

На правах рукописи

САЛАХОВА  
ГУЛЬНАРА МИРЗАЛИФОВНА

**ИЗМЕНЕНИЯ ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ  
РАСТЕНИЙ И РИЗОСФЕРНОЙ МИКРОБИОТЫ В УСЛОВИЯХ  
НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ И РЕКУЛЬТИВАЦИИ ПОЧВЫ**

Специальность 03.00.16 - Экология  
03.00.12 - Физиология и биохимия растений

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Уфа - 2007

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  
доктор биологических наук  
Хазиахметов Рашит Мухаметович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор  
Габбасова Илюса Масгутовна  
доктор биологических наук, профессор  
Шакирова Фарида Миннихановна

Ведущая организация: ГОУ ВПО Удмуртский государственный университет (г.Ижевск)

Защита диссертации состоится « 14 » ноября 2007 года в 14.00 часов на заседании Регионального диссертационного совета КМ 002.136.01 при Институте биологии Уфимского научного центра Российской Академии Наук по адресу: 450054, г.Уфа, пр.Октября, д.69, тел.: (347) 235-53-62, e-mail: [ib@anrb.ru](mailto: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 «\_\_\_» октября 2007 года

Ученый секретарь  
Регионального диссертационного  
совета, кандидат биологических наук



Р.В. Уразгильдин

**Актуальность темы.** Загрязнение окружающей среды в результате техногенной деятельности человека ухудшает экологическую обстановку на достаточно обширных территориях.

Наиболее типичными антропогенными факторами загрязнения окружающей среды, в том числе и почвы, в Республике Башкортостан являются нефть и нефтепродукты. Последние оказывают негативное влияние на живые организмы и, в первую очередь, на сосудистые растения, которые вследствие прикрепления к субстратам (почве) постоянно подвергаются воздействию как глобального, так и локального загрязнения, и могут поглощать разнообразные загрязнители. Растения являются основой любого биогеоценоза, и поэтому отклонения биохимических, физиологических реакций растений, весьма чувствительных к изменению условий среды, могут служить индикатором ее состояния.

В процессе своей жизнедеятельности растения входят в сложные взаимоотношения с микроорганизмами, населяющими почву (Звягинцев, 1983). В естественных условиях обитания микроорганизмы, окружающие растения, влияют на их рост и развитие. В свою очередь, каждая культура, стимулируя рост, селекционирует определенную микробиоту (Лугаускас, 1988), так как ризосфера растений является зоной, в которой происходит адаптация почвенной микробиоты к условиям, создаваемым активно растущими растениями (Кравченко, 2001).

Загрязнение природной среды вызывает ответные реакции во всех компонентах экосистемы, в том числе и в растительно-микробных комплексах, нарушая, как считают О.В. Турковская и А.Ю. Муратова (2005), сложившиеся тысячелетиями механизмы их взаимодействия. Изучение микроорганизмов, обитающих в нефтезагрязненных почвах важно и в связи с их участием в утилизации углеводов. Поэтому представляет значительный интерес системное изучение действия нефти на некоторые эколого-физиологические параметры роста и развития растений и их ризосферную микробиоту.

**Целью работы** явилось определение эколого-физиологического эффекта нефтяного загрязнения почвы и рекультивации на некоторые сельскохозяйственные культуры и декоративные растения и комплекс ризосферных микроорганизмов.

В соответствии с поставленной целью решались следующие **задачи**:

- исследовать воздействие нефтяного загрязнения и рекультивации почвы на физиологические и экологические параметры роста и развития высших растений и состояние хромосомного аппарата;

- изучить численность и структуру микробных комплексов ризосферы растений, выращенных на нефтезагрязненных и рекультивируемых почвах.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Экологические условия произрастания растений (нефтяное загрязнение почвы, биоремедиация с внесением биопрепарата) влияют на рост и развитие и формируют неспецифический физиолого-биохимический ответ, который выражается в изменении морфологических параметров, снижении продуктивности, накоплении пигментов, вторичных метаболитов, повышении активности окислительно-восстановительных ферментов, снижении митотического индекса меристематических клеток корней, дегградации хромосом.

2. Нефтяное загрязнение почвы меняет структуру микробного комплекса ризосферы растений, в которой доминирующими становятся углеводородокисляющие микроорганизмы.

3. Биоремедиация нормализует структуру микробного комплекса ризосферы растений, восстанавливает численность целлюлозолитиков, снижает численность фитопатогенных форм микроскопических грибов.

**Научная новизна.** Впервые показано накопление бенз(а)пирена в растениях, выращенных на нефтезагрязненных почвах. Обнаружен факт угнетения процесса клеточного деления. Исследовано положительное влияние биопрепарата Бациспектин на нормализацию физиологических показателей развития растений, выращенных на нефтезагрязненных почвах.

Исследованы микробные комплексы ризосферы выбранных растений в условиях нефтяного загрязнения и рекультивации с применением биопрепарата Бациспецин.

**Практическая значимость.** Предложенные методы и полученные результаты позволяют дать оценку эколого-физиологического состояния растений и ризосферной микробиоты в условиях техногенных загрязнений. Полученные результаты исследований могут быть использованы в учебном процессе в рамках дисциплин «Рекультивация нарушенных земель», «Техногенные системы и экологический риск».

**Личное участие автора.** Автором проведены аналитический обзор литературы, экспериментальные работы и написан текст диссертационной работы.

**Обоснованность выводов и достоверность результатов работы** обеспечены большим объемом лабораторных и полевых экспериментов с применением современных методов. Результаты обработаны математически.

**Апробация работы.** Основные положения и результаты диссертационной работы были представлены на конференциях «Стратегия природопользования и сохранения биоразнообразия в XXI веке» (Оренбург, 2004), «Актуальные экологические проблемы Республики Татарстан» (Казань, 2004), «Популяции в пространстве и времени» (Н.Новгород, 2005), «Растительные ресурсы: опыт, проблемы и перспективы» (Бирск, 2005), «Современные проблемы аграрной науки и пути их решения» (Ижевск, 2005), «Современные аспекты экологии и экологического образования» (Казань, 2005), «Уралэкология. Природные ресурсы – 2005» (Уфа, 2005), «Современные тенденции в биологических науках в XXI веке» (Бирск, 2005), «Проблемы геоэкологии Южного Урала» (Оренбург, 2005, 2007), «Вопросы общей ботаники: традиции и перспективы» (Казань, 2006), «Адаптация биологических систем к естественным и экстремальным факторам среды» (Челябинск, 2006), на Международной конференции молодых ботаников в Санкт-Петербурге, (Санкт-Петербург, 2006).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 14 научных работ, в том числе 1 статья в журнале, рекомендованном ВАК, одна статья находится в печати.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, списка литературы, включающего 325 источника, в том числе 109 на иностранных языках, и приложения. Работа изложена на 190 страницах машинописного текста, иллюстрирована 44 рисунками и содержит 21 таблицу.

**Благодарности.** Автор выражает огромную благодарность и признательность за неоценимую помощь и поддержку научным руководителям проф. д.б.н. Киреевой Н.А. и д.б.н. Хазиахметову Р.М., а также к.б.н. Башировой Р.М. за консультации при проведении исследований оптических характеристик пигментов растений, к.б.н. Юмагужину М.С. за помощь при проведении цитогенетических исследований и асп. Ерохиной Н.И. за содействие при определении содержания бенз(а)пирена, а также всем коллегам и соавторам публикаций.

## **ВЛИЯНИЕ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ НА ВЫСШИЕ РАСТЕНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)**

Приведен обзор литературы по влиянию нефтяного загрязнения почвы на древесные и травянистые растения. Выявлены факторы, определяющие степень воздействия загрязнителя. Рассмотрены публикации по проблемам фитомелиорации и фиторемедиации антропогенных земель. Проанализирована возможность использования растений для биоиндикации и биотестирования. На основе критического анализа данных литературы определены методология и основные направления исследования.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Материалом для исследований служили семена, проростки, вегетативные части растений яровой пшеницы *Triticum aestivum L.*, районированный сорт Жница. Для постановки модельных опытов, отработки методик, проведения экологических, физиологических, биохимических

исследований эпизодически были использованы: пшеница яровая, твердая (*Triticum durum* L.) сорт Ник, рожь (*Secale cereale*) сорт Чулпан, ячмень (*Hordeum distichon* L.), сорт Омский – 86, гречиха (*Fagopyrum esculentum* L.), сорт Чишминская, бархатцы (*Tagetes erecta*), зверобой (*Hypericum perforatum*), базилик (*Ocimum basilicum*).

Исследования проводились на местах разливов нефти путем закладки пробных площадок на трансектах, проходящих через участки с максимальным загрязнением. Токсичность нефти изучалась на стационарных площадках с внесением нефти на целинных и пахотных почвах, а также в микровегетационных и лабораторных опытах с внесением нефти и нефтепродуктов, биопрепарата Бациспецин.

Влияние нефти оценивали по всхожести семян, энергии прорастания, дружности и скорости прорастания, а также по морфологическим параметрам растений и массе 1000 зерен. Характеристики корневой системы, ассимиляционную поверхность листьев и их водоудерживающую способность определяли по общепринятым в физиологии растений методам (Практикум..., 1991). Интенсивность дыхания и дыхательный коэффициент – на приборе Варбурга (Практикум..., 1990). Содержание сырого протеина в зерне, аскорбиновой кислоты и рибофлавина в листьях, активность пероксидазы и полифенолоксидазы в листьях и корешках растений определяли по методам, описанным в (Лабораторный..., 2004). Содержание бенз(а)пирена – спектрофлуориметрическим способом (Трубникова и др., 2006). Пигменты экстрагировали метанолом и снимали спектры поглощения на приборе UV-2401 PC Shimadzu. Митотическую активности меристематических клеток растений определяли по (Паушева, 1988). О жизнеспособной пыльце судили по наличию активных дыхательных ферментов дегидрогеназ.

Учет численности микроорганизмов в ризосфере проводили общепринятыми методами посева на агаризованные питательные среды. Определение культур бактерий производили, руководствуясь определителем

Берджи (Определитель..., 1997) и пособием для идентификации бактерий (Добровольская и др., 1989). Видовое разнообразие микромицетов определяли, используя принятые в микологии определители (Raper, Fenell, 1965; Raper, Thom, 1968; Watanabe, 2000).

Математическую обработку материала проводили с помощью пакета компьютерных программ Statistica V 6.0 и Microsoft Office 2000 для Windows.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ РОСТА И РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ ПРИ ЗАГРЯЗНЕНИИ ПОЧВЫ НЕФТЬЮ И РЕКУЛЬТИВАЦИИ**

Показано значительное влияние нефти на морфологические показатели исследуемых сельскохозяйственных растений. Анализ показателей всхожести семян, количества, линейных размеров и веса листьев, стеблей и корней, содержания белка в сухой массе и продуктивности растений в полевых и лабораторных условиях позволил уточнить данные о количественной взаимосвязи разных уровней загрязнения темно-серой лесной почвы нефтью. Так при концентрации нефти в почве 6% и 8% в лабораторных условиях, не проросло ни одного семени растений. Показано также, что у растений, выращенных в почвах, загрязненных нефтью, были обнаружены определенные изменения в линейных размерах корней, надземной части. Например, если в контроле длина надземной части пшеницы в возрасте 20 суток составляла 26,05 см, то в варианте с концентрацией нефти 2% от веса почвы длина растения была лишь 15,91 см.

В полевых условиях наблюдалась аналогичная картина влияния нефтяного загрязнения почвы на рост и развитие растений яровой пшеницы, однако растения были устойчивы и к более высоким концентрациям поллютанта (6-10%).

Статистическая обработка данных показала наличие достоверной разницы между высотой растений пшеницы в вариантах опыта с внесением

и без внесения биопрепарата Бациспектин, что свидетельствует об отзывчивости растений яровой пшеницы на обработку нефтезагрязненной почвы. Растения на нефтезагрязненной почве без внесения биопрепарата росли слабыми, высота их составила 61-65% от контроля. В варианте с применением Бациспектина они достигали контрольного уровня при низкой концентрации нефти в почве 3% и были лишь на 26% ниже при начальном содержании нефти 10% (табл. 1).

Корневая система в гораздо меньшей степени ингибировалась загрязнителем и действие Бациспектина на нее проявлялось не столь эффективно.

**Таблица 1**

**Рост и развитие яровой пшеницы (фаза кущения) на темно-серой лесной почве, загрязненной нефтью и рекультивации**

Варианты опыта (концентрация нефти, %)		Показатели			
		Высота растений, см	Количество листьев, шт	Количество придаточных корней, шт	Средняя длина придаточных корней, см
Контроль 0	1	16,9±0,34	4,13±0,06	3,10±0,04	3,04±0,08
	2	20,5±0,21	4,83±0,09	3,33±0,03	2,98±0,18
3%	1	11,0±0,76	2,45±0,05	1,90±0,12	1,74±0,16
	2	16,4±0,37	3,48±0,05	2,10±0,14	2,08±0,22
6 %	1	10,2±0,65	2,40±0,07	1,48±0,06	2,74±0,13
	2	14,4±0,19	3,30±0,04	2,50±0,11	2,61±0,25
10 %	1	10,4±0,98	2,55±0,09	2,10±0,015	2,40±0,28
	2	12,6±0,87	2,93±0,08	2,20±0,08	2,48±0,11

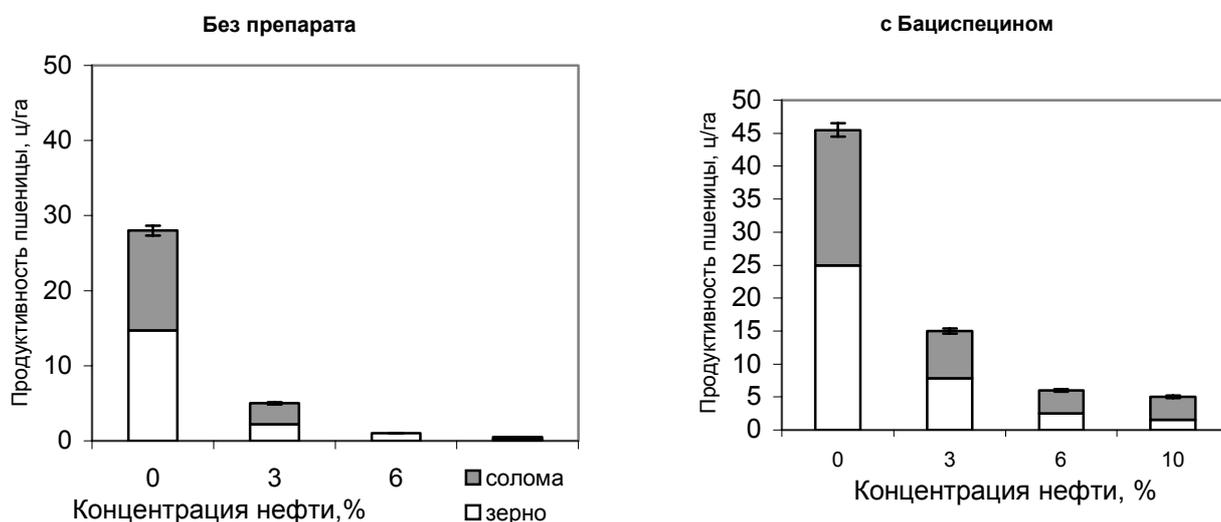
**Примечание:** 1 – без обработки; 2 – с внесением Бациспектина.

Интегральным показателем интенсивности роста и развития сельскохозяйственных растений является их продуктивность.

При загрязнении нефтью почвы 3% продуктивность пшеницы снизилась на 85%. Под действием препарата Бациспектин продуктивность пшеницы повысилась, но не достигало контрольного уровня (рис.1).

Схожие данные получены при изучении влияния загрязнения почвы нефтью на другие растения: ячмень и гречиху.

Воздействие нефтяного загрязнения на растения пшеницы и ячменя вызывало значительные изменения в функциональном состоянии растений, что, прежде всего, отражалось на окислительно-восстановительных процессах, осуществляемых пероксидазами и полифенолоксидазами.



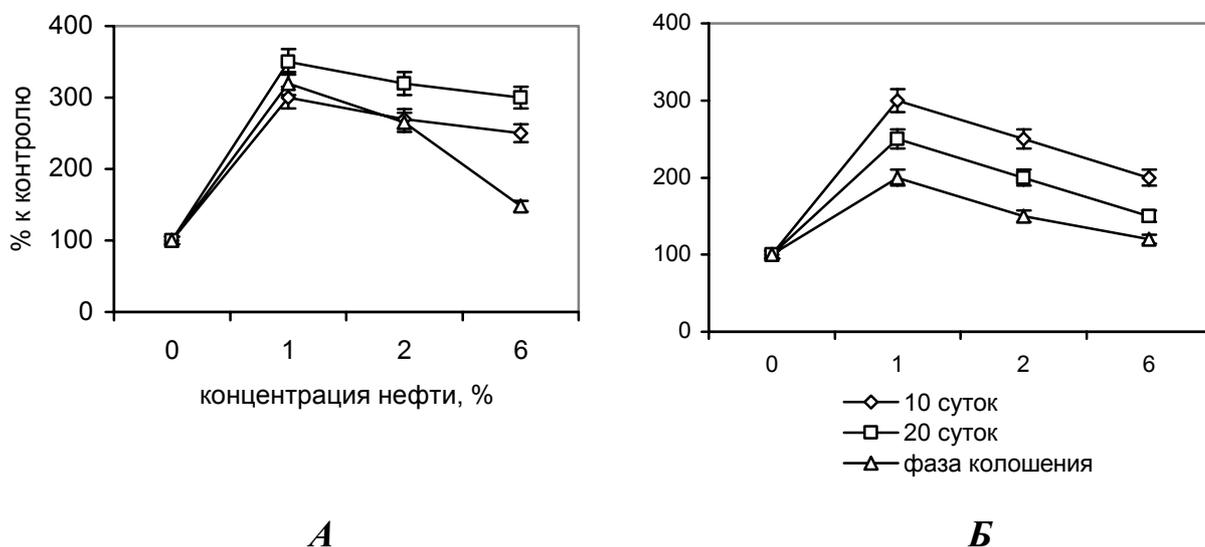
**Рис. 1. Продуктивность яровой пшеницы на нефтязагрязненных и рекультивируемых почвах**

Показано, что степень влияния нефтяных углеводородов на активность оксидаз растений пшеницы определялась концентрацией поллютанта и была неоднозначной в различных органах тестируемого растения. Под действием различных концентраций нефти происходило достоверное увеличение активности **пероксидаз** как в листьях (в 1,5 – 3,5 раза), так и корнях (в 1,5 – 2,5 раза) растений пшеницы (рис. 2, А).

Причем, с увеличением возраста растений активность этой группы ферментов повышалась. С повышением концентрации поллютанта, наоборот, значение величины активности снижалось, но сохранялось достоверно выше значений у растений, выращенных на незагрязненной (контрольной) почве.

В листьях пшеницы, выращенной на рекультивируемых почвах, активность пероксидаз сохранялась высокой (рис. 2, Б). Активность ферментов в листьях растений пшеницы, выращенных на рекультивируемой почве, была ниже, что, вероятно, свидетельствует о снижении уровня токсичности нефти для этих растений. Вероятно, внесение биопрепарата

Бациспектин изначально характеризующегося антифугальной активностью, способствовало уменьшению численности грибов-фитопатогенов в нефтезагрязненной почве, что и способствовало нормализации активности пероксидаз и полифенолоксидаз в листьях растений пшеницы.



**Рис. 2. Влияние различных концентраций нефти на активность пероксидазы листьев растений пшеницы, выращенной на нефтезагрязненной почве (А) и на нефтезагрязненной рекультивируемой почве (с внесением Бациспектина) (Б)**

В отличие от пероксидаз, повышенная активность полифенолоксидаз у растений пшеницы, выращенных на нефтезагрязненной почве, была отмечена только в листьях. Причем, активность этих ферментов в листьях независимо от концентрации поллютанта и возраста растений в 1,3 –1,6 раз превышала таковые у растений, выращенных на незагрязненной почве. В корнях активность полифенолоксидаз была значительно ниже, чем пероксидаз и под влиянием нефтяных углеводородов снижалась, но не изменялась столь значительно.

Аналогичные данные были получены и в отношении активности пероксидаз и полифенолоксидаз у растений ячменя, выращенных на нефтезагрязненной почве.

В полевых опытах нефтяное загрязнение сильно подавляло развитие листовой поверхности растений пшеницы. По сравнению с контрольным

вариантом **ассимиляционная поверхность** растений пшеницы на загрязненных делянках была в 3-15 раз ниже. Но при загрязнении почвы в концентрации нефти 1% заметно увеличивало ассимиляционную поверхность у растений пшеницы.

Схожие данные получены при изучении влияния нефтяного загрязнения почвы на формирование ассимиляционной поверхности растений гречихи посевной.

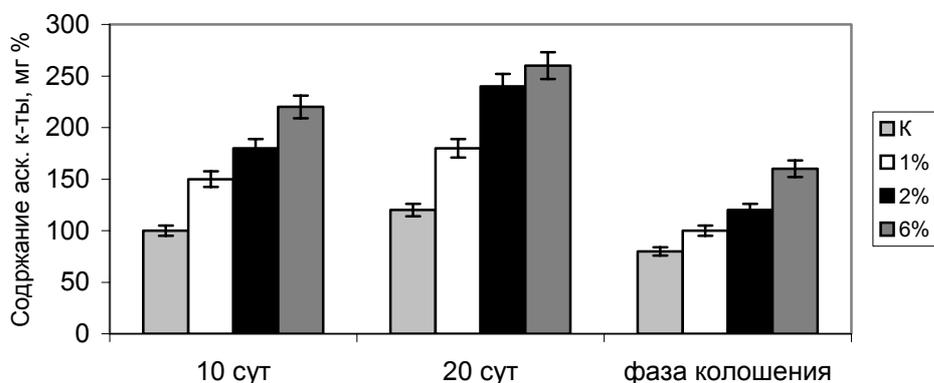
Наиболее показательное влияние загрязнения почвы нефтью проявилось в резком снижении **водоудерживающей способности (ВУС)** листьев яровой пшеницы. При концентрации нефти 2% она составила 92% от контроля и при концентрации 4% снизилась до 6% по сравнению с контролем.

Одной из приспособительных реакций, позволяющих растениям адаптироваться к новым условиям, является изменение содержания пигментов в хлоропластах. Положительное влияние нефти в концентрации 1% отмечено на содержание суммарного **хлорофилла** в листьях пшеницы. В этом варианте опыта содержание хлорофилла на 11% превысило этот показатель в контрольном варианте. В то же время следует отметить, что при загрязнении почвы нефтью в концентрации 4% содержание хлорофилла в листьях пшеницы было почти в 2 раза меньше, чем в контрольном варианте.

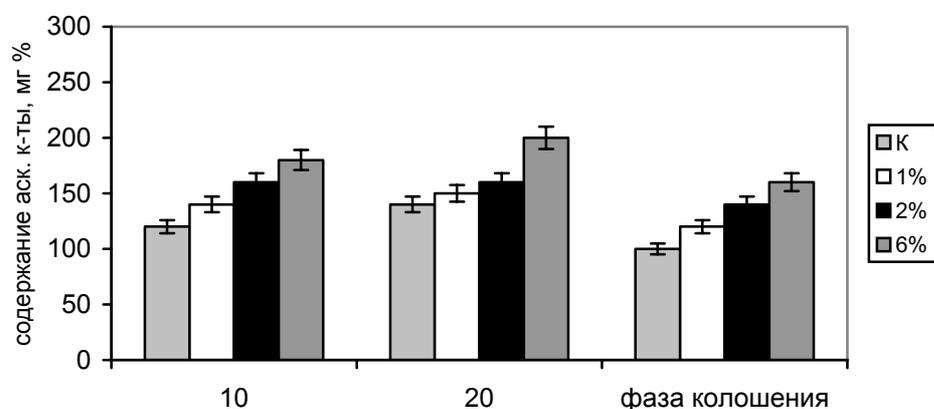
Нефтяной стресс приводил к увеличению содержания **флавоноидов и антоцианов** в растениях, что является свидетельством адаптации растений к поллютанту.

Известно, что одним из веществ, занимающих доминирующее положение во внеклеточной и внутриклеточной антиоксидантной защите является **аскорбиновая кислота** (витамин С). Растения, выращенные на нефтезагрязненных почвах, характеризовались повышенным содержанием аскорбиновой кислоты. В целом, наибольшее содержание аскорбиновой кислоты отмечено в листьях 20-суточных растений пшеницы, выращенных при загрязнении почвы нефтью в концентрации 6% (рис. 3).

Однако, накопление этого вещества в листьях пшеницы, выращенных на нефтезагрязненных рекультивируемых почвах, особенно в первые 10-20 суток развития, несколько снижалось (рис. 3). Это свидетельствует о частичной детоксикации нефтепродуктов в почвах при внесении биопрепарата Бациспецин. В целом же, содержание аскорбиновой кислоты в листьях пшеницы 10-ти, 20-ти суточных проростков и растений, отобранных в фазе колошения сохранялось повышенным и превосходящим таковые значения у растений фонового варианта опыта.



*A*



*B*

**Рис.3. Влияние нефтяного загрязнения почвы на содержание аскорбиновой кислоты в листьях растения пшеницы, выращенной на нефтезагрязненной почве (A) и на нефтезагрязненной рекультивируемой почве (B)**

В условиях нефтяного загрязнения почвы растения ржи так же, как и растения пшеницы, характеризовались повышенным содержанием аскорбиновой кислоты. При этом необходимо отметить, что изначально в

листьях растений ржи содержание аскорбиновой кислоты было достоверно ниже (1,5 раза), чем в листьях растений пшеницы.

Листья базилика, характеризовались исходно высоким, в сравнении с листьями растений пшеницы и ржи, содержанием аскорбиновой кислоты. При загрязнении почвы нефтью содержание аскорбиновой кислоты в листьях базилика возрастало, аналогично листьям пшеницы и ржи, причем этот показатель положительно коррелировал с содержанием поллютанта ( $r = 0,74$ ).

При загрязнении нефтью почвы в листьях растений пшеницы, ячменя и гречихи наблюдалась активация накопления как окисленной, так и восстановленной форм **рибофлавина**. Содержание окисленной формы рибофлавина превысило контрольный уровень в листьях 10-ти и 20-ти суточных проростков пшеницы в 2,0-3,0 раза, а в листьях растений фазы колошения – в 1,5-2,0 раза. Сходные результаты были получены и при анализе содержания восстановленных форм рибофлавина. Содержание этих веществ в листьях 10-ти и 20-ти суточных проростков ячменя и в растениях фазы колошения превышало фоновые значения в 1,5-2,5 раза. При этом необходимо отметить, что накопление обоих форм рибофлавина в листьях ячменя активизировалось в наибольшей степени через 10 и 20 суток после постановки опыта, а в дальнейшем (фаза колошения) содержание витамина В<sub>2</sub> снижалось. Особенно значительная активация накопления рибофлавина наблюдалась при высоком (6 %) уровне загрязнения почвы.

Наиболее токсичными компонентами нефти являются ароматические углеводороды. Среди них индикаторным представителем является **бенз(а)пирен**, который обладает мутагенной и канцерогенной активностью и относится к веществам первого класса опасности (Бензапирен..., 1983). Последнее диктует необходимость его мониторинга в растительных объектах.

В таблице 2 представлены данные по содержанию бенз(а)пирена в растениях, выращенных на нефтезагрязненных почвах. У всех исследуемых

растений, выращенных на фоновой незагрязненной почве содержание бенз(а)пирена в биомассе не превышало фоновые значения и даже было ниже. Превышение фоновых значений содержания бенз(а)пирена в массе растений, в отличие от контрольных, наблюдалось при загрязнении почвы нефтью в концентрации 1%. При этом содержание бенз(а)пирена в растениях пшеницы, ячменя, ржи, гречихи было выше в 2,5 – 3,0 раза, а у базилика, бархатцев, зверобоя в 3,5 – 4 раза. Однако эти значения, за исключением содержания в растениях зверобоя, не превышали региональный фоновый уровень для растений (50 нг/г), но превосходили этот показатель для почвы.

**Таблица 2**

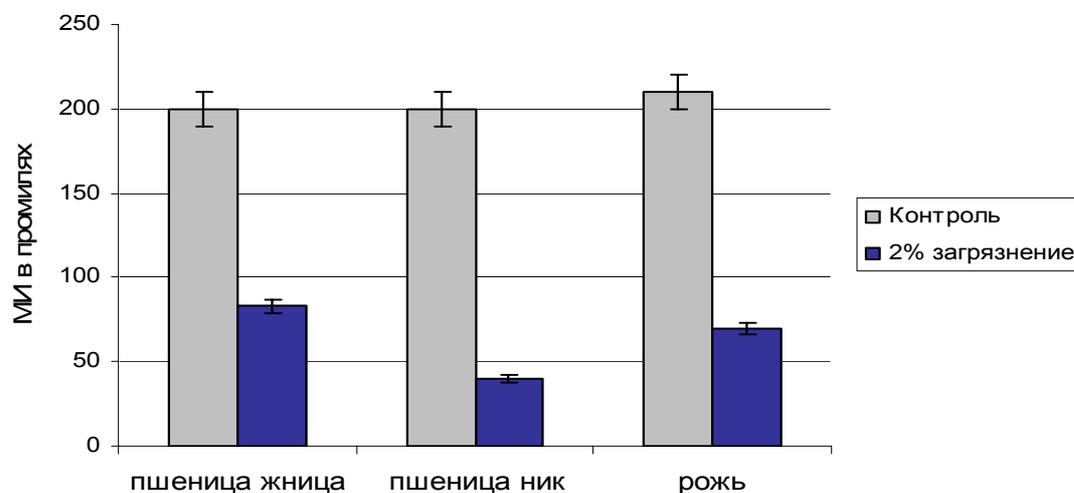
**Содержание бенз(а)пирена в растениях, выращенных на нефтезагрязненных почвах (нг/г)**

Концентрация нефти, %	Пшеница	Ячмень	Рожь	Гречиха	Базилик	Бархатцы	Зверобой
0	13,2 ±3,0	16,4 ±0,8	21,1 ±1,0	18,5 ±0,9	10,5 ±0,5	12,3 ±3,0	15,6 ±0,7
1	40,1 ±2,0	42,1 ±2,0	44,0 ±2,0	38,1 ±1,9	45,0 ±2,5	49,1 ±2,5	58,5 ±2,5
2	62,1 ±3,0	65,0 ±3,1	68,2 ±3,3	70,0 ±3,5	105,0 ±5,0	110,0 ±5,0	124,0 ±6,0
6	197,0 ±9,0	295,0 ±12,0	210,0 ±10,0	220,0 ±10,0	270,0 ±10,0	270,0 ±10,0	340,0 ±17,0

Таким образом, по нашим данным, накопление бенз(а)пирена у растений (пшеница, ячмень, рожь, гречиха), изначально выращенных на нефтезагрязненной почве, идет более медленными темпами, чем у растений (базилик, зверобой, бархатцы), оказавшихся в условиях нефтяного стресса на 30-сутки роста.

Клеточное деление относится к числу важнейших биологических процессов, так как с ним связана передача наследственной информации. Если в ткани больше делящихся клеток, то это характеризует и условия роста растения. Из данных, приведенных на рисунке 4, видно, что у растений, выращенных на загрязненных нефтью почвах, число делящихся клеток меньше по сравнению с растениями, выращенными на почве без загрязнения.

Загрязненная нефтью почва не оказывала отрицательного влияния на жизнеспособность пыльцы растений пшеницы – активность дыхательных ферментов дегидрогеназ оставалась высокой (рис. 5).



**Рис. 4. Влияние загрязнения почвы нефтью на митотический индекс меристематических клеток растений пшеницы ржи**

Таким образом, загрязнение почвы нефтью приводило к нарушению целостности хромосом в соматических клетках исследуемых растений, в частности, нарушения сводились к появлению в хромосомах разрывов с образованием фрагментов.

#### **ЧИСЛЕННОСТЬ И СТРУКТУРА МИКРОБНЫХ КОМПЛЕКСОВ РИЗОСФЕРЫ РАСТЕНИЙ, ВЫРАЩЕННЫХ НА НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ И РЕКУЛЬТИВИРУЕМЫХ ПОЧВАХ**

Численность микроорганизмов различных физиологических групп в ризосфере пшеницы менялась в течение вегетации растения в пределах от нескольких тысяч до миллиардов клеток на 1 г почвы. В первые 10 суток в ризосфере пшеницы снизилась в несколько раз общая численность гетеротрофных микроорганизмов, вероятно, за счет токсического влияния поллютанта. Через 20 суток общая численность их возросла в 2-5 раз, однако, как и в предыдущем случае, высокие (6%) концентрации нефти ингибировали значения этого показателя. Бациспектин оказывал

положительное воздействие на численность гетеротрофных, целлюлозоразрушающих микроорганизмов и актиномицетов в ризосфере растений пшеницы (рис. 5, 6). Как следует из представленных в рисунках данных, наиболее высокая ремедирующая активность проявлялась в середине вегетационного сезона.

Изучение видового состава бактерий позволило выявить, что, в основном, они представлены видами рода *Pseudomonas*, численность которых возросла значительно в условиях нефтяного стресса. Второй по численности были представители рода *Bacillus*. Из актинобактерий в ризосфере пшеницы доминировали представители родов *Streptomyces*, *Micromonospora*.

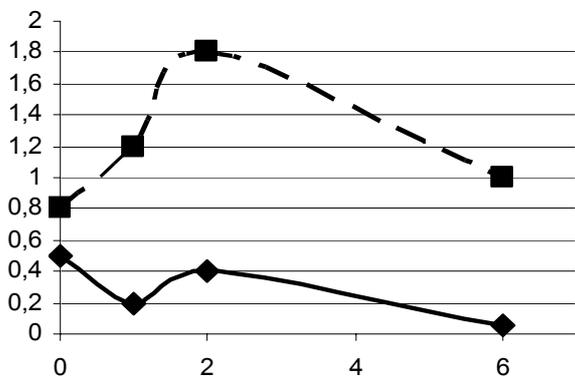
Численность УОМ в ризосфере пшеницы увеличивалась на один-два порядка уже в первые 10 суток роста растений пшеницы (табл. 3). В дальнейшем наблюдалось не только возрастание количества этих микроорганизмов, но и наблюдался «ризосферный эффект».

**Таблица 3**

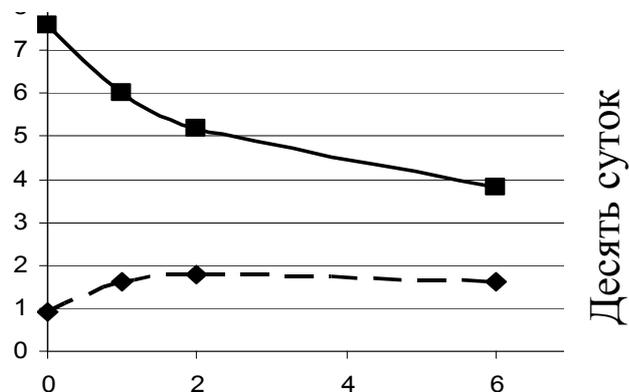
**Численность УОМ в ризосфере яровой пшеницы, выращенной на нефтезагрязненной почве и при рекультивации (КОЕ/г почвы)**

Концентрация нефти, %	Фаза роста пшеницы		
	10 суток	20 суток	Фаза колошения
без обработки Бациспечином			
0	$(1,3 \pm 0,05)10^3$	$(2,8 \pm 0,1)10^3$	$(5,0 \pm 0,2)10^3$
1	$(13 \pm 0,5)10^3$	$(52 \pm 2,1)10^4$	$(50 \pm 2,6)10^6$
2	$(65 \pm 2,4)10^3$	$(18 \pm 0,8)10^6$	$(65 \pm 2,7)10^6$
6	$(13 \pm 0,5)10^4$	$(65 \pm 0,3)10^3$	$(12 \pm 0,3)10^7$
внесение Бациспечина			
0	$(2,6 \pm 0,1)10^3$	$(5,2 \pm 0,2)10^3$	$(9,0 \pm 0,4)10^3$
1	$(2,8 \pm 1,1)10^3$	$(12 \pm 0,5)10^5$	$(14 \pm 0,5)10^7$
2	$(12 \pm 0,5)10^4$	$(40 \pm 2,2)10^6$	$(18 \pm 0,6)10^7$
6	$(29 \pm 1,1)10^3$	$(14 \pm 0,7)10^7$	$(80 \pm 3,3)10^7$

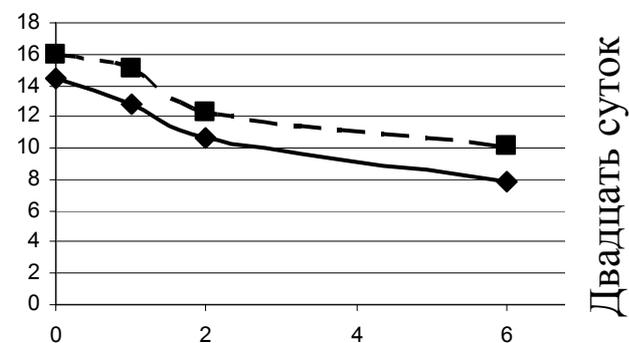
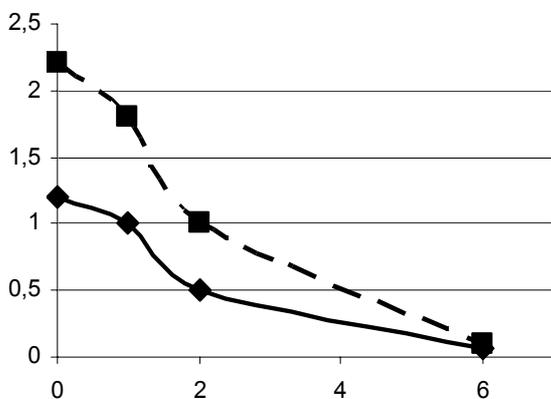
Численность целлюлозо-  
разрушающих микроорганизмов  $10^4$ ,  
КОЕ/г почвы



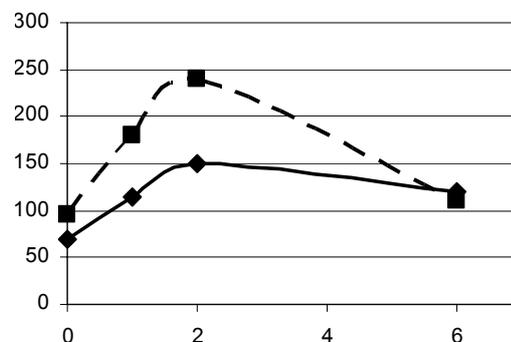
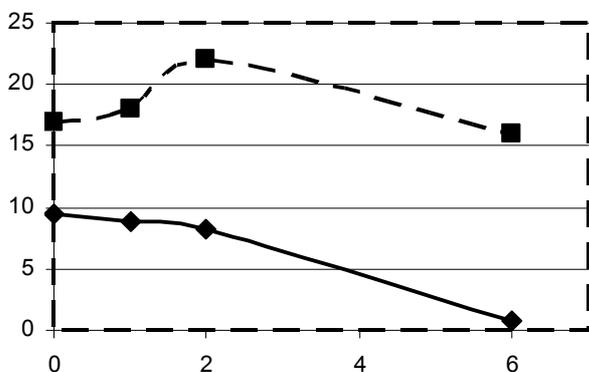
Численность актиномицетов  $10^6$ ,  
КОЕ/г почвы



Десять суток



Двадцать суток

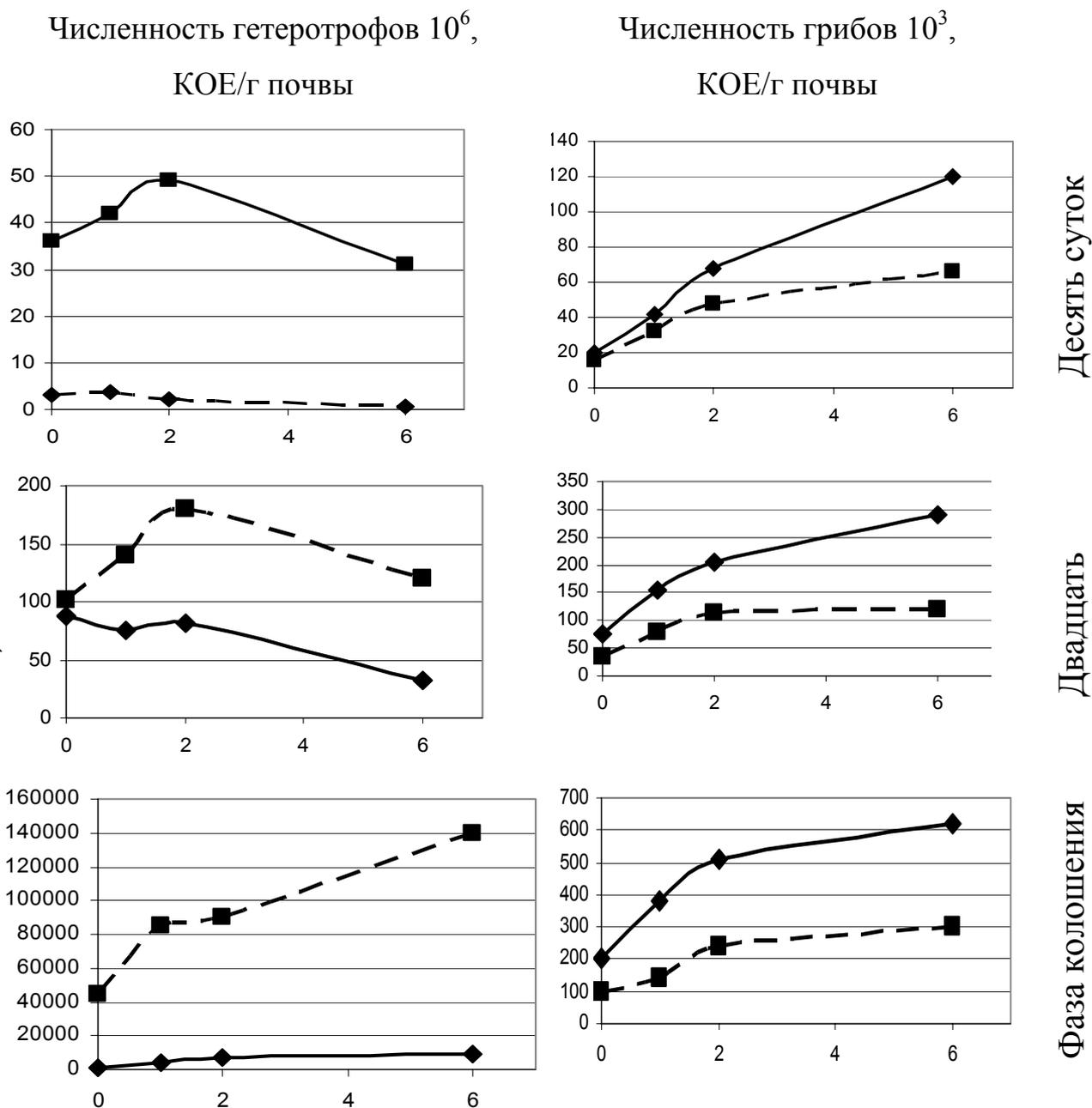


Фаза колошения

**Рис 5. Влияние Бациспечина на численность целлюлозоразрушающих микроорганизмов и актиномицетов в ризосфере пшеницы, произрастающей на почве, загрязненной нефтью (по оси абсцисс – концентрация нефти, по оси ординат – численность микроорганизмов)**  
 —◆—◆— нефтезагрязненная почва  
 --■--■-- нефтезагрязненная почва после внесения Бациспечина

Менее уязвимы к действию углеводов оказались грибы, активно метаболизирующие углеводороды. Их численность в ризосфере пшеницы

возрастала пропорционально уровню загрязнения почвы нефтепродуктами (рис. 6).



**Рис. 6. Влияние Бациспечина на численность гетеротрофных микроорганизмов и грибов в ризосфере пшеницы, выращенной на почве, загрязненной нефтью (по оси абсцисс – концентрация нефти, по оси ординат – численность бактерий и грибов)**

—◆—◆— нефтезагрязненная почва

--■--■-- нефтезагрязненная почва после внесения Бациспечина

Нефтяное загрязнение меняло соотношения встречаемости грибов в течение всего периода наблюдения. В ризосфере пшеницы преобладали представители двух родов *Aspergillus* и *Penicillium*, встречались виды родов

*Fusarium, Chaetomium, Mucor, Trichoderma, Paecilomyces, Humicola, Rhizopus, Verticillium.*

Обработка нефтезагрязненных почв биопрепаратом (рис. 6) способствовало снижению численности грибов в 1,5 – 2 раза в сравнении с вариантами опыта без обработки. При этом встречаемость фитопатогенных грибов, представителей, прежде всего, родов *Fusarium, Verticillium*, значительно падала.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты наших исследований вместе с анализом данных литературы свидетельствуют, что загрязнение почвы нефтью негативно влияет на рост и развитие высших растений.

Обнаружена прямая зависимость между концентрацией загрязнителя и степенью ингибирующего действия на рост и развитие растений.

Загрязнение почвы нефтью отрицательно влияло на детерминанты консорциев – растения, снижая их фотосинтетическую активность и продуктивность, содержание хлорофилла и повышая содержание антоцианов, аскорбиновой кислоты, рибофлавина, активируя активность пероксидазы и полифенолоксидазы, уменьшая количество корневых выделений и органических остатков растений, являющихся важнейшими факторами питания микроорганизмов. Изменялся и состав консорциев – ризосферных микроорганизмов, и в первую очередь, микромицетов.

Исследование функциональной активности микробного комплекса ризосферы как пшеницы, так и ячменя в условиях нефтяного стресса показало, что загрязнитель влиял на ризосферную микробиоту двояко. С одной стороны поллютант влияет опосредованно – через растение. Нефть в концентрации 6% ингибировала процессы фотосинтеза, что снижало, в первую очередь, продуктивность растений, а это естественно способствовало уменьшению выделения корневых экссудатов и, в свою очередь, их потребителей – численности микроорганизмов. С другой стороны, нефть

способствовала отмиранию корневых и растительных тканей и ингибировала процессы их разрушения и, наконец, сама нефть была токсичной по отношению к различным физиологическим группам микроорганизмов, заселяющих прикорневую зону растений, что нарушало нормальное протекание микробиологических процессов и пищевой режим. Вместе с тем, обнаружено накопление бенз(а)пирена – ПАУ, являющегося мутагенным и канцерогенным компонентом нефти, у растений, выращенных на нефтезагрязненной почве.

Применение биопрепарата Бациспектин, изначально предназначенного для защиты злаковых культур от болезней, вызываемых фитопатогенными грибами на нефтезагрязненных почвах, показало не только антагонистическое действие по отношению к фитопатогенным микроорганизмам, но и снижение фитотоксичности и ускорение самоочищения почвы за счет нормализации показателей ее биологической активности. Рекультивация нефтезагрязненной почвы способствовала детоксикации поллютанта.

## **ВЫВОДЫ**

1. Показано, что нефтяное загрязнение почвы подавляет рост и развитие растений. Степень ингибирования роста и развития растений прямо пропорциональна концентрации поллютанта независимо от вида растений. Применение биопрепарата Бациспектин для рекультивации нефтезагрязненных почв способствовало улучшению развития растений.

2. Установлено, что при загрязнении почвы нефтью в диапазоне концентраций от 2 до 10% увеличивается активность пероксидаз и полифенолоксидаз в листьях и корнях растений в 1,5-3 раза, содержание аскорбиновой кислоты и рибофлавина в 1,5-2,5 раза, снижается содержание хлорофилла в листьях растений в 2 раза, увеличивается содержание флавоноидов и антоцианов 2,5-3 раза. Показано накопление полициклического ароматического углеводорода – бенз(а)пирена в

растениях. У растений, выращенных на рекультивируемых почвах эти показатели метаболической активности находились на уровне контроля. В меристематических клетках корней растений, выращенных на нефтезагрязненных почвах, наблюдалось угнетение клеточного деления. Отрицательного влияния поллютанта на жизнеспособность пыльцы растений не обнаружено.

3. Нефтяное загрязнение почвы приводит к изменению численности микроорганизмов в ризосфере растений и, соответственно меняет структуру комплекса, что проявилось в увеличении численности углеводородокисляющих микромицетов и их фитопатогенных форм, а также в снижении численности актиномицетов и целлюлозолитиков. Показано, что увеличение численности микроскопических форм грибов положительно коррелирует с концентрацией загрязнителя в почве. Рекультивация нефтезагрязненных почв с применением Бациспецина способствует нормализации микробиологических процессов в ризосфере растений и снижении числа фитотоксичных видов микроорганизмов.

Таким образом, нефтяное загрязнение почвы является важным экологическим фактором, оказывающим многостороннее воздействие на растения и комплекс ризосферных микроорганизмов.

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

- 1) Киреева Н.А., Бакаева М.Д., Шамаева А.А., **Салахова Г.М.** Изменение фитотоксичности нефтезагрязненных почв при биоремедиации// Актуальные экологические проблемы Республики Татарстан. Тезисы докл. VI научн. конф.. Казань. 2004.С.113
- 2) Киреева Н.А., Шамаева А.А., **Салахова Г.М.** Опыт создания биопрепарата на основе углеводородокисляющих микроорганизмов, выделенных на нефтезагрязненных почв Башкортостана// Стратегия природопользования и сохранения биоразнообразия в XXI веке. Материал второй межд. научн. конф. Оренбург .2004.С.45-46
- 3) Киреева Н.А., **Салахова Г.М.**, Мифтахова А.М. Влияние загрязнения почвы нефтью и нефтепродуктами на рост и развитие растений// Растительные ресурсы: опыт, проблемы и перспективы. Матер. Всеросс. н.-практ. конф. Бирск: БГПУ,2005. С.143-146

- 4) Киреева Н.А., Шамаева А.А., **Салахова Г.М.** Видовое разнообразие углеводородоокисляющих микроорганизмов в почвах Башкортостана при нефтяном загрязнении и их применение при рекультивации// Популяции в пространстве и времени. Сб. матер. VIII Всероссийской попул. семинара. Н. Новгород. 2005. С.145-146
- 5) Киреева Н.А., Мифтахова А.М., **Салахова Г.М.** Влияние загрязнения нефтью почвы на показатели роста и развития растений, и вопросы фитомелиорации// Уралэкология. Природные ресурсы-2005. Матер. Всеросс. н - практ. конф. Уфа- Москва.2005.С.174-175
- 6) Киреева Н.А., Мифтахова А.М., **Салахова Г.М.** Рост и развитие гречихи посевной в условиях нефтяного загрязнения почвы// Современные проблемы аграрной науки и пути их решения. Матер. Всеросс. н-практич. конф. Ижевск: ФГОУ ВПО Ижевское ГСХА. 2005.Т.II. С.159-163
- 7) Киреева Н.А., **Салахова Г.М.**, Мифтахова А.М. Влияние загрязнения почвы нефтью и нефтепродуктов на рост и развитие высших растений// Современные тенденции в биологических науках XXI века. Матер. Всеросс. н.-практ. конф. Бирск: БГСПА. 2005. С.81-83
- 8) Киреева Н.А., **Салахова Г.М.**, Мифтахова А.М., Бакаева М.Д. Комплексное диагностирование нефтезагрязненных почв для оценки токсичности// Современные аспекты экологии и экологического образования. Матер. Всеросс. н – практ. конф. Казань, 2005. С.439-440
- 9) Киреева Н.А., Мифтахова А.М., **Салахова Г.М.**, Кабиров Т.Р. Рост и развитие высших растений в условиях нефтяного загрязнения почвы// Проблемы геоэкологии Южного Урала. Матер. Всеросс. н.-практ. конф. Оренбург.2005.ч.1.С.192-194 ч.2. С.53-55
- 10) Киреева Н.А., Мифтахова А.М., **Салахова Г.М.** Рост и развитие гречихи посевной в условиях нефтяного загрязнения почвы//Матер. Межд. конф. молодых ботаников в Санкт-Петербурге. Санкт-Петербург.2006.С. 155
- 11) Киреева Н.А., **Салахова Г.М.** Адаптация растений пшеницы к условиям нефтяного загрязнения почвы// Адаптация биологических систем к естественным и экстремальным факторам среды. Матер. Межд. н.-практической конф. Челябинск. 2006.С. 136-139
- 12) Мифтахова А.М., **Салахова Г.М.** Изучение разнообразия сорных растений в нефтедобывающих регионах// Вопросы общей ботаники: традиции и перспективы. Матер. Межд. науч. конф., посвящ.200-летию Казан. бот. школы. Казань 2006.Ч. 2. С. 72-74
- 13) Киреева Н.А., Мифтахова А.М., **Салахова Г.М.** Рост и развитие яровой пшеницы на нефтезагрязненных почвах и при биоремедиации//Агрохимия.2006. №1. С.85-90
- 14) **Салахова Г.М.**, Киреева Н.А., Баширова Р.М., Тимербаева Г.Р. Изучение адаптивных возможностей растений *Tagetes erecta* при нефтяном загрязнении почвы// Вестник ОГУ, 2007 ( в печати)

