

*На правах рукописи*

**РАФИКОВА**  
**Гульназ Фаилевна**

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКОБИОТ ПОЧВ  
РАЗНЫХ ТИПОВ ПРИ ЗАГРЯЗНЕНИИ НЕФТЫЮ И  
БИОРЕКУЛЬТИВАЦИИ**

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  
Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования  
«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:** ГОУ ВПО «Казанский государственный  
университет»

Защита диссертации состоится 27 февраля 2009 г. в 14-00 часов на заседании Регионального диссертационного совета ДМ 002.136.01 при 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 \_\_\_\_\_ 2009 г.

Ученый секретарь  
Регионального диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Р.В. Уразгильдин

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Загрязнение окружающей среды нефтью и нефтепродуктами до сих пор остается актуальной проблемой. В России по разным оценкам в результате аварий и утечек ежегодно теряется от 3 до 20 млн. тонн нефти (Таргулян, 2002; Экологические..., 2003; Артемов, 2004; Матвеев, 2004; Маркман, 2007; Яблоков, 2007). Попадая в почву углеводороды нефти оказывают существенное негативное влияние на биологические свойства почвы и условия обитания живых организмов. Одним из основных компонентов почвенного биогеоценоза являются микроскопические грибы (Одум, 1986; Звягинцев, 1987; Мирчинк, 1988; Головченко, 2000; Киреева и др., 2005; Марфенина, 2005). Они чувствительны к изменению свойств почвы под воздействием различных поллютантов и могут служить индикаторами ее состояния (Марфенина, 1982; Лебедева, 2000). Микромицеты находятся в тесной взаимосвязи и взаимодействии с другими организмами в наземных экосистемах. Поэтому изменения в структуре комплекса микромицетов при нефтяном загрязнении могут влиять на микробоценоз в целом, а также оказывать негативное воздействие на макроорганизмы. В частности, в условиях техногенеза может происходить накопление в почве токсичных для животных и растений форм грибов (Richardson, Kokki, 1998; Лебедева и др., 1999; Зачиняева, Хабибуллина, Арчегова, 2001; Согонов, Марфенина, 2004; Марфенина, 2005; Назаров, Иларионов, 2005; Терехова, 2007; Евдокимова и др., 2008; Иванова и др., 2008; Кондратюк и др., 2008 и др.).

В последние годы все большее значение приобретает поиск путей очистки природных объектов и борьбы с последствиями нефтяных загрязнений. Одним из приемов ремедиации нефтезагрязненных почв является использование биопрепаратов на основе микроорганизмов (Борзенков и др., 1994; Щерблюкин и др., 1995; Коронелли, 1996; Логинов, 2002, 2004; Онегова и др., 2003 и др.). Однако внесение в почву биопрепаратов без достаточно аргументированных оснований может провоцировать непредсказуемые изменения микробоценозов, которые чреваты отрицательными последствиями.

Кроме того, по мнению О.Е. Марфениной (1999; 2005), уделяется недостаточное внимание изучению антропогенной трансформации и сравнительному анализу комплексов почвенных микромицетов в условиях различных природных зон. В связи с этим значительный интерес представляет

изучение микромицетов загрязненных нефтью и подвергнутых биоремедиации почв различного генезиса.

**Целью диссертационной работы** явилась оценка влияния нефтяного загрязнения и биоремедиации на комплексы микромицетов серой лесной почвы Республики Башкортостан и торфяно-глеевой почвы Республики Коми.

**Основные задачи исследований:**

1. Изучить изменения видовой структуры микроскопических грибов при нефтяном загрязнении и внесении биопрепаратов Ленойл, Азолен и Елена для рекультивации серой лесной почвы Республики Башкортостан и торфяно-глеевой почвы Республики Коми.

2. Изучить влияние нефтяного загрязнения и рекультивации на некоторые показатели биологической активности серой лесной и торфяно-глеевых почв.

3. Сравнить микобиоты серой лесной и торфяно-глеевой почвы при нефтяном загрязнении и биоремедиации и дать оценку экологически опасным последствиям трансформации комплексов микроскопических грибов.

**Научная новизна работы.** Впервые проведено детальное изучение влияния препаратов Ленойл и Азолен на показатели комплексов микроскопических грибов загрязненных нефтью серой лесной и торфяно-глеевых почв. Впервые проведено сравнительное изучение воздействия нефтяного загрязнения и биоремедиации с использованием микробных препаратов на комплексы микроскопических грибов отличающихся по генезису почв. Установлены сходные тенденции изменений комплексов микромицетов и других показателей биологической активности почв под влиянием этих факторов. Получены новые данные о содержании в серой лесной и торфяно-глеевой почвах фитотоксичных, фитопатогенных и потенциально патогенных для человека и животных видов микромицетов. Впервые показана возможность использования биофунгицида Елена для биоремедиации нефтезагрязненных почв различных типов и изучено его влияние на комплекс микроскопических грибов в них.

**Защищаемые положения.**

1. Нефтяное загрязнение почв различных типов приводит к формированию в них специфических комплексов микромицетов, обладающих большим сходством между собой, чем с комплексами микроскопических грибов, выявленными в типовых (незагрязненных того же типа) почвах.

2. При нефтяном загрязнении серой лесной и торфяно-глеевых почв происходит накопление потенциально опасных для растений, животных и человека видов микромицетов.

3. Использование биопрепаратов не только способствует снижению содержания остаточных углеводов в нефтезагрязненной почве, но и приводит к изменениям в составе комплекса микромицетов и снижению содержания фитотоксичных и условно патогенных для человека и животных видов микромицетов.

4. При нефтяном загрязнении происходит увеличение численности УОМ, снижение численности олигонитрофилов и азотфиксаторов, целлюлозоразрушающих, использующих минеральный и органический азот микроорганизмов, ингибирование каталазной активности серой лесной почвы Республики Башкортостан и торфяно-глеевой почвы Республики Коми. Внесение биопрепаратов для биоремедиации нефтезагрязненной почвы способствует ускорению биodeградации углеводов нефти, увеличению численности УОМ, азотфиксаторов и олигонитрофилов, микроорганизмов, использующих минеральный и органический азот, снижению численности целлюлозоразрушающих микроорганизмов, повышению каталазной активности.

**Практическая значимость.** Полученные результаты могут быть использованы для оценки эффективности биорекультивации почв в условиях разных климатических зон России, а также при анализе целесообразности последующего их хозяйственного использования.

Данные по структуре комплексов микромицетов и других функциональных групп микроорганизмов могут служить для биоиндикации и биомониторинга загрязненных нефтью и рекультивируемых почв. Полученные результаты используются в учебном процессе в рамках дисциплин «Экология микроорганизмов» и «Рекультивация нарушенных земель».

Результаты исследований были использованы при рекультивации нефтезагрязненных торфяно-глеевых почв (Акт о внедрении прилагается).

**Личное участие автора.** Автором проведены аналитический обзор литературы, планирование экспериментальной работы, получена основная часть фактических данных и проведена их интерпретация.

**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 и конгрессах** «Экология и биология почв: проблемы диагностики и индикации» (Ростов-на-Дону, 2006), по проблемам сохранения биоразнообразия (Алматы, 2006; Оренбург, 2006; Сыктывкар, 2006; Йошкар-Ола–Пушино, 2008), «Здоровье и безопасность жизнедеятельности молодежи: проблемы и пути решения» (Уфа, 2006), по проблемам ботаники (Казань, 2006; Воронеж, 2008), «Актуальные вопросы современной биологии» (Алматы, 2006), «XV Congress of European Mycologists» (Санкт-Петербург, 2007), «Ломоносов-2006, 2007» (Москва, 2007), «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2003, 2005, 2006, 2007), «Лесное почвоведение: итоги, проблемы, перспективы» (Сыктывкар, 2007), «Микроорганизмы и биосфера» (Москва, 2007), «Урбоэкосистемы: проблемы и перспективы развития» (Ишим, 2007), «Техносферная безопасность, надежность, качество, энерго- и ресурсосбережение» (Ростов-на-Дону, 2006, 2007), «Современные проблемы загрязнения почв» (Москва, 2007), «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2007, 2008), «Экология биосистем: проблемы изучения, индикации и прогнозирования» (Астрахань, 2007), «Освоение Севера и проблемы природовосстановления» (Сыктывкар, 2007), «Мир науки» (Алматы, 2008), на **Всероссийских конференциях и съездах** «Актуальные проблемы биологии и экологии» (Сыктывкар, 2002, 2007, 2008), «Человек и почва в XXI веке» (Санкт-Петербург, 2004), «Кашкинские чтения» (Санкт-Петербург, 2006, 2007, 2008), «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2006), по проблемам экологии (Киров, 2007, 2008; Тамбов, 2007), «Успехи медицинской микологии» (Москва, 2007), «Проблемы экологии в современном мире» (Тамбов, 2007), «XII Делегатский съезд РБО» (Петрозаводск - Санкт-Петербург, 2008), «Современная микология в России» (Москва, 2008), «Фундаментальные достижения в почвоведении, экологии, сельском хозяйстве на пути к инновациям» (Москва, 2008).

На Всероссийской конференции «Экотоксикология: современные биоаналитические системы, методы и технологии» (Тула-Пушино, 2006), работа удостоена диплома лауреата конкурса молодых ученых (государственный контракт № 02.444.11.7345)

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 48 печатных работ, в том числе 8 статей, входящих в Перечень ВАК.

**Структура и объем диссертации.** Работа содержит 203 страницы основного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием объектов и методов исследования, экспериментальной части, заключения, выводов, списка литературы, содержит 49 таблиц, 24 рисунка. Список литературы включает 377 источников, в т.ч. иностранных – 63.

Автор выражает искреннюю благодарность и признательность за помощь, консультации и поддержку научным руководителям д.б.н. Киреевой Н.А. и к.б.н. Галимзяновой Н.Ф., д.б.н. Логинову О.Н. за любезно предоставленные биопрепараты, к.б.н. Бакаевой М.Д., сотрудникам Института биологии Коми НЦ УрО РАН к.б.н. Маркаровой М.Ю., к.б.н. Хабибуллиной Ф.М., к.б.н. Щемелининой Т.Н., а также коллегам и соавторам публикаций.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Глава 1. Загрязнение почвы нефтяными углеводородами и ее рекультивация (обзор литературы)**

Приведен обзор литературы о роли микроскопических грибов в биогеоценозах, влиянии нефтяного загрязнения на численность, разнообразие, видовой состав почвенных микромицетов, ферментативную активность и фитотоксичность почвы. Рассмотрены публикации по изучению микроорганизмов в разных природных зонах. Дана классификация технологий рекультивации и приведен обзор биопрепаратов. На основе критического анализа данных литературы определены методология и основные направления исследования.

### **Результаты собственных исследований**

#### **Глава 2. Объекты и методы исследований**

Материалом для данной работы послужили результаты полевых исследований, проведенных в 2002-2008 годах в Республике Башкортостан на территории Арланского нефтяного месторождения нефтегазодобывающего

управления «Южарланнефть» Калтасинского и Краснокамского районов, в Республике Коми на территории Южно-Ошского нефтяного месторождения Усинского района, а также результаты лабораторных экспериментов по изучению характеристик комплекса почвенных микромицетов и показателей численности различных функциональных групп микроорганизмов, ферментативной активности почвы и фитотоксичности в условиях нефтяного загрязнения и при использовании биопрепаратов для биоремедиации нефтезагрязненных почв.

В качестве рекультивирующих факторов были использованы биопрепараты Ленойл, Азолен и Елена, любезно предоставленные д.б.н. проф. О.Н. Логиновым. Ленойл – биопрепарат для рекультивации нефтезагрязненных почв и водных объектов, основу которого составляет природный консорциум микроорганизмов нефтеструктуров *Bacillus brevis* и *Arthrobacter sp.* (Логинов и др., 2004 в). Азолен - биоудобрение комплексного действия на основе штамма *Azotobacter vinelandii* ИБ 4 (Логинов и др., 2004 а). Елена – биопрепарат для защиты сельскохозяйственных культур от болезней, вызываемых грибами. Основу биопрепарата Елена составляет культуральная жидкость нового штамма-антагониста фитопатогенных грибов *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 51 (Логинов и др., 2003). Биопрепараты вносили в загрязненную почву однократно с титром микроорганизмов Ленойл -  $10^8$  КОЕ/мл, Азолен и Елена -  $10^6$  КОЕ/мл.

Отбор образцов почв для анализов проводили по общепринятой методике (Литвинов, 1969; Методы ..., 1991; Кураков, 2001). Идентификацию видов микромицетов проводили по определителям (Литвинов, 1967; Пидопличко, 1972; Милько, 1974; Билай, 1977; Егорова, 1986; Билай, 1988; Ramirez, 1982; Raper, Fennel, 1965; Raper, Thom, 1968; Watanabe, 2000). Принадлежность к условно патогенным и токсинообразующим микромицетам уточняли по соответствующим определителям (Билай и др., 1988, Билай, Курбацкая, 1990, Саттон и др., 2001). Для установления типичных и доминантных видов использовали показатели обилия, пространственной и временной частоты встречаемости видов. Оценку разнообразия сообщества проводили с помощью индекса разнообразия Шеннона (Методы ..., 1991). Для оценки степени близости комплексов грибов анализируемых почвенных образцов использовали коэффициенты сходства по Жаккару (Гришкан, 1997) и по



Сьеренсену-Чекановскому (Методы ..., 1991). Для характеристики силы влияния антропогенных нарушений на оппортунистические грибы был подсчитан индекс комплексной оценки микологической опасности ( $I_m$ ), предложенный О.Е. Марфениной (1999). Учет мицелия грибов проводили методом мембранных фильтров в модификации Демкиной и Мирчинк (Методы ..., 1991). Фитотоксичность почвы оценивали методом почвенных пластинок по степени ингибирования прорастания семян редиса (*Raphanus sativus*, сорт «Красный с белым кончиком») и кукурузы (*Zea mays*, сорт Краснодарская-55) (Гродзинский, 1991). Фитотоксичность культуральной жидкости отдельных видов микромицетов изучали на проростках кукурузы (Методы ..., 1982). Каталазную активность почв определяли газометрическим методом по Галстяну (Хазиев, 2005). Содержание остаточных нефтепродуктов определяли горячей экстракцией метиленхлоридом (Mc Gill, Rowell, 1980). Статистическую обработку данных осуществляли общепринятыми методами (Лакин, 1990) с помощью пакета компьютерных программ Microsoft Excel 2003, Statistica 5.0. При оценке статистической достоверности полученных данных использовали t-критерий Стьюдента.

### **Глава 3. Изменения структуры комплекса микромицетов серой лесной почвы при нефтяном загрязнении и биоремедиации**

В третьей главе описаны последствия воздействия нефти и биопрепаратов, используемых для рекультивации нефтезагрязненных почв, на комплексы микроскопических грибов и другие эколого-трофические группы микроорганизмов серой лесной почвы Республики Башкортостан.

Длительное загрязнение серой лесной почвы в полевых условиях нефтью в диапазоне концентраций 1,88-130 мг/г приводило к стимулированию развития грибов, что выражалось в увеличении числа выделяемых грибных зачатков, изменению структуры комплекса микромицетов и появлению новых доминирующих и типичных частых видов. В фоновой серой лесной почве доминирующим видом был *Penicillium glabrum*, который являлся довольно устойчивым к действию данного поллютанта и при нефтяном загрязнении переходил в разряд типичных частых и типичных редких (табл. 1).

В загрязненной почве доминировали виды, частота встречаемости которых в контрольной почве была значительно ниже (*Aspergillus flavus var. oryzae* и

*Penicillium restrictum*). Анализ видового состава микроскопических грибов показал, что в загрязненной почве увеличивалась встречаемость фитотоксичных, фитопатогенных и потенциально патогенных для человека (BSL2) видов (*Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Trichoderma viride* и др.). Если в чистой почве они были представлены 1-2 видами, то в загрязненных их число достигало 5-7. Максимальное значение индекса безопасности ( $I_m$ ) для серой лесной почвы составляло 5,8 при средних уровнях загрязнения, что свидетельствует о потенциальной опасности таких почв для людей с ослабленной иммунной системой.

Таблица 1

**Чувствительные и толерантные к загрязнению виды микромицетов  
серой лесной почвы Арланского месторождения**

Чувствительные виды	Толерантные виды
1. <i>Macrosporium bifurcum</i> (Fresen.) Sacc. 2. <i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx 3. <i>P. decumbens</i> Thom	1. <i>Aspergillus candidus</i> Link 2. <i>Aspergillus flavus</i> var. <i>oryzae</i> (Ahlb.) Kurtzman, M.J. Smiley, Robnett & Wicklow 3. <i>A. fumigatus</i> Fresen. 4. <i>A. niger</i> Teigh. 5. <i>Penicillium canescens</i> Sopp 6. <i>P. glabrum</i> Westling 7. <i>P. purpurogenum</i> Stoll 8. <i>P. restrictum</i> J.G.Gilman et E.V.Abbott 9. <i>P. variabile</i> Sopp 10. <i>P. varians</i> G. Sm. 11. <i>Trichoderma viride</i> Pers.

Модельные опыты показали, что использование для рекультивации нефтезагрязненной серой лесной почвы биопрепаратов Ленойл, Азолен и Елена способствовало снижению численности микромицетов, которые активно развивались при загрязнении почвы нефтью (рис. 1).

Внесение биопрепарата Ленойл в нефтезагрязненную почву приводило к увеличению числа выделяемых видов за счет случайных видов *Penicillium canescens*, *P. humuli*, *P. pinophilum*, *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, а также

светлоокрашенного *Mycelia sterilia*. Однако видовое богатство грибов в рекультивированной почве было сниженным (рис.2).

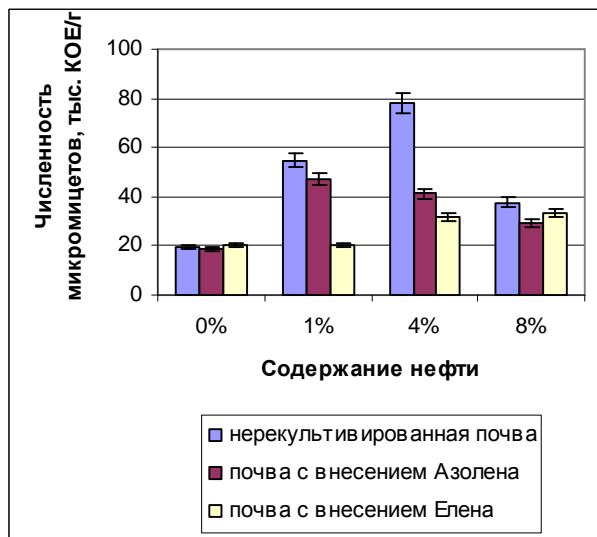


Рис. 1. Влияние внесения биопрепаратов Азолен и Елена на численность микромицетов в серой лесной почве

снижению представленности фитотоксичных и оппортунистических видов *Aspergillus fumigatus* и *A.niger*, а в сильно загрязненной почве (8%) происходило снижение частоты встречаемости вида *Mucor hiemalis*, вызывающего локализованные микозы на фоне иммунодефицита.

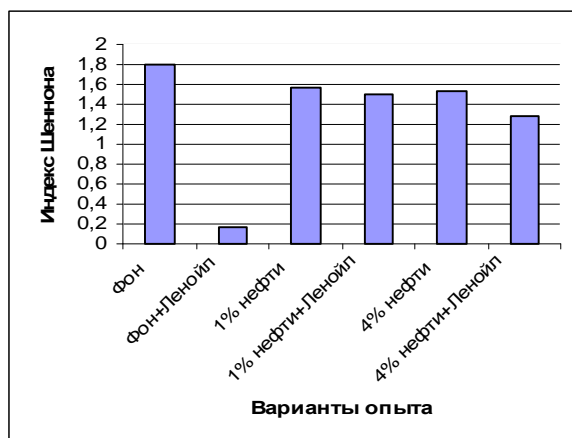


Рис. 2. Влияние внесения биопрепарата Ленойл на видовое разнообразие микромицетов в серой лесной почве

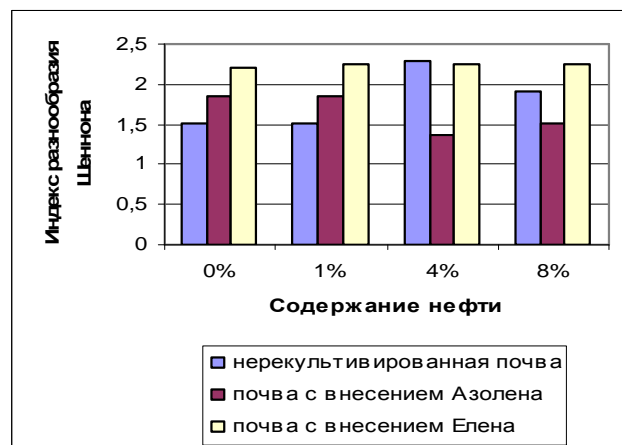


Рис. 3. Влияние внесения биопрепаратов Азолен и Елена на видовое разнообразие микромицетов в серой лесной почве

Внесение биопрепарата Елена в нефтезагрязненную почву приводило к появлению видов *Aspergillus restrictus*, *Clonostachys rosea f. catenulata* и

Использование биопрепарата Азолен привело к изменению встречаемости типичных представителей микромицетов серой лесной почвы. В незагрязненной почве - *Trichoderma koningii*, *T.viride*, *Penicillium adametzii*, *P.variabile* при 1% загрязнении нефтью - *Penicillium velutinum* и *Fusarium poae* (рис. 3), в вариантах с 4% и 8% нефти - *P.funiculosum*, *Trichoderma koningii*, *T.viride*. Внесение Азолен в загрязненную почву способствовало

*Trichoderma hamatum*, увеличению частоты встречаемости *Penicillium glabrum* и *P. simplissimum*. В результате этого разнообразие микроскопических грибов увеличилось (рис. 3). Биопрепарат подавлял развитие потенциально патогенного вида микромицетов группы BSL-1 *Mucor hiemalis*, оппортунистического и фитотоксичного вида *Trichoderma koningii*.

Расчет показателя сходства комплексов вариантов рекультивируемой с использованием Ленойла почвы с контрольным вариантом свидетельствует о том, что загрязнение нефтью настолько изменило видовой состав микромицетов серой лесной почвы, что даже применение высокоэффективного биопрепарата не привело к его восстановлению. Азолен способствовал увеличению видового разнообразия при внесении в почву с низкой концентрацией углеводов (1%) и снижал этот показатель в вариантах с 4 и 8% нефти (рис.3). Внесение Азолена способствовало восстановлению в рекультивируемой почве комплексов микромицетов, близких к комплексам незагрязненной почвы. Биофунгицид Елена оказывал серьезное модифицирующее воздействие на комплекс микромицетов нефтезагрязненной почвы, выраженность изменений соответствовала концентрации загрязнителя (табл. 2).

Таблица 2

**Показатели сходства микобиот нефтезагрязненной, рекультивированной и фоновой почв**

Концентрация нефти, %	Варианты опыта					
	Коэффициент Жаккара		Коэффициент Сьеренсена-Чекановского			
	Без препарата	Ленойл	Без препарата	Азолен	Без препарата	Елена
1	0,29	0,27	0,55	0,61	0,28	0,50
4	0,23	0,29	0,55	0,61	0,44	0,22
8	не опр.	не опр.	0,44	0,55	0,44	0,22

Применение биопрепаратов Ленойл, Азолен, Елена способствовало снижению фитотоксичности нефтезагрязненной серой лесной почвы до уровня фоновой (рис. 4, 5).

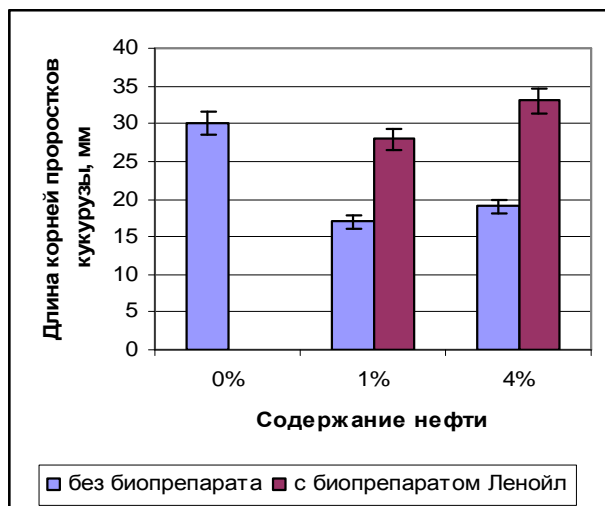


Рис.4. Влияние биоремедиации препаратом Ленойл на фитотоксичность серой лесной почвы

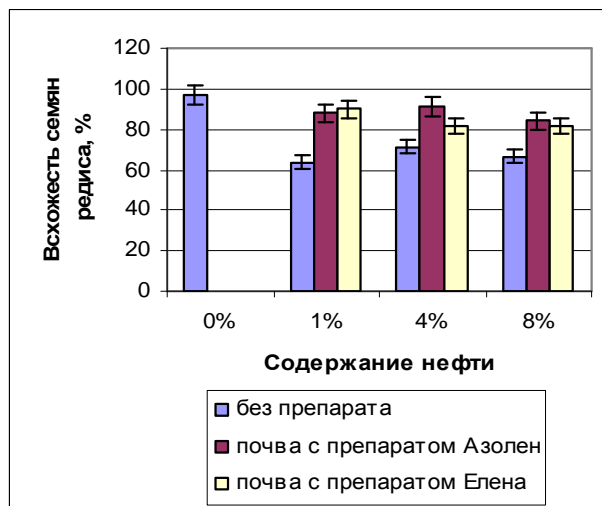


Рис.5. Влияние биоремедиации препаратами Азолен и Елена на фитотоксичность серой лесной почвы

В модельных опытах показано, что загрязнение нефтью и внесение изученных биопрепаратов приводило к активизации развития УОМ. Численность УОМ коррелировала со степенью деградации углеводородов (рис.6).

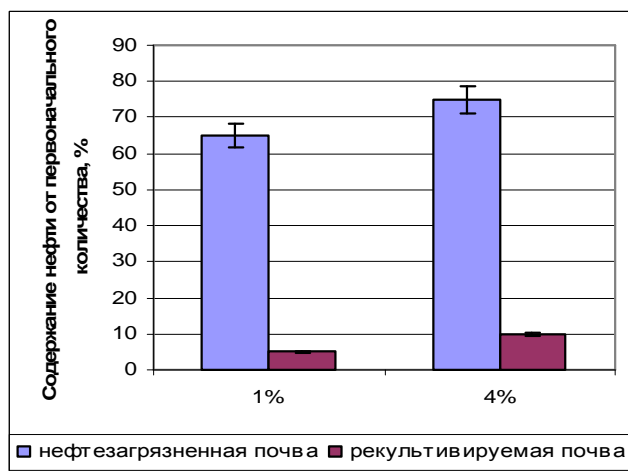


Рис. 6. Влияние внесения биопрепарата Ленойл на содержание остаточных нефтепродуктов в серой лесной почве (120 суток)

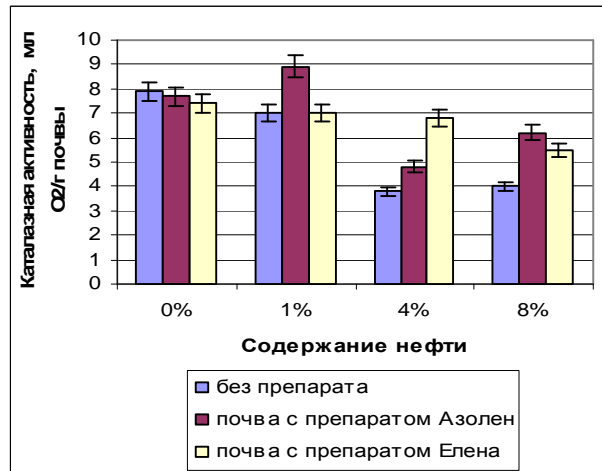


Рис. 7. Влияние внесения биопрепаратов Азолен и Елена на каталазную активность серой лесной почвы (60 суток)

Внесение биопрепаратов Азолен и Елена приводило к увеличению относительной плотности олигонитрофилов и азотфиксаторов, вследствие хорошей приживаемости микроорганизмов биопрепарата Азолен и снижения конкуренции со стороны грибов при использовании препарата Елена.

Загрязнение нефтью приводило к постепенному уменьшению общей численности целлюлозоразрушающих микроорганизмов пропорционально

концентрации поллютанта. Внесение биопрепарата Ленойл способствовало восстановлению соотношения грибы-бактерии и общей численности целлюлозоразрушающих микроорганизмов, при использовании препаратов Азолен и Елена увеличения численности данной группы микроорганизмов не наблюдалось.

Загрязнение нефтью угнетало активность каталазы, причем, чем выше была концентрация нефтяного загрязнения, тем меньшую активность проявлял фермент. При внесении биопрепаратов активность каталазы увеличивалась, превосходя значения, выявленные в нерекультивируемых вариантах почвы (рис. 7).

#### **Глава 4. Изменения структуры комплекса микромицетов торфяно-глеевой почвы при нефтяном загрязнении и биоремедиации**

В четвертой главе рассматривается влияние нефтяного загрязнения и биоремедиации с использованием препаратов Азолен и Елена на комплексы микроскопических грибов и другие эколого-трофические группы микроорганизмов торфяно-глеевой почвы Республики Коми.

В нефтезагрязненной почве Южно-Ошского нефтяного месторождения республики Коми по мере увеличения степени загрязненности численность микромицетов в почвенных образцах снижалась (табл.3). Развитие микроскопических грибов в торфяно-глеевой почве подавлялось нефтью в более низкой концентрации, чем в серой лесной почве.

В фоновой почве доминирующими были *Chrysosporium pannorum*, *Penicillium decumbens* и светлоокрашенная форма стерильного мицелия. В загрязненной почве зачастую доминировали виды, не встречавшиеся в фоновой почве. К таким видам относились темноокрашенные виды *Cladosporium cladosporioides*, *Mortierella humicola* и стерильный мицелий, что свидетельствует о неблагоприятной экологической ситуации. В исследованной нефтезагрязненной почве происходило накопление условно патогенных микромицетов. Если в фоновой почве они были представлены одним видом, то в загрязненных - 6-7. Значение индекса опасности ( $I_m$ ) для торфяно-глеевой почвы достигало 89,4 при высокой концентрации загрязнителя. В образцах нефтезагрязненных торфяно-глеевых почв была выявлена отмеченная для серых лесных почв тенденция к накоплению токсинообразующих

микровицетов: в нефтезагрязненной почве обнаружено 9 фитотоксичных видов микровицетов, в фоновой – 3. К обнаруженному в фоновых образцах вызывающему пятнистость листьев виду *Macrosporium commune* в загрязненных образцах добавляется вызывающий подобное заболевание вид *Aureobasidium pullulans* и возбудитель розовой плесени и гигантизма зерновых *Fusarium moniliforme*. Число фитотоксичных видов микровицетов в нефтезагрязненной почве также возросло по сравнению с фоновой и составляло 9 и 3 соответственно.

Загрязнение почвы нефтью приводило к значительному увеличению УОМ при небольших концентрациях поллютанта, стимулировало развитие целлюлозолитических микроорганизмов - при высоких, и угнетало олигонитрофилов и азотфиксаторов (табл.3).

Таблица 3

**Численность различных эколого-трофических групп микроорганизмов в образцах торфяно-глеевой почвы Южно-Ошского месторождения, отобранных в июне 2005 г**

Содержание остаточных углеводов					
0,38 мг/г (фон)	5,16 мг/г	25,98 мг/г	64 мг/г	200 мг/г	56 мг/г (горелый)
Микровицеты, 10 <sup>3</sup> КОЕ / г					
987,00±2,75	161,00±1,28	8,50±0,46	55,50±1,16	168,00±3,33	1,50±0,13
УОМ, 10 <sup>3</sup> КОЕ / г					
1,1±0,1	130,0±6,2	0,5±0,02	17,0±1,2	11,0±0,6	1,4±0,8
Целлюлозолические микроорганизмы, 10 <sup>3</sup> КОЕ / г					
26,00±0,76	0,30±0,015	0,02±0,001	24,0±0,9	23,00±0,59	0,10±0,006
Олигонитрофильные и азотфиксирующие микроорганизмы, КОЕ * 10 <sup>5</sup> /г					
15,65±0,21	2,4±0,1	6,3±0,25	0,9±0,07	11,9±0,16	0,70±0,03

Модельное нефтяное загрязнение торфяно-глеевой почвы вызывало увеличение численности микроскопических грибов, аналогичный процесс был отмечен и в серой лесной почве (рис.8), что, вероятно, связано с присутствием в комплексе микровицетов штаммов, утилизирующих углеводороды нефти.

Внесение Азолен в нефтезагрязненную почву с концентрацией нефти 4% приводило к увеличению численности микромицетов, что может быть связано с улучшением азотного режима почвы (рис. 8).

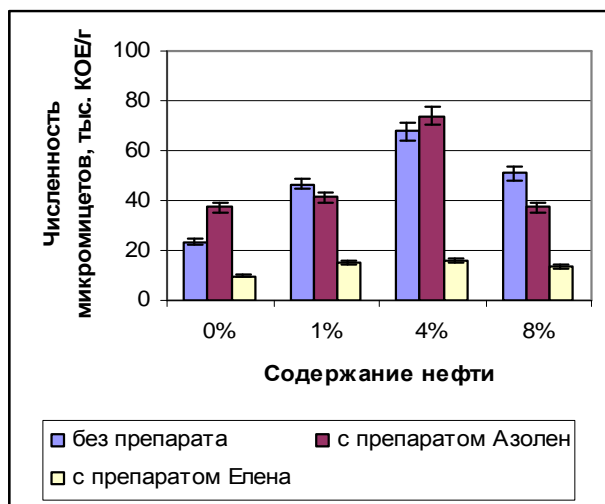


Рис. 8. Влияние внесения биопрепаратов Азолен и Елена на численность микромицетов торфяно-глеевой почвы

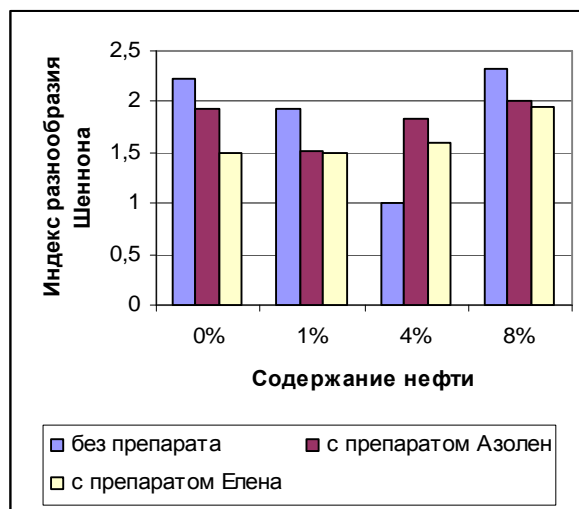


Рис. 9. Влияние внесения биопрепаратов Азолен и Елена на видовое разнообразие микромицетов торфяно-глеевой почвы

При использовании биофунгицида Елена для рекультивации загрязненных почв численность микромицетов, длина гиф и биомасса грибного мицелия снизились уже на 3 сутки после начала эксперимента (рис. 8).

Анализ изменений видового состава микромицетов при использовании Азолен показал, что типичными частыми являлись виды *Aspergillus fumigatus*, *Paecilomyces variotii*, *Mucor sp.*, *Trichoderma hamatum*, которые встречались практически во всех образцах рекультивированной почвы (табл. 4). Частота встречаемости видов *Aspergillus fumigatus*, *A. niger* и *Paecilomyces variotii* в рекультивируемых почвах снижалась по сравнению с загрязненными почвами. Видами относительно толерантными к загрязнению и внесению биопрепарата Азолен в исследуемой почве являлись *Aspergillus fumigatus* и *A. niger*.

В рекультивируемых с использованием препарата Елена почвах происходило снижение частоты встречаемости фитотоксичных микромицетов *Aspergillus fumigatus*, *Paecilomyces variotii* по сравнению с загрязненными аналогами почв (табл. 4). Внесение биопрепаратов Азолен и Елена в исследуемую почву приводило к снижению видового разнообразия микроскопических грибов (рис. 9). Лишь при использовании биопрепаратов в почве со средним уровнем загрязнения (4%) происходило увеличение видового



разнообразия микромицетов по сравнению с загрязненным аналогом, однако этот показатель не достигал значения такового в чистой почве.

Таблица 4

**Комплексы микромицетов торфяно-глеевой почвы, загрязненной нефтью и при биоремедиации**

Варианты	К	8% нефти	8% нефти + Азолен	8% нефти + Елена
Виды	Частота встречаемости, %			
* <i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen.	С	70,8/75	27,1/50	50/50
* <i>A.niger</i> Tiegh.	С	25/50	12,5/50	50/50
<i>A. restrictus</i> G. Sm.	-	-	29,5/50	-
<i>Sphaerostilbella aureonitens</i> (Tul. & C. Tul.) Seifert, Samuels & W. Gams	22,9/75	С	22,9/50	-
<i>Mortierella</i> sp.	8,33/50	-	С	-
<i>Oidiodendron flavum</i> Svilv.	12,5/50	-	-	-
* <i>Paecilomyces variotii</i> Bainier	-	50/75	33,3/50	-
<i>Paecilomyces carneus</i> (Duché & R. Heim) A.H.S. Br. & G. Sm.	-	-	-	25/50
* <i>Penicillium canescens</i> Sopp	34,5/100	41,7/50	-	-
* <i>P.funiculosum</i> Thom	-	-	14,6/50	-
* <i>P. paxilli</i> Bainier	-	-	14,6/50	-
<i>Mucor</i> sp.	-	С	45,8/75	-
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	-	37,5/50	-	-
<i>Trichoderma hamatum</i> (Bonord.) Bainier	52,1/75	-	-	16,7/50
* <i>T. koningii</i> Oudem.	20,8/75	-	-	25/50
<i>T. viride</i> Pers.	12,5/50	-	-	-
Н	2,23	2,32	2,00	1,95

Примечание: \* - фитотоксичный вид, К – контроль, Н – индекс разнообразия Шеннона

Расчет коэффициентов сходства комплексов микромицетов загрязненных и рекультивируемых вариантов с чистой фоновой почвой показал, что внесение биопрепаратов Азолен и Елена приводило к некоторому увеличению их сходства с чистой (табл. 5). Однако в случае сильно загрязненных почв биоремедиация не восстанавливала видовую структуру комплекса микромицетов.

Таблица 5

**Коэффициенты сходства Сьеренсена-Чекановского микобиот рекультивируемых и загрязненных нефтью почв с фоновой почвой**

Концентрация нефти, %	Варианты опыта			
	Без препарата	Азолен	Без препарата	Елена
1	0	0,05	0	0,14
4	0,20	0,46	0,20	0,20
8	0,18	0,07	0,18	0,10

Применение биопрепаратов для биоремедиации нефтезагрязненной почвы способствовало снижению ее фитотоксичности и достижению значений, сопоставимыми с показателями незагрязненной почвы.

Численность УОМ увеличивалась при использовании биопрепаратов Елена - при всех концентрациях нефти, при внесении Азолен - при сильном загрязнении (8%), что коррелировало со степенью деградации углеводов.

Торфяно-глеевая почва характеризуется значительно меньшими (на порядок) по сравнению с серой лесной почвой показателями каталазной активности. Активность фермента при внесении биопрепаратов и Елена возрастала, что говорит о стимулировании окислительно-восстановительных процессов в почве.

Таким образом, применение для биоремедиации нефтезагрязненной почвы биопрепаратов Азолен и Елена способствовало изменению видового состава микромицетов загрязненной почвы и подавлению фитотоксичных, фитопатогенных и оппортунистических видов микромицетов. Внесение биопрепаратов в загрязненную нефтью почву приводило к усилению деградации остаточных углеводов, способствовало снижению фитотоксичности нефтезагрязненных почв.

## Глава 5. Сравнение микобиот серой лесной и торфяно-глеевой почвы при нефтяном загрязнении и биоремедиации

В пятой главе приводятся результаты сравнения комплексов микромицетов нефтезагрязненных и рекультивированных с использованием биопрепаратов Азолен и Елена серых лесных и торфяно-глеевых почв.

Сходства между незагрязненными почвами разных регионов обнаружено не было. Однако комплексы микромицетов **некоторых** нефтезагрязненных почв разных типов проявляли небольшое сходство. Длительное нефтяное загрязнение торфяно-глеевой почвы приводило к таким изменениям в комплексе микромицетов, которые приближали его к комплексу микромицетов незагрязненной серой лесной почвы. Максимальное сходство по коэффициенту Жаккара выявлено в парах серая лесная почва (фон – 0,17 мг/г углеводов) – торфяно-глеевая (5,16 мг/г углеводов), серая лесная (фон – 0,14 мг/г углеводов) – торфяно-глеевая (56 мг/г углеводов), по мере увеличения содержания нефтепродуктов в торфяно-глеевой почве сходство уменьшалось. Среди условно патогенных для человека, патогенных для растений и выделяющих токсины видов общими для исследованных почв были *Aspergillus fumigatus* и *Aspergillus niger*.

В условиях модельного опыта показано, что комплексы микромицетов фоновой торфяно-глеевой почвы не проявляли или проявляли минимальное сходство с комплексами серой лесной почвы. При этом видами, общими как для серых лесных, так и для торфяно-глеевых почв были *Aspergillus fumigatus*, *A.niger*, *Penicillium canescens*, *P.funiculosum* и *Mucor hiemalis*.

Анализ микобиот серой лесной и торфяно-глеевой почв, загрязненных нефтью и рекультивированных с помощью Азолена, показал, что оба воздействия оказывали влияние на **их** соотношение (рис. 10).

В серой лесной почве внесение Азолена в почву с уровнем загрязнения нефтью 4% приближало микобиоту этого варианта к контролю. Для микромицетов торфяно-глеевой почвы оба воздействия оказались более значимыми и вызывали существенные изменения в видовом составе комплексов. Внесение Азолена не приводило к сближению комплексов чистой и рекультивированной торфяно-глеевой почвы.

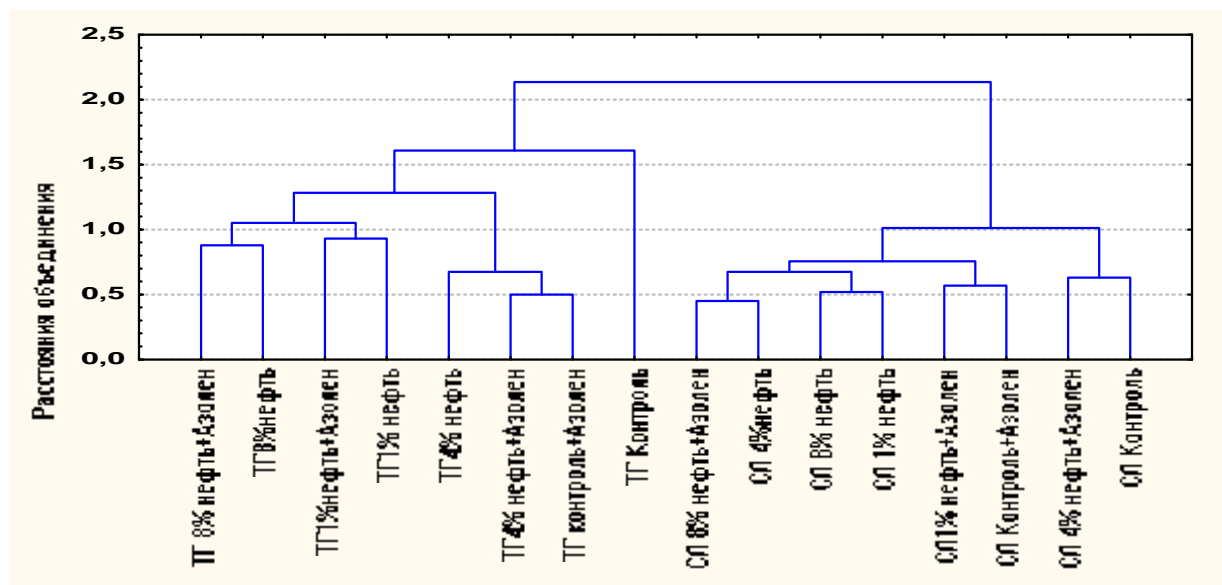


Рис. 10. Сходство структуры комплексов микромицетов серой лесной (СЛ) и торфяно-глеевой (ТГ) почв при загрязнении нефтью и биорекультивации препаратом Азолен

Исследование микобиот изученных типов почв показало, что как нефтяное загрязнение, так и биорекультивация препаратом Елена приводили к существенным изменениям в видовой структуре комплексов (рис. 11).

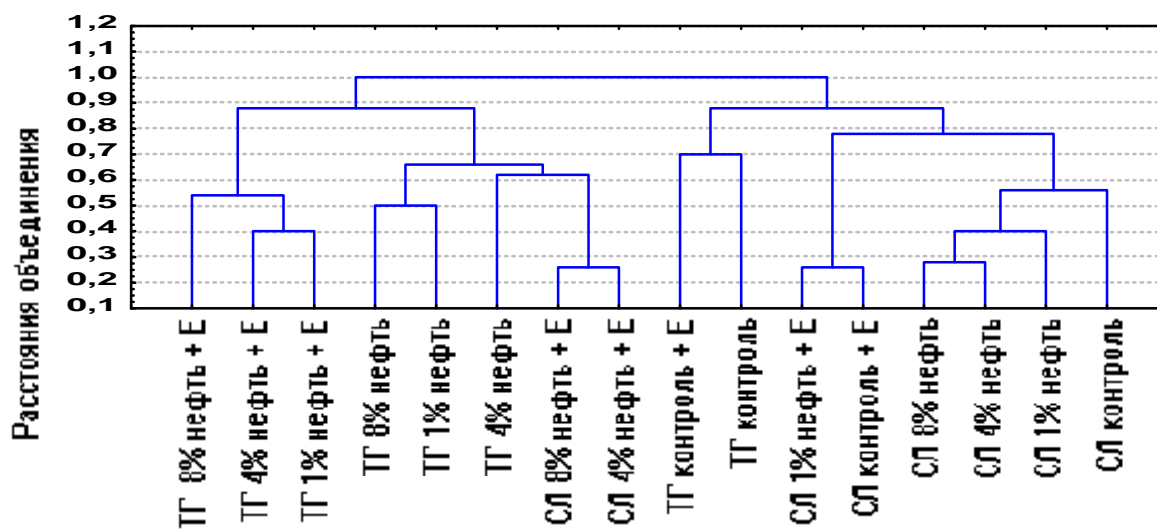


Рис. 11. Сходство структуры комплексов микромицетов серой лесной (СЛ) и торфяно-глеевой (ТГ) почв при загрязнении нефтью и биорекультивации препаратом Елена

Если загрязнение нефтью в возрастающих концентрациях не приводило к значимым изменениям в структуре комплексов грибов серой лесной почвы –

они объединены в один кластер, то совместное влияние других факторов вызвало сближение комплексов микромицетов серой лесной почвы, загрязненной нефтью в концентрации 4 и 8% и рекультивированной с использованием биопрепарата Елена, с нефтезагрязненными торфяно-глеевыми почвами.

Загрязнение и биорекультивация являлись мощными трансформирующими факторами, особенно для микобиот почв, находящихся в суровых климатических условиях. Несмотря на присутствие многочисленных и разнообразных популяций микромицетов в торфяно-глеевой почве ее микобиота оказалась более уязвимой для антропогенного стресса, чем комплексы микромицетов серой лесной почвы.

Таким образом, на характер и выраженность изменений комплексов микромицетов изученных почв оказала влияние вся совокупность антропогенных факторов. Длительное нефтяное загрязнение приводило к сближению микобиот торфяно-глеевой и незагрязненной серой лесной почв. Свежее загрязнение нефтью и последующая рекультивация биопрепаратами, отличающимися по свойствам, изменяли комплексы микромицетов в зависимости от особенностей интродуцированных микробных популяций.

### Выводы

1. На основании исследований серой лесной почвы Республики Башкортостан и торфяно-глеевой почвы Республики Коми установлено, что загрязнение нефтью в концентрациях 1-8% приводит к изменению видовой структуры грибных комплексов, уменьшению видового разнообразия. В почвах возрастает частота встречаемости и обилие фитотоксичных, фитопатогенных и условно патогенных для человека и животных видов микромицетов.
2. Установлены сходные тенденции изменений комплексов микроскопических грибов серой лесной и торфяно-глеевой почв под воздействием нефтяного загрязнения и применения биопрепаратов Ленойл, Азолен, Елена. Показано, что длительное нефтяное загрязнение приводит к увеличению сходства между комплексами микромицетов изученных типов почв.
3. Выявлены общие для изученных типов почв виды микромицетов устойчивые к нефтяному загрязнению - *Aspergillus fumigatus*, *A.niger*, *Penicillium funiculosum* и *Mucor hiemalis*.

4. Установлена однотипная реакция микробиот торфяно-глеевой и серой лесной почв на нефтяное загрязнение, заключающаяся в подавлении развития микроорганизмов цикла азота, снижении каталазной активности.
5. Использование биопрепаратов Елена и Азолен для биоремедиации почв изученных типов способствует ускорению биodeградации углеводов (возрастает в ряду Ленойл-Азолен-Елена в серой лесной почве и в ряду Елена - Азолен в торфяно-глеевой почве), уменьшению доли потенциально опасных для растений, человека и животных видов микромицетов (по мере усиления воздействия Ленойл-Азолен-Елена), восстановлению основных показателей биологической активности, снижению фитотоксичности почвы (Ленойл>Азолен>Елена).

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

1. Киреева Н.А., **Рафикова Г.Ф.** Потенциально патогенные микромицеты нефтезагрязненных почв Республики Башкортостан и Коми // Проблемы медицинской микологии. - 2006. - Т. 8, №2. - С.45-46.
2. Киреева Н.А., Маркарова М.Ю, Щемелинина Т.Н., **Рафикова Г.Ф.** Ферментативная и биологическая активность загрязненных нефтью глееподзолистых почв на разных стадиях восстановления // Вестник Башкирского университета. - 2006. - №4. - С. 57-60. (опубликовано до 31.12.2006)
3. Киреева Н.А., **Рафикова Г.Ф.** Мероприятия по снижению накопления потенциально патогенных видов грибов в антропогенно нарушенных почвах // Проблемы медицинской микологии. - 2007. - Т. 9, №2. - С.62-63.
4. 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.
5. Киреева Н.А., **Рафикова Г.Ф.**, Бакаева М.Д. Влияние нефтяного загрязнения на микромицеты серой лесной почвы Республики Башкортостан и глееподзолистой почвы республики Коми // Микология и фитопатология. - Т. 41, вып. 2. - 2007. - С. 164-171.
6. 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.

7. Киреева Н.А., **Рафикова Г.Ф.** Потенциально-патогенные микромицеты в нефтезагрязненных почвах // Проблемы медицинской микологии. -2008. - Т. 10, №2. - С.50.

8. Киреева Н.А., **Рафикова Г.Ф.**, Щемелинина Т.Н., Маркарова М.Ю. Биологическая активность загрязненных нефтью и рекультивируемых торфяно-глеевых почв Республики Коми // Агрехимия. – 2008. - №8. – С. 68-75.

9. Бакаева М.Д., Тарасенко Е.М., **Хабибуллина Г.Ф.**, Федотов А.В. Особенности роста и развития люцерны (*Medicago sativa* L.) на нефтезагрязненных почвах // Биология – наука XXI века. Сб. тезисов 7-ой Пущинской школы-конф. молодых ученых. - Пущино, 2003. - С.151.

10. Бакаева М.Д., **Хабибуллина Г.Ф.** Формирование комплексов микроскопических грибов под посевами люцерны в условиях нефтяного загрязнения // Человек и почва в XXI веке. Тез. докл. Всероссийской конференции «VII Докучаевские молодежные чтения». - С-Пб, 2004. - С. 34-35.

11. Федотова Т.В., **Хабибуллина Г.Ф.** Активность ассоциации углеводородокисляющих микроорганизмов в почве в условиях загрязнения нефтью и пластовыми водами // Биология – наука XXI века. Сб. тезисов 9-ой Пущинской школы-конф. молодых ученых. - Пущино, 2005. - С. 245.

12. Киреева Н.А., **Рафикова Г.Ф.** Биоразнообразие спорообразующих микроорганизмов в условиях нефтяного загрязнения почвы // Микроорганизмы и биосфера. Тез. Междунар. науч. конф. - Москва, 2007. - С.58-59.

13. Киреева Н.А., **Рафикова Г.Ф.** Диагностика нефтезагрязненных почв по показателям комплекса микромицетов // Современные проблемы загрязнения почв. Сб. материалов II Междунар. науч. конф. - Москва, 2007. - Т.2. - С. 80-82.

14. Киреева Н.А., **Рафикова Г.Ф.** Развитие потенциально патогенных видов микроскопических грибов при нефтяном загрязнении почвы // Успехи медицинской микологии. Материалы пятого Всероссийского конгресса по медицинской микологии.- Москва: Национальная Академия Микологии, 2007. - Т. IX. - С.49-51.

15. **Рафикова Г.Ф.** Сравнительный анализ структуры комплекса микромицетов почв республики Башкортостан и республики Коми // Ломоносов-2006. Секция «Почвоведение». Тез. докл. Междунар. науч. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых. - Москва, 2007. - С. 126-127.

16. Kireeva N.A., **Rafikova G.F.**, Vodopyanov V.V. Transformations in species composition of micromycetes in soils, polluted by oil // XV Congress of European Mycologists. Abstracts. -Saint Petersburg, 2007. - P. 78.

17. Киреева Н.А., **Рафикова Г.Ф.** Структура комплексов микромицетов в нефтезагрязненных почвах и при рекультивации с использованием биопрепарата // Современная микология в России. Тез. докладов Второго съезда микологов России. - Москва, 2008. - Т. 2. - С. 387-389.