвы), что указывает на активное протекание процессов деградации углеводов. Сходные данные получены в модельных экспериментах при рекультивации серой лесной почвы и чернозема обыкновенного (рис. 8).

Применение Универсала способствовало изменению видового состава комплекса микромицетов рекультивируемой почвы. Внесение биопрепарата в загрязненную почву приводило к возрастанию видового богатства, способствовало изменению обилия типичных видов (табл. 2). В чистой почве преобладал *P. lanosum*, внесение Универсала увеличило обилие этого вида. При низкой концентрации нефти максимальное обилие было характерно для *Aspergillus niger*, применение биопрепарата приводило к преобладанию *Penicillium canescens*. В сильнозагрязненной почве доминировал *P. madriti*, обработка Универсалом приводила к смене доминанты.

Важным критерием оценки почвы в отношении ее самоочищающей способности от нефтяных углеводов, является активность дегидрогеназы. Внесение нефти и нефтепродуктов оказало ингибирующее влияние на активность дегидрогеназы в начале эксперимента. В дальнейшем активность процессов анаэробного дегидрогенирования возрастала, видимо, в результате адаптации микробного сообщества к экстремальным условиям и началом процессов самоочищения почвы (рис. 9).

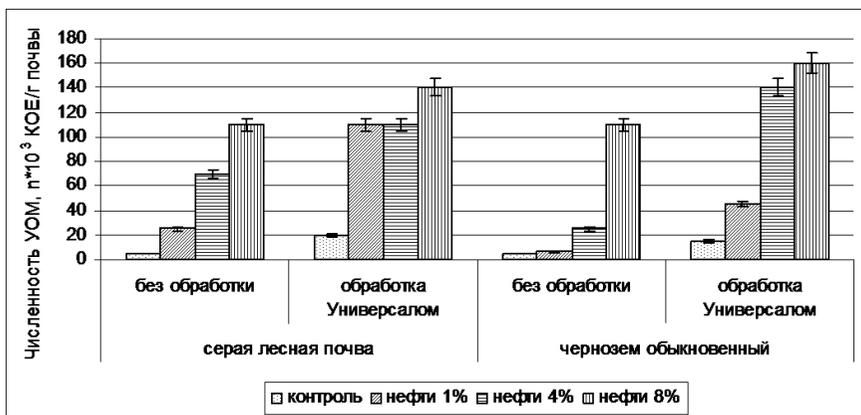
Применение Универсала не оказало явного стимулирующего влияния на дегидрогеназную активность серой лесной почвы, загрязненной нефтью.

Таблица 2

**Обилие микромицетов при биоремедиации серой лесной почвы,  
загрязненной нефтью (полевой опыт)**

Виды микромицетов	Обилие, %					
	кон- троль	контроль +У	6,4% нефти	6,4% нефти+У	10%неф ти	10% +У
<i>Alternaria tenuis-</i> <i>sima</i> (Kunze) Wiltshire	-	-	-	-	0,84	2,44
* <i>Aspergillus fu-</i> <i>migatus</i> Fresen.	-	6,52	-	4,0	-	3,05
* <i>A. niger</i> van Tiegh.	5,19	4,35	30,56	1,33	-	1,83
* <i>Penicillium</i> <i>canescens</i> Sopp	-	-	8,33	48	5,49	4,88
* <i>P. citrinum</i> Thom	1,29	-	-	12	-	1,22
* <i>P. chrysogenum</i> var. <i>chrysogenum</i> Thom	-	-	-	-	4,64	-
<i>P. coeruleoviride</i> G. Sm.	1,29	-	-	-	-	1,22
<i>P. commune</i> Thom	6,49	-	-	-	-	-
<i>P. decumbens</i> Thom	9,09	-	8,33	6,67	4,22	4,27
<i>P. glauco-</i> <i>cinerascens</i> Cha- lab	-	-	-	-	14,35	67,6 8
<i>P. griseoroseum</i> Dierckx	2,59	19,57	-	-	-	-
* <i>P. lanosum</i> Westling	45,45	56,52	19,44	9,33	2,5	-
* <i>P. madriti</i> G. Sm.	-	-	-	-	62,87	-
* <i>P. raperi</i> G. Sm.	5,19	-	11,11	1,33	-	-
* <i>Trichoderma</i> <i>viride</i> Pers.	-	-	-	-	1,69	1,22
<i>Micelia sterilia</i> (white)	-	2,17	-	16,0	0,84	2,44

Примечание: У - Универсал; « - » - вид не обнаружен; \* - фитотоксичный вид



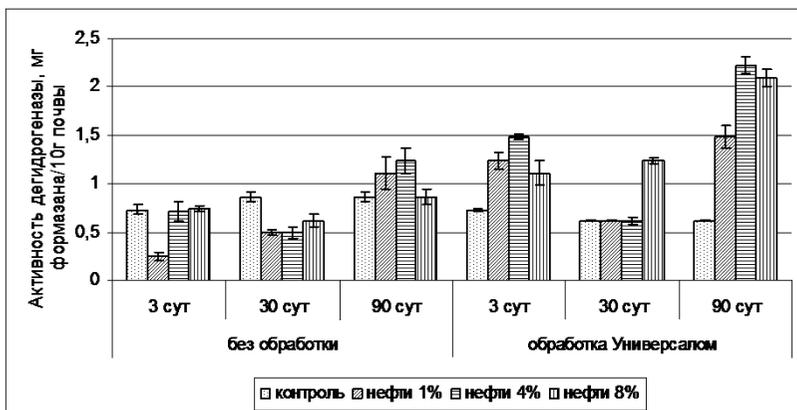
**Рис. 8.** Динамика численности углеводородокисляющих микроорганизмов в нефтязагрязненной и рекультивируемой Универсалом серой лесной почве и черноземе обыкновенном (90 суток)

При обработке биопрепаратом нефтязагрязненного чернозема обыкновенного отмечалось значительное возрастание активности дегидрогеназы в соответствии с увеличением концентрации поллютанта (рис. 9). Этот факт, возможно, объясняется тем, что черноземы обладают большим потенциалом биологической активности, чем серая лесная почва умеренной полосы.

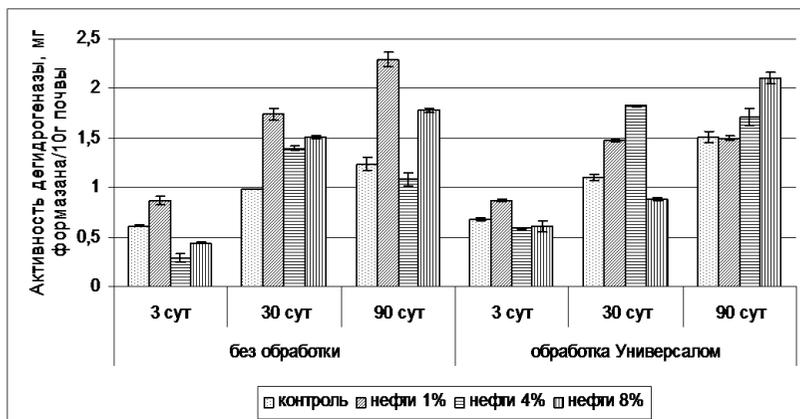
Таблица 3

**Деградация углеводородов в загрязненной серой лесной почве при рекультивации различными биопрепаратами (% , 90 суток)**

Концентрация нефти, %	Без обработки	Белвита-мил	УМД	Азолен	Елена	Ленойл	Универсал
1	67	81	83	79	77	93	90
4	21,8	52,5	50	43,5	47,3	64,3	69,7
8	22	63,7	61,3	46,3	32,5	66,6	68



А



Б

Рис. 9. Динамика дегидрогеназной активности чернозема обыкновенного (А) и серой лесной почвы (Б), загрязненных нефтью

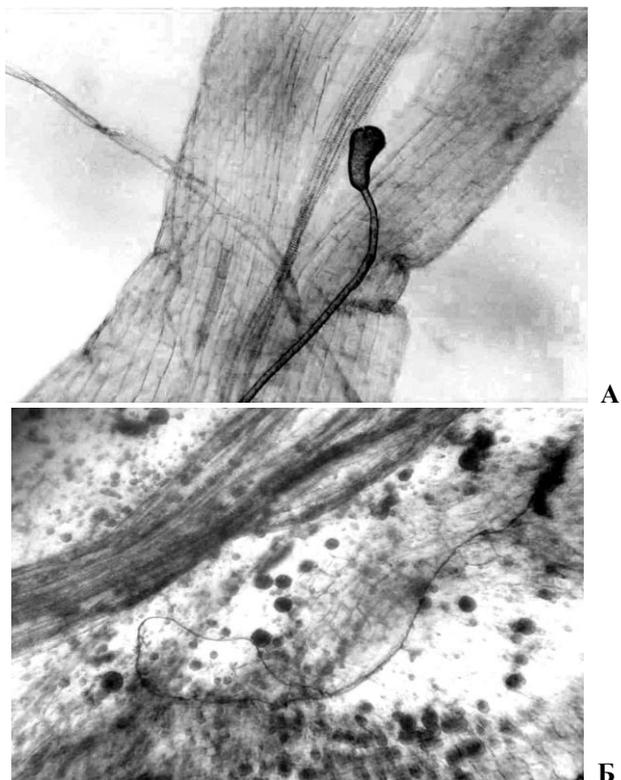
Применение Универсала и Ленойла способствовало максимальной деградации углеводов (табл. 3).

### Глава 6. Фиторемедиация нефтезагрязненной почвы с использованием *Archangelica officinalis* и *Tagetes erecta*

Технологии фиторемедиации более эффективны по сравнению с традиционными инженерными технологиями на стадии доочистки загрязненных почв. При совершенствовании этого метода основное внимание уделяется отбору растений, способных трансформировать совместно с симбиотиче-

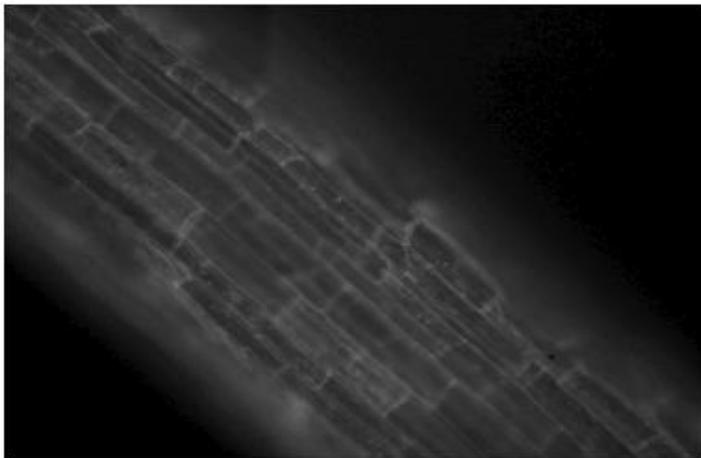
скими микроорганизмами токсичную часть поллютантов, переводя их в менее подвижную и активную форму. Перспективными для внедрения в практику биоремедиации, с нашей точки зрения, являются дягиль лекарственный *Archangelica officinalis* (syn. *A. archangelica*) и бархатцы прямостоячие (*Tagetes erecta* L.).

Оценка воздействия на растения нефти и нефтепродуктов показала, что у них изменялся ряд морфологических и физиологических характеристик. Влияние минимальной концентрации нефти (1%) незначительно отразилось на морфологических параметрах дягиля и бархатцев. В ходе микроскопических исследований корней дягиля были обнаружены бурые включения, которые, возможно являются компонентами нефти, поступившими в корневую систему в результате процесса фитоэкстракции (рис.10).

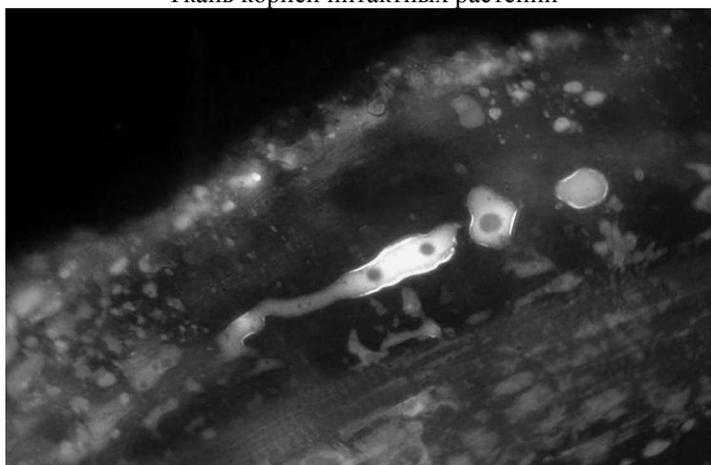


**Рис. 10. Влияние нефтяного загрязнения почвы на корни дягиля (А – контроль, Б – нефтяное загрязнение) (400<sup>х</sup>)**

Изучение препаратов корешков интактного и подверженного воздействию нефти растения показало, что при воздействии этого поллютанта активируются процессы дегликозилирования фенолокислот, приводящие к накоплению в клетках флуоресцирующих кумаринов, при этом обнаруживалась яркая флуоресценция (рис. 11). Кумарины в норме не присутствуют в клетках растений, их появление свидетельствует о деструктивных процессах в клетках.



Ткань корней интактных растений



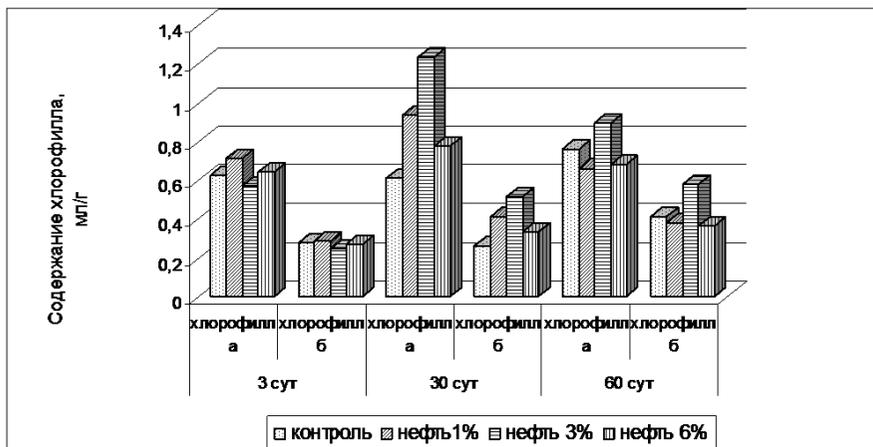
Ткань корней дягиля под действием нефти

**Рис. 11. Препарат корешков растений дягиля при 6%-ном нефтяном загрязнении через 30 суток воздействия (400<sup>х</sup>)**

Как известно, хлорофилл, находящийся в фотосинтетических мембранах, служит своего рода детектором состояния клеток растений. Через 30 суток культивирования дягиля на нефтезагрязненной почве отмечено угнетение фотосинтеза в варианте с 1%-ым загрязнением. Максимальное содержание хлорофиллов на протяжении всего опыта было отмечено при воздействии нефти в концентрации 3%, в первую очередь это коснулось хлорофилла *б*, более устойчивого к действию стрессоров (рис. 12). Аналогичные данные были получены при оценке влияния нефти и нефтепродуктов на фотосинтетическую систему бархатцев: на долю хлорофилла *б* приходилось 38,7% при 6%-ном загрязнении, в сравнении с 27,9% – при 3%-ном.

Оценка содержания бенз(а)пирена в тканях дягиля и бархатцев показала, что с ростом концентрации нефти наблюдалось увеличение содержания БП в растительной массе бархатцев и дягиля. Полученные данные свидетельствуют о способности бархатцев и дягиля к гипераккумуляции ПАУ, причем дягиль обладает более высоким потенциалом за счет большей биомассы растения (табл. 4).

Под посевами дягиля и бархатцев уменьшалось содержание остаточных углеводов. Отмечено, что под посевом дягиля произошла деградация около 40% углеводов при начальной концентрации загрязнителя в почве 1-3% и 20% – при 6% спустя 60 суток с начала эксперимента.



**Рис. 12. Изменения содержания хлорофилла а и б в листьях *Archangelica officinalis* на 3, 30 и 60 сутки после внесения нефти**

В почве под посевами дягиля и бархатцев наблюдалось стимулирование развития УОМ, увеличение численности микроорганизмов, использующих

минеральные и органические формы азота, целлюлозолитиков, азотфиксаторов, усиливалась ферментативная активность почвы (табл. 5).

Таблица 4

**Содержание бенз(а)пирена в растениях, выращенных на нефтезагрязненных почвах (нг/г)**

Растение	Концентрация нефти, %			
	0	1	3	6
Бархатцы	12,3±3,0	49,1±2,5	110,0±5,0	270,0±10,0
Дягиль	28±1,3	66,2±3,3	150,2±6,8	670±33,0

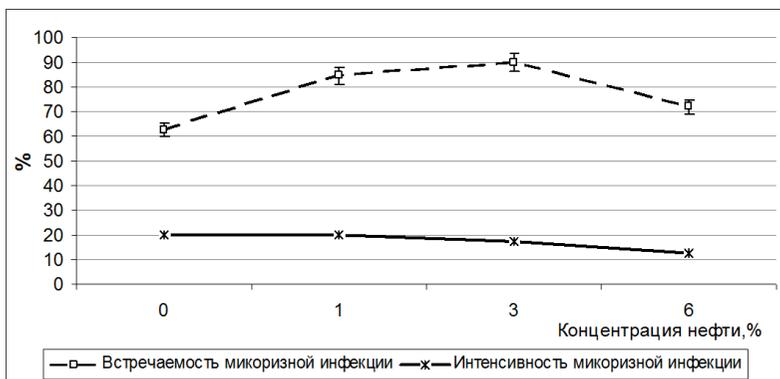
Таблица 5

**Влияние нефтяного загрязнения на некоторые группы микроорганизмов ризосферы дягиля и бархатцев**

Группы микроорганизмов (КОЕ/г почвы)	Концентрация нефти, %	Дягиль		Бархатцы	
		30 суток	60 суток	30 суток	60 суток
Микроорганизмы, на КАА, $\times 10^5$	<b>0</b>	65,0±9,7	116,7±6,3	54,2±2,0	53,3±4,0
	<b>1</b>	91,7±3,5	237,5±14,7	44,2±2,0	95,7±5,5
	<b>3</b>	73,0±3,2	241,7±16,5	27,0±0,75	172,5±12,0
	<b>6</b>	201±24,7	217,8±5,3	99,0±3,5	144,7±9,0
Азотфиксаторы, $\times 10^5$	<b>0</b>	41,7±8,5	64,0±3,5	19,0±0,75	14,7±0,5
	<b>1</b>	57,5±14,8	155,5±14,6	11,8±0,5	6,3±0,5
	<b>3</b>	96,0±7,1	182±9,2	6,3±0,25	7,75±0,25
	<b>6</b>	27,5±3,7	66,5±3,75	11,5±0,75	12,0±0,75
Целлюлозолитики, $\times 10^4$	<b>0</b>	13,75±0,45	21,7±0,97	11,0±0,9	13,1±1,0
	<b>1</b>	10,0±0,75	20,7±0,7	4,3±0,1	12,5±0,7
	<b>3</b>	8,1±0,52	5,75±0,32	6,5±0,2	7,9±0,5
	<b>6</b>	4,37±0,22	5,0±0,2	2,75±0,1	7,1±0,2
УОМ, $\times 10^3$	<b>0</b>	4,5±0,23	4,5±0,23	3,5±0,14	4,0±1,18
	<b>1</b>	16,5±0,82	75,0±3,7	20,0±0,82	45,0±2,3
	<b>3</b>	20,0±0,09	140,0±7,05	16,5±1,2	70,0±3,6
	<b>6</b>	45,0±2,25	160,0±8,5	25,0±1,2	110±5,5

Микориза – широко распространенная форма микробно-растительного симбиоза, способствующая выживанию растений при неблагоприятных условиях окружающей среды (Селиванов, 1981; Широких, 2008). В корнях дягиля лекарственного было выявлено наличие везикулярно-арбускулярной

микоризы. Исследования показали, что встречаемость микоризной инфекции в интактных растениях дягиля составляла 62,6%, интенсивность микоризации – 19,8%. Нефтяное загрязнение стимулировало развитие микоризы в корнях дягиля. В почве с содержанием нефти до 3% встречаемость микоризной инфекции возрастала, при дальнейшем увеличении концентрации поллютанта отмечалось снижение этого показателя (рис. 13). Интенсивность



**Рис. 13. Встречаемость микоризной инфекции и ее интенсивность в корневой системе дягиля лекарственного при загрязнении нефтью**

микоризной инфекции при 1%-ном загрязнении нефтью была выше, чем в интактном растении. Далее наблюдалась регрессирующая динамика, степень ингибирующего влияния нефтяных углеводородов составила 61% от контрольного показателя при максимальной концентрации поллютанта.

## ВЫВОДЫ

1. Проведена оценка эффективности применения биопрепаратов разнонаправленного действия и растений для ремедиации почв, загрязненных нефтью. Показано, что исследованные препараты при рекультивации серой лесной почвы по степени снижения содержания остаточных углеводородов располагаются в ряду Универсал→ Ленойл→ Белвитамил→ УМД→ Азолен→ Елена. Снижение фитотоксичности почвы при биоремедиации происходило в ряду Ленойл→ Азолен→ Елена→ Универсал→ Белвитамил→ УМД.
2. Выявлено, что применение УМД стимулировало увеличение численности УОМ (в 3-10 раз), целлюлозоразлагающих микроорганизмов (в 10-25 раз), микроорганизмов цикла азота (в 1,5-10 раз). Внесение УМД привело к перестройке комплекса микромицетов нефтезагрязнен-

ной серой лесной почвы, способствующей усилению ее фитотоксичности.

3. Показано, что использование Белвитамила стимулировало рост численности УОМ, активность каталазы в большей степени, чем Азолен и Елена. Внесение Азолена и Елены приводило к уменьшению доли фитотоксичных видов в составе комплекса микромицетов нефтезагрязненной серой лесной почвы.
4. Установлено, что Универсал и Ленойл способствуют восстановлению микробиоценоза нефтезагрязненной серой лесной почвы, стимулируют активность ферментов. Показано, что биопрепарат Универсал может быть использован для биоремедиации серой лесной почвы и чернозема обыкновенного, загрязненных нефтью.
5. Показано, что дягиль лекарственный и бархатцы прямостоячие являются перспективными растениями для фиторемедиации нефтезагрязненных почв. Установлено, что корневая система и фотосинтетический аппарат дягиля и бархатцев устойчивы к воздействию нефтяных углеводородов. В ризосфере растений увеличивалась численность УОМ, усиливалась ферментативная активность почвы. Загрязнение нефтью (3%) стимулировало микоризную инфекцию на корнях дягиля лекарственного. Посевы дягиля и бархатцев способствовали снижению содержания нефти на 40% - 55%. Показано, что данные растения способны к гипераккумуляции бенз(а)пирена.

#### **Список основных работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Киреева Н.А., Водопьянов В.В., Рафикова Г.Ф., Кабиров Т.Р., **Григориади А.С.** Мониторинг токсичности нефтезагрязненных почв по микробиологическим показателям // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2007. – № 75. – С. 158-161.
2. Киреева Н.А., Онегова Т.С., **Григориади А.С.** Характеристика Белвитамила, используемого для рекультивации нефтезагрязненных природных объектов. // Вестник Башкирского университета. – 2008. – Т. 13, №2. – С. 279-281.
3. Киреева Н.А., Шамаева А.А., **Григориади А.С.**, Новоселова Е.И. Изучение возможности утилизации отходов деревопереработки для биологической очистки и детоксикации нефтешламов // Теоретическая и прикладная экология. – 2008. – №3. – С. 81-85.
4. Киреева Н.А., Бакаева М.Д., Климина И.П., **Григориади А.С.**, Рафикова Г.Ф. Накопление оппортунистических грибов во внешней среде города с развитой нефтеперерабатывающей промышленностью. // Иммунопатология, Аллергология, Инфектология. – 2009. – №2. – С. 48-49.

5. **Григориади А.С.**, Новоселова Е.И., Киреева Н.А. Фиторемедиация как способ очистки и повышения биологической активности нефтезагрязненных почв // *Аграрная Россия*. – 2009. – Спецвыпуск. – С. 30-31.
6. Киреева Н.А., Новоселова Е.И., Шамаева А.А., **Григориади А.С.** Биологическая активность чернозема выщелоченного, загрязненного продуктами сгорания попутного нефтяного газа, и возможности ее восстановления при фиторемедиации // *Почвоведение*. – 2009. – №4. – С. 498-503.
7. Баширова Р.М., **Григориади А.С.**, Киреева Н.А., Юмагужин М.С., Тимербаева Г.Р., Долотовская Л.З. Влияние загрязнения почвы нефтью на некоторые физиологические показатели дягиля лекарственного *Archangelica officinalis* // *Аграрная Россия*. – 2009. – №2. – С. 42-44.
8. Киреева Н.А., Рафикова Г.Ф., **Григориади А.С.**, Галимзянова Н.Ф., Логинов О.Н. Влияние биопрепарата Азолен на комплекс микромицетов нефтезагрязненной серой лесной почвы // *Микология и фитопатология*. – 2009. – №2. – С. 142-150.
9. Киреева Н.А., Новоселова Е.И., **Григориади А.С.** Влияние загрязнения почв нефтью на некоторые физиологические показатели растений и ризосферную микробиоту // *Агробиология*. – 2009. – №7. – С. 71-80.
10. Киреева Н.А., Новоселова Е.И., Ерохина Н.И., **Григориади А.С.** Накопление бенз(а)пирена в системе «почва-растение» при загрязнении нефтью и внесении активного ила // *Вестник Оренбургского государственного университета*. – 2009. – №6. – С. 579-581.
11. Водопьянов В.В., Киреева Н.А., **Григориади А.С.**, Якупова А.Б. Влияние нефтяного загрязнения почвы на ризосферную микробиоту и моделирование процессов биодegradации // *Вестник Оренбургского государственного университета*. – 2009. – №6. – С. 545-547.
12. Киреева Н.А., Климина И.П., **Григориади А.С.**, Якупова А.Б. Микромицеты как биодеструкторы углеводородов и потенциальные возбудители микозов в нефтезагрязненных регионах // *Проблемы медицинской микологии*. – 2009. – №2. – С. 79.
13. Киреева Н.А., Дубовик И.Е., **Григориади А.С.**, Кабиров Т.Р. Оценка фитотоксичности нарушенных почв по показателям альгомикологического комплекса // *Агробиология*. – 2009. – №11. – С. 43-49.
14. Киреева Н.А., **Григориади А.С.**, Щемелинина Т.Н., Гареева А.Р., Якупова А.Б. Оценка эффективности биоремедиации нефтезагрязненных почв с использованием бакпрепарата Универсал // *Вестник Оренбургского государственного университета*. – 2009. – Октябрь. – Спецвыпуск. – С. 454-455.
15. Водопьянов В.В., Киреева Н.А., **Григориади А.С.**, Баширова Р.М., Гареева А.Р., Шпилева У.Ю. Мониторинг растений-фиторемедиантов

- нефтезагрязненных почв по аллометрическим и физиолого-биохимическим показателям роста // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2009. – Октябрь. – Спецвыпуск. – С. 543-544.
16. Киреева Н.А., Шамаева А.А., **Григориади А.С.**, Водопьянов В.В., Новоселова Е.И. Биоремедиация и детоксикация нефтешлама // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. – 2009. – №3. – С. 43-47.
  17. Киреева Н.А., Новоселова Е.И., **Григориади А.С.** Оценка нарушенности лесных почв, загрязненных нефтепродуктами по показателям ферментативной активности // Аграрная Россия – 2009. – Спецвыпуск. Материалы Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы дендрозкологии и адаптации растений». – С. 183-184.
  18. Киреева Н.А., **Григориади А.С.**, Хайбуллина Е.Ф. Ассоциации углеводородокисляющих микроорганизмов для биоремедиации нефтезагрязненных почв // Вестник Башкирского университета. – 2009. – Т. 14, №2. – С. 391-394.
  19. Kireeva N.A., Vodopyanov V.V., Shamaeva A.A., **Grigoriadi A.S.** Dynamics of phytoremediation the soils, contaminated with oil // Soil remediation / ed. L.Aachen , P.Eichmann. N-Y.: Nova Science Publishers, 2009. – P. 369-377.
  20. Киреева Н.А., Рафикова Г.Ф., Галимзянова Н.Ф., Логинов О.Н., **Григориади А.С.**, Якупова А.Б. Влияние биофунгицида Елена на комплексы микромицетов нефтезагрязненных почв различных типов при биоремедиации // Микология и фитопатология. – 2010. – Т. 44, Вып. 1. – С. 53-62.
  21. Киреева Н.А., Водопьянов В.В., **Григориади А.С.**, Новоселова Е.И., Багаутдинова Г.Г., Гареева А.Р., Лобастова Е.Ю. Эффективность применения биопрепаратов для восстановления плодородия техногенно-загрязненных почв // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2010. – № 1(4). – С. 1023-1026.
  22. Киреева Н.А., **Григориади А.С.**, Климина И.П. Микромицеты - биодеструкторы нефтяных углеводородов в загрязненных и рекультивируемых почвах // Проблемы медицинской микологии. – 2010. – №2. – С. 97.
  23. Киреева Н.А., **Григориади А.С.**, Гареева А.Р. Влияние загрязнения нефтяными углеводородами на ризосферную микробиоту растений-фиторемедиантов // Сборник матер. III Междунар. научной конф. «Современные проблемы загрязнения почв» - Москва, 24-28 мая, 2010г. – Москва, 2010. – С. 222-225.
  24. Киреева Н.А., Водопьянов В.В., **Григориади А.С.**, Гареева А.Р., Атепаева О.С. Мониторинг биоремедиации нефтезагрязненных почв по показателям биологической активности // Матер. докладов Междунар. научно-практ. конф. «Экологическое нормирование, сертификация и

паспортизация почв как научная основа рационального землепользования». – Москва, 30 сентября-1 октября 2010г. – Москва, 2010. – С. 89-91.