

На правах рукописи

КАБИРОВ ТАГИР РУСТЭМОВИЧ

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МНОГОУРОВНЕВОЙ СИСТЕМЫ
ИНДИКАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВ
ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДОВ
БИОРЕКУЛЬТИВАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ
ТЕРРИТОРИЙ**

03.00.16 – Экология

03.00.23 – Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Уфа - 2009

Работа выполнена на кафедре биохимии и биотехнологии факультета биологии ГОУ ВПО «Башкирский Государственный Университет».

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор
Киреева Наиля Ахняфовна

доктор биологических наук, профессор
Дубовик Ирина Евгеньевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Хазиев Фангат Хаматович

доктор биологических наук, профессор
Домрачева Людмила Ивановна

Ведущая организация: Институт биологии Коми НЦ УрОРАН

Защита диссертации состоится 20 февраля 2009 г. в 14⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета ДМ 002.136.01 при Институте биологии Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054, г. Уфа, Проспект Октября, 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 «___» января 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Р.В. Уразгильдин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В современном обществе, зависящем от углеводородных энергоресурсов, одним из наиболее масштабных техногенных загрязнителей является нефть. Попадая в почву, нефть оказывает как прямое, так и опосредованное влияние на биологическую активность почв.

Биотесты, используемые для оценки токсичности техногенно нарушенных почв обычно состоят из одного (Udo, Payemi, 1975; Вассер и др., 1989; Винник, 2005) или группы таксономически близких видов (Артемьева, Штина, 1985; Bierkens et al., 1998; Juvonen et al., 2000; Домрачева, 2005; Ашихмина и др., 2006; Капелькина и др., 2004, 2007; Терехова, 2007). Результаты таких тестов могут показывать значительную степень корреляции с величиной оцениваемого фактора (обычно концентрацией загрязнителя), однако не могут в полной мере отражать интегральную токсичность среды.

В связи с этим, актуальным является использование таких диагностических систем, которые позволяли бы оценить общую биологическую активность почвы по результатам совокупной реакции каждого уровня организации живой материи на стрессовый фактор.

Использование микробных препаратов является одним из наиболее экономически и экологически целесообразных методов рекультивации нефтезагрязненных почв (Алехин и др., 1998; Габбасова, 2001; Лизунов, 2002; Šašek et al., 2003; van der Gast et al., 2003). Однако при искусственном внедрении микробных комплексов в почвы с таким многокомпонентным загрязнителем как нефть, в ходе рекультивации всегда существует вероятность образования персистентных и токсичных соединений (Плешакова и др., 2007). Для испытания экологической безопасности микробных препаратов и для оценки эффективности биоаугментации необходим обобщающий критерий, который позволил бы определять

функциональное состояние почвы и ее токсичность. В качестве такого критерия может быть использован уровень биологической активности почвы.

Цель и задачи исследования. Целью исследований являлась разработка многоуровневой тест-системы для измерения биологической активности нефтезагрязненных и рекультивируемых почв, а также поиск обобщенного критерия для оценки эффективности биоаугментации с использованием микробных препаратов Азолен, Белвитамил, Ленойл.

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Изучить индивидуальные реакции каждой группы тест-объектов на внесение в почву различных концентраций нефти и рекультивацию.
2. Создать многоуровневую тест-систему, используя наиболее диагностически значимые реакции изученных тест-объектов.
3. Разработать обобщенный коэффициент биологической активности, позволяющий сравнивать почвы с разной степенью антропогенной нагрузки.
4. Оценить эффективность рекультивационных мероприятий в нефтезагрязненных почвах с помощью разработанного коэффициента.

Научная новизна. Впервые в многоуровневую систему биотестирования нефтезагрязненных почв включены показатели развития цианобактериально-водорослевых ценозов (ЦВЦ). Проведены тесты по наличию у микробных препаратов альготоксических свойств.

Предложен коэффициент биологической активности почв (БАП), включающий в себя уровень активности ферментов, показатели численности гетеротрофных и углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ), микроскопических грибов, водорослей и цианобактерий, степень развития высших растений и педобионтов в исследуемой почве. Получены данные об использовании коэффициента БАП для оценки эффективности рекультивационных мероприятий.

Практическая значимость работы. Разработанная многокомпонентная тест-система позволяет получить надежные результаты

при оценке характера и степени нефтяного загрязнения почвы. Ее можно включить как составную часть в систему экологического мониторинга. Результаты исследований могут быть использованы в курсах лекций «Охрана природы», «Промышленная экология», «Экология и рациональное природопользование». Предложенный коэффициент БАП позволяет сравнивать функциональное состояние почв на разных стадиях биодegradации нефти и может служить дополнительным аргументом при выборе того или иного метода рекультивации.

Апробация. Основные положения и результаты диссертации были представлены: на **Международных конференциях и конгрессах** «Ломоносов-2004» (Москва, 2004), «Мікробні біотехнології» (Одесса, 2006), «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» (Казань, 2006), «Здоровье и безопасность жизнедеятельности молодежи: проблемы и пути решения» (Уфа, 2006), «Changing Soils in a Changing World: the Soils of Tomorrow» (Palermo, 2007), «Биологическая рекультивация и мониторинг нарушенных земель» (Екатеринбург, 2007), «Экология и биология почв» (Ростов-на-Дону, 2007), «Мировые инновационные технологии восстановления нарушенных и загрязненных земель техногенных регионов» (Кемерово, 2008), на **Всероссийских конференциях и съездах** «VI, VII Докучаевские молодежные чтения» (Санкт-Петербург, 2003, 2004), «Проблемы геоэкологии Южного Урала» (Оренбург, 2005), «Биотехнология-2005» (Пушино, 2005), «Биология-наука XXI века» (Пушино, 2006), «Техносферная безопасность, надежность, качество, энерго- и ресурсосбережение» (Ростов-на-Дону, 2006), «Альгологические исследования: современное состояние и перспективы на будущее» (Уфа, 2006), «Актуальные проблемы регионального экологического мониторинга» (Киров, 2006, 2007), «Фундаментальные достижения в почвоведении, экологии, сельском хозяйстве на пути к инновациям» (Москва, 2008), «Проблемы экологии в современном мире» (Тамбов, 2007, 2008).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 27 печатных работ, в том числе 3 статьи в журналах списка ВАК.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, списка литературы (336 наименований, в том числе 124 на иностранных языках) и приложения. Текст диссертации изложен на 169 страницах, рисунков 20, таблиц 13.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность и благодарность научным руководителям: доктору биологических наук, профессору Н.А. Киреевой и доктору биологических наук, профессору И.Е. Дубовик, за неоценимую помощь, оказанную при выполнении данной работы, профессору О.Н. Логинову, за предоставленные биопрепараты, а также всем коллегам и соавторам публикаций.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования нефтезагрязненных и рекультивируемых почв проводились с 2002 по 2008 год на базе агробиостанции БГПУ им. Акмуллы и в лаборатории микробиологии кафедры биохимии и биотехнологии БашГУ.

В лабораторных и полевых условиях изучалось изменение биологической активности почв (серая лесная, выщелоченный чернозем), загрязненных нефтью, и почв на разных стадиях рекультивации микробными препаратами. При биоремедиации были использованы: 1) биопрепарат нефтедеструктор «Ленойл», основанный на природном консорциуме микроорганизмов *Bacillus brevis* и *Arthrobacter species*, полученный в институте биологии УНЦ РАН (г.Уфа), Пат. РФ № 2232806; 2) биоудобрение комплексного действия «Азолен» на основе *Azotobacter vinelandii* ИБ 4, полученный в институте биологии УНЦ РАН (г.Уфа), Пат. РФ № 2224791. Оба препарата любезно представлены проф. О.Н. Логиновым; 3) биопрепарат Белвитамил, Пат. РФ № 2198748 - активный ил целлюлозо-бумажного производства, представляющий собой готовую смесь промышленной

ассоциации аэробно-анаэробных микроорганизмов, содержащий углеводородокисляющие микроорганизмы родов *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Candida*, *Desulfovibrio*, *Pseudomonas* (всего 10 видов).

Оценка биологической активности почв осуществлялась по показателям ферментативной активности, численности гетеротрофных и углеводородокисляющих микроорганизмов, качественному составу и количественным характеристикам микроскопических грибов, водорослей и цианобактерий, реакциям высших растений и почвенных беспозвоночных.

Активность каталазы определялась газометрическим методом, хитиназы – колориметрическим методом с п-диметиламинобензальдегидом, липазы – титриметрическим методом, целлюлазы – аппликационным методом (Хазиев, 2005). Определение численности гетеротрофных, углеводородокисляющих микроорганизмов и микромицетов проводили общепринятыми методами посева почвенной суспензии (Методы...,1991), а видового состава микромицетов по соответствующим определителям. При выявлении видового состава цианобактерий и водорослей использовали чашечные культуры со стеклами обрастания (Штина, Зенова, 1990; Кузяхметов, Дубовик, 2001). Оценку обилия видов водорослей проводили по 15-ти балльной системе (Кабиров, Шилова, 1990). Количественный учет почвенных водорослей проводили методом культурального подсчета (Вассер и др., 1989). Биомассу водорослей вычисляли объемно-расчетным методом (Кузяхметов, Дубовик, 2001). Фитотоксичность почв определяли с помощью редиса (*Raphanus sativus*, сорт Красный с белым кончиком). Степень зоотоксичности оценивали на коллемболах видов *Folsomia candida* и *Onychiurus stachianus* (Ханисламова, 1995). Содержание остаточных нефтепродуктов в почве определяли горячей экстракцией метиленхлоридом (McGill, Rowell, 1980). По результатам тестирования рассчитывали индекс токсичности (ИТФ), который вычисляли по формуле (Кабиров, 1995) $ИТФ = ТФ_0 / ТФ_к$, где ИТФ – индекс токсичности оцениваемого фактора, ТФ₀ –

значение регистрируемой тест-функции в опыте; ТФк - значение регистрируемой тест-функции в контроле.

Статистическая обработка данных осуществлялась с применением пакетов прикладных программ Statistica 6.0 и Microsoft Excel 2007. При статистической обработке данных использовали t-тест, расчет доверительных интервалов средних арифметических значений и коэффициент корреляции.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение параметров биологической активности почв под влиянием нефтяного загрязнения

Биологическая активность нефтезагрязненных почв находилась в подавленном состоянии за счет угнетающего действия нефти на составляющие ее компоненты. Нефтяное загрязнение оказывало значительное влияние на ферментативную активность почв. Активность каталазы резко снижалась при загрязнении почвы нефтью, причем степень угнетения активности фермента напрямую зависела от концентрации поллютанта. В отличие от каталазы, загрязнение нефтью в малых и средних концентрациях, после периода первоначального спада, оказывало стимулирующее действие на активность почвенной липазы. Активность хитиназы и целлюлазы первоначально снижалась под действием нефти и постепенно восстанавливалась с увеличением сроков инкубации.

Под влиянием нефтяного загрязнения изменялись микробиологические параметры почв. Внесение нефти способствовало бурному росту численности УОМ (табл.1). Гетеротрофная часть микробного комплекса нефтезагрязненной почвы, которая первоначально находилась в угнетенном состоянии, постепенно восстанавливалась со временем (табл.1).

В почве, загрязненной нефтью в концентрации до 8% наблюдалось увеличение видового разнообразия микроскопических грибов, расширялся

список выделенных из загрязненных почв видов, по-видимому, участвующих в утилизации нефти или просто устойчивых к данному типу загрязнения. В отличие от контрольных вариантов, где представители родов *Aspergillus* и *Penicillium* являлись типичными редкими наравне с представителями других родов (*Trichoderma*, *Mucor*, *Scopulariopsis*), в сильно загрязненной почве возрастала доля видов, принадлежащих этим двум родам, и они переходили в разряд типичных частых и доминирующих.

Загрязнение нефтью в концентрации 1% уже достаточно сильно сказывалась на количественных показателях всхожести, скорости прорастания и энергии прорастания семян. В почвах с загрязнением 8% гибель семян достигала практически 100%.

Многочисленные опыты, проведенные с использованием двух видов коллембол (*Folsomia candida*, *Onychiurus stachianus*) по всевозможным сценариям развития стрессовой ситуации, показали, что эти педобионты чутко реагировали как на прямое, так и на опосредованное действие нефтяного загрязнения и быстрее всего погибали при «свежем» загрязнении.

Фоновая (ненарушенная) почва характеризовалась полночленностью цианобактериально-водорослевого ценоза (ЦВЦ) с наличием всех таксономических групп: цианобактерии (*Cyanophyta*, *Cyanobacteria*) и зеленые (*Chlorophyta*), желтозеленые (*Xanthophyta*), диатомовые (*Bacillariophyta*) водоросли. Был идентифицирован 31 вид и внутривидовой таксон цианобактерий и водорослей, относящийся к 6 классам (*Chroococcophyceae*, *Hormogoniophyceae*, *Pennatophyceae*, *Xanthococcophyceae*, *Xanthotrichophyceae*, *Chlorophyceae*).

При загрязнении почвы нефтью в концентрациях 1 и 4% на 3 сут произошла унификация видового состава ЦВЦ. Так, в почвах с 1% нефти были выявлены виды цианобактерий, относящиеся к роду *Nostoc*: *Nostoc commune*, *Nostoc sp.*, *N. linckia*, *N. punctiforme*, а при 4%-ном загрязнении - *N. linckia*. Через 90 сут произошло восстановление видового разнообразия

цианобактерий и только виды *Leptolyngbya foveolarum*, *Gloeocapsa turgida* при 4%-ном загрязнении не обнаруживались. Это, вероятно, связано с тем, что цианобактерии способны усваивать углеводороды нефти и занимать открытые пространства с повышенным рН среды (Кабиров, Минибаев, 1982; Зимонина, 1998). Кроме того, виды рода *Nostoc* обладают высокой устойчивостью к поллютантам, их уникальные экологические свойства обусловлены способностью становиться эдификаторами ЦВЦ (Киреева и др., 2007; Кондакова, Домрачева, 2007). Среди зеленых водорослей наиболее устойчивым был вид *Chlorococcum infusionum*. В вариантах с концентрацией нефти (8%) наблюдалась массовая гибель водорослей. Были обнаружены лишь представители вида *Nostoc linckia*.

Оценка эффективности рекультивации нефтезагрязненных почв с использованием микробных препаратов

Были исследованы три способа биоаугментации с использованием микробных препаратов Ленойл, Азолен и Белвитамил. Эффективность восстановления почв, обработанных этими препаратами, оценивалась отдельно по каждому из изучаемых параметров и сравнивалась с аналогичными значениями фоновой почвы и почвы, загрязненной нефтью без обработки препаратом.

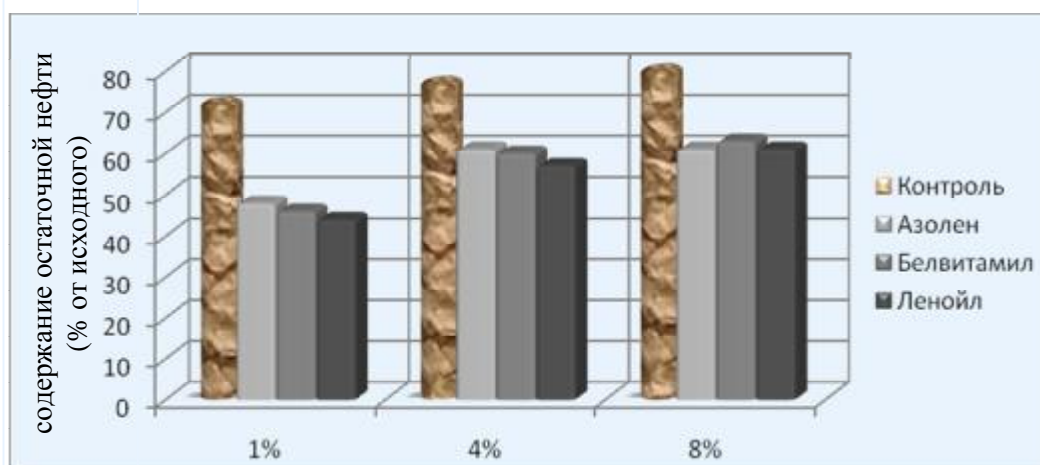


Рис. 1. Снижение содержания остаточных нефтепродуктов в почвах при использовании различных биопрепаратов (через 90 сут).

Исследуя изменения биологической активности почв в ходе рекультивации нефтяного загрязнения, мы сравнивали их с количественными данными содержания остаточных нефтепродуктов. Внесение препаратов способствовало значительному увеличению темпов деградации углеводородов (рис. 1). В почвах с биопрепаратами количество остаточных нефтепродуктов за 90 сут снижалось до 45-60% от исходного, в зависимости от первоначальной концентрации нефти.

Таблица 1

Численность гетеротрофных и углеводородокисляющих микроорганизмов в нефтезагрязненных и рекультивируемых почвах

Вариант	Гетеротрофные микроорганизмы, n* 10 ⁶ КОЕ / 1г почвы			УОМ, n* 10 ⁵ КОЕ / 1г почвы		
	3 сут	30 сут	90 сут	3 сут	30 сут	90 сут
К	7,94±0,40	8,95±0,45	12,59±0,63	1,26±0,06	1,78±0,09	2,19±0,11
К+1%	1,00±0,05	17,42±0,88	21,38±1,07	2,51±0,13	26,55±1,33	45,71±2,29
К+4%	0,50±0,03	13,84±0,69	16,59±0,83	1,99±0,10	43,65±2,18	109,65±5,48
К+8%	0,16±0,01	1,52±0,08	3,54±0,18	3,16±0,16	56,11±2,80	114,82±5,74
1%+Л	2,51±0,13	26,54±1,33	39,81±1,99	3,16±0,16	38,89±1,94	72,44±3,62
4%+Л	1,26±0,06	35,62±1,78	63,09±3,15	4,47±0,22	62,28±3,11	169,82±8,49
8%+Л	0,15±0,01	2,88±0,14	7,08±0,35	15,85±0,79	101,52±5,07	229,08±11,45
1%+А	15,49±0,77	18,71±0,94	23,44±1,17	2,19±0,11	38,05±1,90	69,65±3,48
4%+А	4,79±0,74	16,23±0,82	25,12±1,26	4,90±0,25	44,29±2,21	98,11±4,91
8%+А	0,37±0,02	7,01±0,35	9,55±0,44	22,39±1,12	42,40±2,12	114,54±5,72
1%+Б	1,55±0,08	2,23±0,11	4,88±0,24	7,24±0,36	62,84±3,14	76,46±3,82
4%+Б	0,95±0,02	4,38±0,22	8,13±0,41	20,89±1,04	123,10±6,16	144,67±7,23
8%+Б	0,21±0,01	6,66±0,33	10,79±0,54	26,30±1,32	146,25±7,31	164,56±8,22

Примечание: здесь и в послед. таблицах принята относительная погрешность измерений: d = ±5 %; здесь и далее: К – фоновая почва; А – азолен; Б - белвитамил; Л – ленойл

Все исследованные биопрепараты оказали положительное влияние на каталазную активность почв, рост численности гетеротрофных и

углеводородоокисляющих микроорганизмов (табл. 1). Стимулирующее действие препаратов на развитие гетеротрофных микроорганизмов связано, вероятнее всего, со снижением общей токсичности почвы с одновременным появлением дополнительных трофических ресурсов. УОМ, априори получающие стимул к развитию за счет появления углеводов, в опытах с внесением биопрепаратов проявляют еще более бурный рост, хотя в некоторых случаях наблюдался антагонизм аборигенной и инокулированной углеводородоокисляющей микробиоты (табл. 1).

Использование Ленойла для биоремедиации способствовало некоторому уменьшению численности микромицетов за счет интродукции консорциума углеводородоокисляющих бактерий, составляющих основу биопрепарата, что способствовало восстановлению соотношения бактерии - грибы. Применение биопрепарата Ленойл для очистки нефтезагрязненного чернозема также оказывало воздействие на видовой состав комплекса микромицетов. В варианте с низкой концентрацией нефти были выявлены микромицеты, не встречавшиеся в других образцах (*Penicillium sp.*, *P. humili*, *Trichoderma viride*). В образцах нефтезагрязненных почв с Белвитамилом, по сравнению с таковыми без биопрепарата, произошло значительное стимулирование некоторых видов микромицетов. Преимущество получили *A. fumigatus*, *A. restrictus*, *A. terreus*. Вид *T. viride* перешел из группы типичных редких в группу типичных частых.

Наиболее эффективным препаратом для снижения фитотоксичности в проведенном эксперименте стал Азолен, положительно отразившийся на регистрируемых показателях (всхожесть, скорость и энергия прорастания) в течение всего эксперимента во всех концентрациях. Такие результаты кажутся вполне закономерными, если принять во внимание что Азолен был исходно разработан как биоудобрение. Известно (Логинов и др., 2004), что микроорганизмы, входящие в его состав обладают способностью к фиксации

атмосферного азота, синтезу стимуляторов роста растений (цитокининов и ауксинов), а также проявляют антагонизм к фитопатогенным грибам.

Таблица 2

Влияние различных концентраций нефти и биоремедиации на зоотоксичность почв

Вариант	Выживаемость коллембол (%) в почвах с различными концентрациями нефти и биопрепаратами					
	<i>Folsomia candida</i>			<i>Onychiurus stachianus</i>		
	3 сут	30 сут	90 сут	3 сут	30 сут	90 сут
К	100+	100+	100+	100+	100+	100+
К+1%	50	70	90	40	70	100+
К+4%	0	30	65	30	60	85
К+8%	0	0	0	0	0	5
1%+Л	70	85	95+	90	95	100+
4%+Л	10	40	75	60	80	95
8%+Л	0	0	15	0	5	25
1%+А	45	55	65	40	70	90
4%+А	5	15	30	25	50	85
8%+А	0	0	10	0	0	15
1%+Б	65	85	90	65	85	90+
4%+Б	0	40	80	50	75	90
8%+Б	0	5	20	0	10	25

Примечание: знаком «+» обозначено появление потомства

Внесение биопрепаратов также значительно снижало зоотоксичность почв. Таблица 2 иллюстрирует влияние исследуемых биопрепаратов в динамике на зоотоксичность почв. Отметим, что коллемболы чутко реагировали уже на 1% внесенной нефти. На 3 сут выживало не более половины особей, терялась их способность к размножению. Наиболее эффективным препаратом в рамках данного эксперимента стал Ленойл (табл.2).

Использование различных биопрепаратов для рекультивации нефтезагрязненных почв оказывало неоднозначное влияние на видовое

разнообразии ЦВЦ как в фоновой, так и в загрязненной почве. Находясь в поверхностных слоях почвы, цианобактерии и водоросли быстро реагировали на внесение испытуемых веществ, показывая при этом неодинаковую реакцию различных групп на разные препараты.

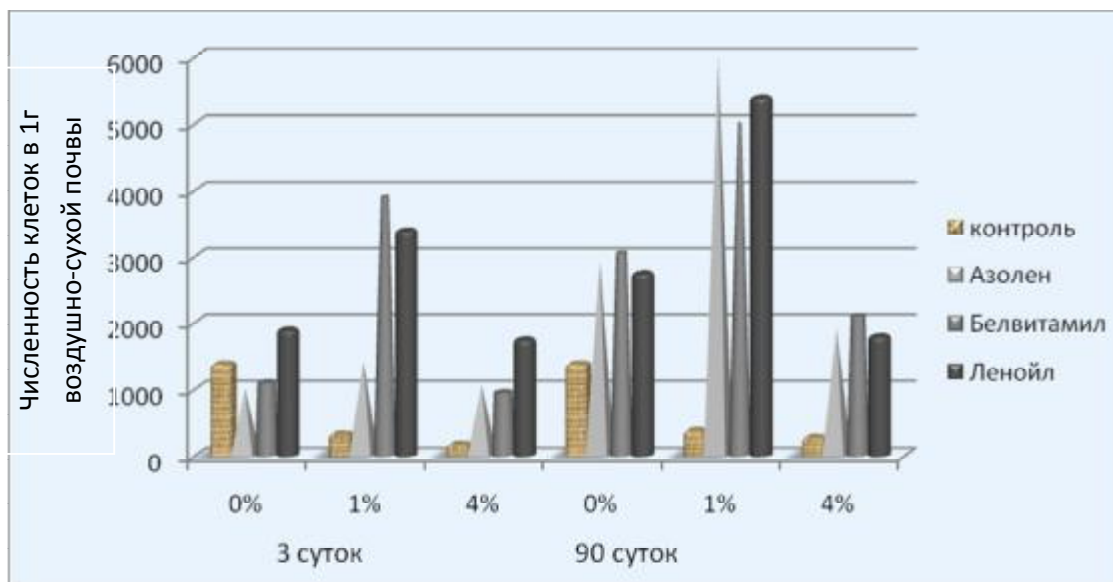


Рис. 2. Численность клеток почвенных водорослей и цианобактерий в нефтезагрязненной и рекультивируемой почве.

Через 3 сут при внесении в фоновую почву биопрепарата Азолен наблюдалось снижение видового разнообразия зеленых и диатомовых водорослей и цианобактерий. Белвитамил, внесенный в фоновую почву, через 3 сут оказался наиболее токсичным из всех биопрепаратов. Избирательный характер действия биопрепаратов проявился и в варианте с внесением Ленойла. В фоновой почве через 3 сут происходило незначительное обеднение видового состава ЦВЦ. Через 90 сут после начала эксперимента все чувствительные по отношению к препаратам виды водорослей и цианобактерий адаптировались, и по численности и биомассе превосходили эти показатели в фоновой почве (рис. 2).

Наибольшее разнообразие видов цианобактерий и водорослей было отмечено в загрязненной почве, обработанной Ленойлом (табл. 3). Под его действием наблюдалось снижение токсичности внесенной нефти. Применение Ленойла способствовало восстановлению видового

разнообразия водорослей и цианобактерий при 1%-ном загрязнении. При концентрации нефтепродуктов 4% виды *Botrydiopsis eriensis* и *Bumilleriopsis terricola*, относящиеся к желтозеленым, выпали из нефтезагрязненного ЦВЦ, и не проявляли себя в течение оставшегося периода.

Таблица 3

Изменение качественного состава (число видов) и количественных характеристик (баллы обилия) ЦВЦ в зависимости от сроков наблюдения и варианта эксперимента

Сроки отбора проб, сут	К	К+Л	1%	1%+Л	4%	4%+Л
Число видов						
30	13	9	8	7	0	0
90	15	15	10	15	0	0
180	19	19	16	19	3	9
Во все сроки наблюдения	26	24	22	23	3	9
Степень развития ЦВЦ (баллы)						
30	69	58	13	24	0	0
90	88	87	35	66	0	0
180	97	77	56	62	3	16

Рекультивация почвы, загрязненной нефтью в концентрации 8%, не привела к восстановлению видового разнообразия водорослей. В данных образцах почвы были обнаружены только представители цианобактерий, относящиеся к роду *Nostoc*. Очевидно, для восстановления видового состава водорослей необходима повторная обработка биопрепаратами или более длительное время для детоксикации поллютанта.

Коэффициент биологической активности почв

В качестве обобщающего показателя было предложено использовать коэффициент биологической активности почвы (БАП) = $(ИТФ_1 + ИТФ_2 +$

ИТФ₃ + ИТФ₄ + ИТФ₅ + ИТФ₆ + ИТФ₇)/7, где ИТФ₁ - индекс токсичности, рассчитанный по активности каталазы; ИТФ₂ – индекс токсичности для гетеротрофных микроорганизмов; ИТФ₃ – для углеводородокисляющих микроорганизмов; ИТФ₄ - для микроскопических грибов; ИТФ₅ - для почвенных водорослей; ИТФ₆ - для высших растений; ИТФ₇ - для почвенных беспозвоночных (коллембол). Регистрируемые тест-функции соответственно выражали: для ИТФ₁ - в мл О₂ за 120 сек, для ИТФ₂-ИТФ₅ – в lg численности, для ИТФ₆ в относительном удлинении проростков тест-растения, для ИТФ₇ регистрируемая тест-функция выражена в среднем % выживаемости двух видов. При величине БАП равной или больше 1 биологическая активность почвы сохраняется или возрастает. При БАП < 1 она снижается.

Таблица 4

Значения БАП в различных вариантах экспериментов (3 сут)

Варианты эксперимента	Тест - объекты							БАП
	Каталаза	Гетеротрофные микроорганизмы	УОМ	Микроскопические грибы	Почвенные водоросли	Высшие растения	Почвенных беспозвоночные	
К	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
К+1%	0,62	0,87	1,06	0,96	0,82	0,88	0,45	0,83
К+4%	0,24	0,83	1,04	0,95	0,74	0,53	0,30	0,67
К+8%	0,16	0,75	1,08	1,21	п	0,05	п	0,57
1% + Л	0,32	0,93	1,08	1,34	1,14	0,94	0,80	0,94
4% + Л	0,22	0,88	1,11	1,25	1,05	0,54	0,35	0,77
8% + Л	0,05	0,75	1,22	1,21	п	0,10	п	0,48
1% + А	0,76	1,04	1,05	1,58	1,00	1,15	0,43	1,00
4% + А	0,49	0,97	1,12	1,55	0,97	0,68	0,15	0,85
8% + А	0,18	0,81	1,25	1,53	п	0,13	п	0,56
1% + Б	0,68	0,90	1,15	1,33	1,15	0,78	0,65	0,95
4% + Б	0,46	0,87	1,24	1,37	0,96	0,54	0,25	0,81
8% + Б	0,11	0,77	1,26	1,41	1,00	0,12	п	0,67

Примечание: п -тест-организм погиб

Использование такого интегрального показателя как БАП позволяет получить представление об обобщенной реакции почвенной экосистемы на нефтяное загрязнение и более достоверные результаты об эффективности используемых при биоремедиации препаратов.

В таблицах 4 и 5 представлены величины коэффициента БАП, рассчитанные для всех вариантов опыта с периодами инкубации 3 и 90 сут. Как видно из полученных результатов (табл. 4, 5), при загрязнении нефтью общая биологическая активность почвы заметно снижалась. При этом степень подавления биологической активности зависела от концентрации нефти и времени прошедшего с момента попадания ее в почву.

Таблица 5

Значения БАП в различных вариантах экспериментов (90 сут)

Варианты эксперимента	Т е с т - о б ъ е к т ы							БАП
	Каталаза	Гетеротрофные микроорганизмы	УОМ	Микроскопические грибы	Почвенные водоросли	Высшие растения	Почвенный беспозвоночные	
К	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
К+1%	0,76	1,03	1,25	1,08	0,83	1,05	0,95	0,99
К+4%	0,39	1,02	1,32	0,90	0,79	0,84	0,75	0,86
К+8%	0,22	0,92	1,32	0,95	п	0,33	0,03	0,54
1% + Л	1,13	1,07	1,28	1,36	1,19	1,31	1,00	1,19
4% + Л	0,63	1,10	1,35	1,11	1,03	0,9	0,85	1,00
8% + Л	0,33	0,96	1,38	1,00	п	0,23	0,2	0,59
1% + А	1,04	1,04	1,33	1,02	1,20	1,40	0,77	1,11
4% + А	0,57	1,04	1,35	1,05	1,04	0,85	0,57	0,92
8% + А	0,26	0,98	1,34	0,96	п	0,39	0,12	0,58
1% + Б	1,22	0,94	1,09	1,01	1,18	1,19	0,9	1,08
4% + Б	0,70	0,97	1,25	1,07	1,06	0,72	0,85	0,95
8% + Б	0,43	0,94	1,28	1,10	0,83	0,37	0,22	0,74

В отличие от почв, подвергшихся слабому загрязнению (1%), биологическая активность которых за 90 сут практически полностью восстанавливалась (БАП для 1% загрязнения через 90 сут = 0,99), почвы со средней степенью загрязнения (4%) уже не могут вернуться в исходное состояние за счет внутренних ресурсов за такой отрезок времени (БАП для 4% загрязнения = 0,67, 0,79 и 0,86 после 3, 30 и 90 сут инкубации почвы, соответственно). При более высоких концентрациях нефти (8%) величина БАП за период наблюдения (3, 30, 90 сут) практически не изменялась и колебалась в пределах 0,54-0,57 единиц.

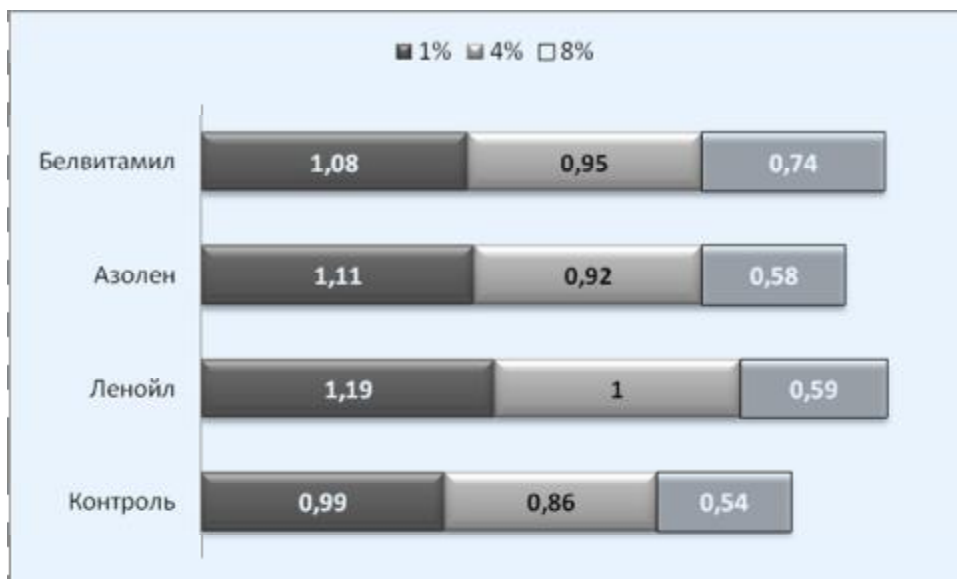


Рис. 3. Значения БАП через 90 сут инкубации

На этом фоне хорошо отслеживается положительная динамика от внесения биопрепаратов. Уже на 3 сут значение БАП в почвах с препаратами были значительно выше, чем в необработанных. Так, в почве с внесением Ленойла она равнялась 0,77; Азолена – 0,85; Белвитамила – 0,81. Тенденция восстановления биологической активности в почвах с 4% нефти и препаратами сохранялась на протяжении всего эксперимента, и через 90 сут показатели БАП составили: для 4% нефти без обработки – 0,86; с Ленойлом – 1,00; с Азоленом – 0,92; с Белвитамилом – 0,95 (рис. 3). Исходя из этих

результатов, можно констатировать неоспоримую эффективность использования исследованных препаратов в качестве инструментов восстановления биологической активности в почвах, подвергшихся нефтяному загрязнению средней степени (равному, в нашем случае, 4%).

Использование биопрепаратов в условиях высокой концентрации нефти (8%) не смогло существенно изменить скорость восстановления биологической активности. Возможно, в долгосрочной перспективе внесение биопрепарата в почву с сильным загрязнением сыграет свою положительную роль, однако в рамках нашего эксперимента значительного увеличения величины БАП не наблюдалось. Единственным препаратом, который показал хорошие результаты восстановления БАП при 8% загрязнении, стал Белвитамил (БАП для 8% загрязнения через 90 сут = 0,54; с Белвитамилом – 0,74). Вероятнее всего, это связано с его многокомпонентным составом, в который входят протеины, витамины и микроэлементы, служащие энергетическим материалом для почвенной микробиоты, а также целлюлозное волокно и низкомолекулярный лигнин, обладающие некоторой нефтеемкостью.

ВЫВОДЫ

1. Разработана многоуровневая тест-система, включающая показатели ферментативной активности (каталаза), численности гетеротрофных и углеводородокисляющих микроорганизмов, количественного и качественного состава микроскопических грибов, водорослей и цианобактерий, а также уровни фито- и зоотоксичности. Данную систему можно использовать для оценки состояния почвенного покрова и эффективности способов рекультивации загрязненных и нарушенных почв.

2. Для определения биологической активности разработан интегральный показатель биологической активности почвы (БАП). Он

позволяет более надежно оценить состояние почвы, чем использование каких-либо ее отдельных характеристик.

3. Исследованные биопрепараты Азолен, Ленойл и Белвитамил в целом оказались эффективными при восстановлении биологической активности нефтезагрязненных почв. Приемы биорекультивации с использованием этих препаратов имели наибольшую эффективность при исходно слабом (1%) или среднем (4%) загрязнении; при умеренно сильном загрязнении (8%) наиболее активен препарат Белвитамил.

4. Биопрепараты Азолен, Ленойл и Белвитамил не обладали собственными альготоксическими свойствами. При внесении биопрепаратов для ремедиации нефтезагрязненных почв токсическое действие нефти на почвенные водоросли и цианобактерии снижалось. Наиболее эффективным для восстановления цианобактериально-водорослевых ценозов оказался препарат Ленойл. При его внесении в загрязненную почву (1 и 4% концентрация нефти) наблюдалось полное восстановление видового состава, численности клеток и биомассы водорослей и цианобактерий. В условиях 8% загрязнения все три препарата оказались неэффективными.

5. Азолен, Белвитамил и Ленойл оказали схожее стимулирующее действие на активность почвенной каталазы. Динамика роста каталазной активности сохранялась в течение всего эксперимента; в пробах с исходным загрязнением в 1% через 90 сут эти значения становились выше контрольных. Применение препаратов способствовало восстановлению численности гетеротрофных микроорганизмов. Через 90 сут в слабо- (1%) и среднезагрязненных (4%) почвах с внесением Азолена и Ленойла их количество было больше чем в контроле. Белвитамил положительно влиял на рост численности гетеротрофов в почвах с исходно сильным (8%) загрязнением. Углеводородоокисляющие микроорганизмы, получающие стимул к развитию за счет нефтяных углеводов, показали еще более

быстрый рост при использовании биопрепаратов, особенно Белвитамила и Ленойла. В почвах, обработанных этими препаратами, уже через 30 сут численность углеводородокисляющих микроорганизмов достигала порядка 10^7 . Внесение в нефтезагрязненную почву препаратов также способствовало перестроениям в комплексе почвенных микромицетов. Азолен, Белвитами́л и Ленойл неодинаково влияли на видовой состав микромицетов, проявляя стимулирующее и ингибирующее действие по отношению к разным видам.

б. Применение биопрепаратов снижало фито- и зоотоксическое воздействие нефти. Ленойл оказал стимулирующее действие на рост проростков редиса при 1% загрязнении в течение всего эксперимента. Внесение препарата в почвы с более высокими концентрациями нефти (4 и 8%) отразилось только на увеличении процента всхожести, увеличения длины проростков не наблюдалось. Наиболее эффективным препаратом для снижения фитотоксичности в проведенном эксперименте оказался Азолен, положительно отразившийся на регистрируемых показателях (длина проростков, всхожесть, энергия и скорость прорастания семян) в течение всего эксперимента во всех концентрациях. Выживаемость коллембол зависела от времени, прошедшего с момента попадания нефти в почву и концентрации нефтяного загрязнения, а также от особенности их видовой резистентности к нефти. В почве с 8% концентрацией нефти особи коллембол *Folsomia candida* погибали, а благодаря обработке препаратами Азолен, Ленойл и Белвитами́л их выживаемость в таких почвах составила 10, 15 и 20%, соответственно. Для *Onychiurus stachianus* аналогичные показатели составили 5% (в почве с 8% нефти), 15% при обработке Азоленом, и по 25% при обработке Ленойлом и Белвитами́лом.

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации

1. Киреева Н.А., Кабиров Т.Р., Онегова Т.С., Жданова Н.В. Биологическая очистка нефтезагрязненных природных объектов с использованием целлюлосодержащих субстратов // Нефтяное хозяйство. – 2007. – № 6. – С. 98-101 (принято к печати до 31.12.2006).
2. 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.
3. Киреева Н.А., Рафикова Г.Ф., Галимзянова Н.Ф., Логинов О.Н., Кабиров Т.Р. Комплекс микромицетов нефтезагрязненного чернозема выщелоченного при рекультивации биопрепаратом ленойл // Микология и фитопатология. – 2008. – Т.42. – Вып. 1. – С. 57-63.
4. Бакаева М.Д., Тарасенко Е.М., Кабиров Т.Р. Экологическая оценка рекультивируемых почв // Город. Почва. Экология. Тез. докл. Всеросс. конф.. VI Докучаевские молодежные чтения. С.-Пб., 2003. – С.36-37.
5. Кабиров Т.Р., Шамаева А.А. Активность почвенной липазы как индикатор процесса биodeградации нефти в почве // Человек и почва в XXI в. Тез. докл. Всеросс. конф. VI Докучаевские молодежные чтения. – С.-Пб., 2004. – С.80.
6. Федотов А.В., Киреева Н.А., Тарасенко Е.М., Шамаева А.А., Кабиров Т.Р. Создание биопрепарата для биоремедиации нефтезагрязненных почв // Итоги биологических исследований. Сб. научн. трудов. – 2004. – Выпуск 8. – Уфа: РИО БашГУ, 2004. – С.42-46.
7. Киреева Н.А., Онегова Т.С., Кабиров Т.Р. Биотехнология рекультивации нефтезагрязненных почв // Биотехнология-2005. Семинар-презентация инновационных научно-технических проектов. Тез. докл. – Пущино, 2005. – С.99-100.
8. Кабиров Т.Р., Гиззатова Л.С. Оценка токсического воздействия нефти на ногохвосток // Биология–наука XXI в. Сб. тез. 10-ой Пущинской школы-конференции. – Пущино, 2006. – С.227-228.
9. Кабиров Т.Р. Реакция водорослей на загрязнение почвы нефтью//Альгологические исследования: современное состояние и перспективы на будущее. Матер. 1 Всеросс. научн-пр. конф. – Уфа:Изд-во БГПУ, 2006. – С.54-55.
10. Киреева Н.А., Кабиров Т.Р., Онегова Т.С., Жданова Н.В.. Активизация аборигенной углеводородокисляющей микробиоты почв внесением отходов производства целлюлозы // Мікробні біотехнології. Тез. Міжд. наук. конф. – Одесса, 2006. – С.189.

11. Кабиров Т.Р., Киреева Н.А., Рафикова Г.Ф., Бакаева М.Д. Экологический риск нефтяного загрязнения почв // Техносферная безопасность, надежность, качество, энерго- и ресурсосбережение. Сб. научн. тр. и матер. Всеросс. н.-практ. конф. Выпуск VIII. – Ростов-на-Дону–Шепси, 2006. – С.330-335.
12. Киреева Н.А., Кабиров Т.Р., Онегова Т.С.. Биоремедиация нефтезагрязненных почв с использованием целлюлозосодержащих субстратов// Биологическая рекультивация и мониторинг нарушенных земель. Матер. междуна. научн. конф. – Екатеринбург: Изд-во Ур. ун-та, 2007. – С. 346-358.
13. Мрясова А.Б., Кабиров Т.Р. Альгологическая характеристика нефтезагрязненных почв в качестве биоиндикаторных показателей // Студент и наука. Матер. научн. конф. – Уфа: РИЦ БашГУ, 2007. – С. 41-44.
14. Кабиров Т.Р. Использование биопрепарата «ленойл» для биотехнологической очистки нефтезагрязненных почв // Проблемы экологии в современном мире. Матер. IV всеросс. Internet-конф. – Тамбов, 2007. – С. 172-175.
15. Kabirov T.R., Kireeva N.A. Usage of wastes from cellulose-paper production for bioremediation of oil polluted soils // Changing Soils in a Changing World: the Soils of Tomorrow. 5th International Congress of European Society for Soil Conservation. – Palermo, 2007. – P. 311.
16. Киреева Н.А., Кабиров Т.Р., Дубовик И.Е. Комплексное биотестирование нефтезагрязненных почв // Теоретическая и прикладная экология. – 2007. – №1. – С. 65-69.
17. Киреева Н.А., Кабиров Т.Р., Григориади А.С., Онегова Т.С. Детоксикация нефтешлама с использованием целлюлозосодержащих субстратов// Вестник Башкирского университета. 2008. – №1. – С. 47-51.
18. Киреева Н.А., Кабиров Т.Р., Онегова Т.С., Григориади А.С., Рафикова Г.Ф. Использование отходов целлюлозно-бумажного производства для очистки и детоксикации загрязненных почв // Фундаментальные достижения в почвоведении, экологии, сельском хозяйстве на пути к инновациям. Тез. докл. всеросс. научно-практ. конф. – М.: МаксПресс, 2008. – С. 25-26.
19. Киреева Н.А., Онегова Т.С., Григориади А.С., Кабиров Т.Р. Изучение возможности утилизации отходов целлюлозно-бумажной промышленности для рекультивации нефтезагрязненных почв// Мировые инновационные технологии восстановления нарушенных и загрязненных земель техногенных регионов. Сб. матер. междунар. научно-пр. конф. – Кемерово, 2008. – С. 47-49.
20. Кабиров Т.Р. Экологические риски, сопутствующие трубопроводному транспорту нефти // Проблемы экологии в современном мире. Матер. V всеросс. Internet-конф. – Тамбов, 2008. – С. 67-70.

