

*На правах рукописи*

**Гафарова Евгения Владимировна**

**ВЛИЯНИЕ ЦЕОЛИТСОДЕРЖАЩЕЙ ПОРОДЫ И РАСТЕНИЙ НА  
БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ВЫЩЕЛОЧЕННОГО  
ЧЕРНОЗЕМА, ЗАГРЯЗНЕННОГО НЕФТЯНЫМИ  
УГЛЕВОДОРОДАМИ**

03.00.07 - микробиология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань - 2006

Работа выполнена на кафедре микробиологии ГОУВПО Казанский государственный университет им. В.И.Ульянова-Ленина

Научный руководитель: Кандидат биологических наук,  
в.н.с. Зарипова Сания Кашафовна

Официальные оппоненты: Доктор ветеринарных наук,  
профессор Госманов Рауис  
Госманович

Доктор биологических наук,  
профессор Селивановская Светлана  
Юрьевна

Ведущая организация: Ульяновский государственный  
университет, г. Ульяновск

Защита состоится « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2006 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском государственном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им.Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2006 г.

И.о. ученого секретаря диссертационного совета  
доктор биологических наук, профессор

З.И. Абрамова

**Актуальность проблемы.** Углеводородное загрязнение является глобальной экологической проблемой и представляет угрозу для почвы, водоемов, подземных вод, источников питьевой воды и, в конечном итоге, для здоровья людей. В условиях города, вблизи нефтеперерабатывающих предприятий, автозаправочных станций и аэропортов, а также вдоль нефтепроводов периодически возникает необходимость устранения аварийных разливов углеводородов, а также минимизации распространения таких разливов по профилю почвы. Почва, благодаря своей большой адсорбирующей поверхности, аккумулирует нефтяные УВ в больших количествах, и под их влиянием происходят глубокие изменения морфологических, агрохимических, физических свойств почвы, в результате чего она становится токсичной для почвенной флоры и фауны, утрачивает плодородие [Иларионов с соавт., 2003, Киреева с соавт 2001, 2003].

В настоящее время существуют различные методы очистки природных сфер от нефтяных УВ. Наиболее перспективными являются биологические методы, поскольку, как показано многочисленными исследованиями, именно биodeградация является первичным механизмом удаления УВ соединений из экосистем [Salt et al., 1998, Leahy, Corwell, 1990, Atlas, 1995]. Одним из развивающихся в последние десятилетия экологически безопасным и экономичным методом восстановления нарушенного почвенного плодородия является фиторемедиация [Shaw, Burns, 2003, Siciliano, Germida, 1998]. Эффективность фиторемедиации связана с улучшением физико-химических свойств почвы под действием корневой системы растений, а также с активизацией почвенной прикорневой микрофлоры, в том числе микроорганизмов - активных деструкторов загрязнений.

Для предотвращения распространения по почвенному профилю возможных разливов смеси УВ и снижения риска негативного влияния загрязнителя перспективным представляется применение природного сорбента - цеолитсодержащей породы (ЦСП) [Bowman, 2003, Буров, 2001, Смирнова, 2003]. Однако, использование ЦСП в качестве барьера для распространения УВ при аварийных разливах не отменяет необходимости последующей реабилитации загрязненных углеводородами экотопов. Необходимо отметить, что если влияние УВ и растений на биологические свойства почвы изучается достаточно интенсивно, то ответ почвенного ценоза на внесение ЦСП в углеводородзагрязненной почве практически не изучен.

Изучение характера влияния ЦСП и выращивания растений на микробиоценоз загрязненной УВ почвы позволит обосновать возможность применения этих мелиорантов и их сочетаний.

**Цель и задачи исследований.** Цель данной работы - анализ биологической активности микробиоценоза загрязненной нефтяными углеводородами тяжелосуглинистого выщелоченного чернозема РТ при внесении цеолитсодержащей породы и вегетации растений. В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Оценить действие цеолитсодержащей породы на биологические характеристики изучаемой почвы (численность аэробных гетеротрофных и углеводородокисляющих микроорганизмов, количество биологического углерода почвы, активность почвенных ферментов дегидрогеназы и уреазы, респираторная активность) при разных уровнях загрязнения смесью нефтяных углеводородов.

2. Выявить влияние вегетации дикорастущих трав РТ (кострец, козлятник, эспарцет) на биологические характеристики загрязненной смесью углеводородов почвы.

3. Выбрать на основе биометрических параметров растений и биологических характеристик почвы потенциальный фитомелиорант для загрязненного смесью углеводородов выщелоченного чернозема.

4. Выявить влияние углеводородного загрязнения почвы и цеолитсодержащей породы на биометрические параметры растения - выбранного фитомелиоранта.

5. Оценить совместное действие цеолитсодержащей породы и выбранного фитомелиоранта на биологические свойства загрязненного смесью углеводородов выщелоченного чернозема.

**Научная новизна.** В работе впервые изучено влияние углеводородов средней и легкой фракции нефти на микробиологические и биохимические параметры выщелоченного чернозема Западного Закамья республики Татарстан. Впервые охарактеризовано действие сорбционно-активного минерала, содержащего цеолит, на биоценоз исследуемой загрязненной почвы. Впервые в условиях РТ проведены исследования по изучению влияния дикорастущих трав на биологические свойства выщелоченного чернозема, загрязненного УВ. Показано положительное действие местных мелиорантов (ЦСП и травы эспарцета) на микробиоценоз

выщелоченного чернозема Западного Закамья республики Татарстан, загрязненного углеводородами средней и легкой фракции нефти.

**Практическая значимость.** Полученные результаты могут быть использованы для биологического мониторинга состояния почв при их загрязнении нефтяными углеводородами и проведения профилактических и ремедиационных мероприятий с использованием сорбционно-активных минералов и фиторемедиации. Так как данные приемы выгодно отличаются экономичностью вследствие использования местного минерального сырья и посевного растительного материала, полученные результаты по направленной коррекции биологического статуса загрязненного чернозема могут быть основой для разработки биоремедиационных технологий для восстановления почв, в том числе черноземов Татарстана, от загрязнения нефтяными УВ.

В ходе экспериментальной работы модифицирована и апробирована методика оценки респираторной активности почвы в сочетании с сорбентом и продемонстрирована возможность ее применения для биомониторинга в ходе ремедиации загрязненных почвенных объектов.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертации доложены и обсуждены на: 6-й международной конференции «Internat. Symp. & Exhibition on Environmental Contamination in Central & Eastern Europe and Commonwealth of Independent States» (г. Прага, 2003), V Республиканской научной конференции «Актуальные проблемы Республики Татарстан» (г. Казань, 2003), 7-й, 8-й и 9-й Пущинских школах-конференциях «Биология-наука 21-го века» (г. Пущино, 2003, 2004, 2005), международной научной конференции «Современные проблемы загрязнения почв» (г. Москва, 2004), международной научной конференции «Биотехнология-охране окружающей среды» (г. Москва, 2004), международной научно-практической конференции «Экология фундаментальная и прикладная» (г. Екатеринбург, 2005), а также на семинарах кафедры микробиологии Казанского Государственного Университета.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 3 статьи, 9 тезисов и материалов конференций.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, раздела экспериментальных исследований и

обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа изложена на 125 страницах машинописного текста, включает 8 таблиц и 14 рисунков. Библиография содержит 193 наименования работ российских и зарубежных авторов.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **Объекты исследования**

**Почва.** Опыты проводили на выщелоченном черноземе Западного Закамья РТ (Алексеевский район), широко распространенном в составе пахотного фонда республики Татарстан. Выщелоченный чернозем, имеет следующие характеристики: солевой рН – 6,03; азота легко гидролизуемого 80 мг/100г почвы, фосфора  $P_2O_5$  - 99 мг/100г почвы, калия обменного  $K_2O$  - 99 мг/100г почвы.

**Углеводородный загрязнитель.** В качестве углеводородного загрязнителя использовали коммерческий нефтепродукт керосин – смесь нефтяных УВ легкой и средней фракций, характеризующаяся низкой вязкостью и средней летучестью, температура кипения – 150-220 °С.

**Сорбент.** Сорбент – цеолитсодержащая порода Татарско-Шатрашанского месторождения РТ. Природный минерал имеет следующие характеристики: опал-кristобалит (28%), гейландит-клиноптилолит (19%), глинистые материалы (26%), кальцит (22%), кварц (4%) и глауконит (2%).

**Растения.** В исследованиях использовались семена дикорастущих бобовых (козлятник восточный, эспарцет песчаный) и злаковых (кострец безостый) растений РТ, собранных в период 2000-2004 гг.

**Схема опыта.** Для изучения влияния ЦСП и вегетации растений на выщелоченный чернозем, загрязненный УВ, были заложены следующие варианты опыта:

1 этап опыта

Варианты	Уровень загрязнения, %		
	0	1	2
Почва	Почва ( $\Pi_0$ )	Почва ( $\Pi_1$ )	Почва ( $\Pi_2$ )
	ЦСП 5% ( $\Pi_0Ц_5$ )	ЦСП 5% ( $\Pi_1Ц_5$ )	ЦСП 5% ( $\Pi_2Ц_5$ )
	ЦСП 25% ( $\Pi_0Ц_{25}$ )	ЦСП 25% ( $\Pi_1Ц_{25}$ )	ЦСП 25% ( $\Pi_2Ц_{25}$ )

### 2 этап опыта

Варианты	Уровень загрязнения, %		
	0	1	2
Почва	Кострец ( $P_0$ Кост)	Кострец ( $P_1$ Кост)	Кострец ( $P_2$ Кост)
	Козлятник ( $P_0$ Коз)	Козлятник ( $P_1$ Коз)	Козлятник ( $P_2$ Коз)
	Эспарцет ( $P_0$ Эсп)	Эспарцет ( $P_1$ Эсп)	Эспарцет ( $P_2$ Эсп)

### 3 этап опыта

Варианты	Уровень загрязнения, %		
	0	1	2
Почва + 5%ЦСП	Эспарцет ( $P_0$ Ц <sub>5</sub> Эсп)	Эспарцет ( $P_1$ Ц <sub>5</sub> Эсп)	Эспарцет ( $P_2$ Ц <sub>5</sub> Эсп)
Почва + 25%ЦСП	Эспарцет ( $P_0$ Ц <sub>25</sub> Эсп)	Эспарцет ( $P_1$ Ц <sub>25</sub> Эсп)	Эспарцет ( $P_2$ Ц <sub>25</sub> Эсп)

Перед началом опыта почву просеяли через сито (диаметр ячейки 3-5 мм), удалили посторонние включения и корневые остатки. ЦСП, просеянная через сито (диаметр ячейки 2-4 мм), вносили в концентрации 5% и 25% от массы почвы. Почвенную смесь загрязняли УВ в концентрации 1% и 2% от веса воздушно-сухой почвы.

Модельные опыты проводили в аппаратах для вегетации растений «Флора» в контролируемых по температуре, освещенности и влажности условиях (температура 22<sup>0</sup>С, продолжительность освещения 14 часов, освещенность 6000 лк, влажность 24% от полной полевой влагоемкости почвы). Контролем служила почва без добавления керосина, ЦСП и без вегетации на ней растений. Каждый вариант был проведен в 3-5-ти кратной повторности.

Через 15-18 дней производили сбор урожая растений и биологические анализы.

#### **Определение биометрических параметров растений**

Количество выживших растений определялось как число развившихся растений (на 15-18 день посева), в процентах от общего количества семян, взятых для проращивания. Биомасса надземной и корневой части растений определялась взвешиванием на технических

или аналитических весах после высушивания до постоянного веса (воздушно-сухая, г).

### **Определение количества микроорганизмов**

Численность аэробных гетеротрофных и углеводородоокисляющих микроорганизмов (УОМ) определяли методом посева на твердые питательные среды 10-кратных разведений почвенной суспензии. Использовали среды МПА (для аэробных гетеротрофных микроорганизмов) и синтетическую среду со смесью УВ как источника углерода (для аэробных углеводородоокисляющих микроорганизмов). Количество микроорганизмов выражали как число КОЕ на 1г воздушносухого субстрата (почва или смесь на ее основе) [Коleshко, 1981].

### **Определение биохимических параметров**

Дегидрогеназную активность почвы определяли методом Ленарда, [Хазиев, 1982].

Уреазную активность почвы определяли методом Каупа [Хазиев Ф.Х., 1982].

Респираторную почвенную активность определяли методом газовой хроматографии и выражали в мг CO<sub>2</sub> на кг почвы в час [Гарусов с соавт., 1999]. Определяли скорость продуцирования CO<sub>2</sub> небогатенной почвы (базальное - V<sub>BAS</sub>) и обогащенной глюкозой в концентрации 10% (субстрат-индуцированное дыхание - V<sub>SIR</sub>) [Гарусов с соавт., 1999, Благодатская, Ананьева, 1996].

Количество почвенного биологического углерода определяли методом Охлинера фумигации-экстракции почвенных образцов [Schinner et. al, 1996].

### **Статистическая обработка**

Измерение всех параметров проводили в 3-5 кратной повторности. Статистическую обработку результатов проводили с использованием встроенных средств MS Excel путем расчета среднего арифметического значения, среднеквадратичного отклонения ( $\sigma$ ), доверительного интервала. Результаты считали достоверными при среднеквадратичном отклонении  $\sigma \leq 15\%$ . В качестве критерия достоверности получаемых разностей использовали критерий Манна-Уитни, принимая  $P \leq 0.05$  за достоверный уровень значимости.



## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ**

### **1 Особенности изменения микробного сообщества почвы, загрязненной смесью углеводородов, при добавлении цеолитсодержащей породы**

В последние годы природные сорбенты цеолиты привлекли внимание исследователей своей способностью к сорбции загрязнителей и предотвращению их распространения по почвенному профилю, каталитическими и ионообменными свойствами [Campbell, Devies, 1996, Shindo et al., 2001], положительным влиянием на почвенный режим (водный, кислородный, кислотно-щелочной) [Leggo, 1999, Ишкаев с соавт., 2001], что позитивно отражается на развитии почвенных микроорганизмов, способствуя биодegradации загрязнителя [Fuierer et al., 2001, Bowman, 2003].

В нашем опыте в почве без ЦСП внесение смеси УВ нефти легкой и средней фракции вызвало увеличение численности аэробных гетеротрофов и УОМ в 7-10 и в 3-5 раз, соответственно (рис. 1). Нарушение гомеостаза почвенной экосистемы при внесении максимальной дозы УВ (токсическое действие загрязнителя, ухудшение физико-химических свойств почвы) проявилось в снижении численности почвенных микроорганизмов, способных использовать УВ как питательный субстрат, по сравнению с 1% загрязнением.

Применение ЦСП в концентрации 5% считается достаточным для усиления барьерной функции почвы - сдерживания нисходящей миграции УВ [Смирнова, 2003]. Количественные микробные характеристики почвы с 5% ЦСП в условиях загрязнения (численность аэробных гетеротрофов и УОМ) мало отличались от таковых в почве без ЦСП, что свидетельствует об отсутствии существенного влияния этой дозы сорбента на данный показатель.

Внесение 25% ЦСП в почву сопровождалось резким снижением численности микроорганизмов гетеротрофной группы (рис.1А). Можно предположить сорбцию большинства микроорганизмов цеолитом [Syamsiash, Nady, 2004, Руденко с соавт., 2003, Буров, 2001]. В тоже время, в загрязненной УВ почве с 25% ЦСП снижение численности гетеротрофов не сопровождалось аналогичным снижением количества УОМ, и даже, напротив, количество микроорганизмов специализированной группы при максимальной дозе загрязнения достоверно повышалось (рис.1Б).

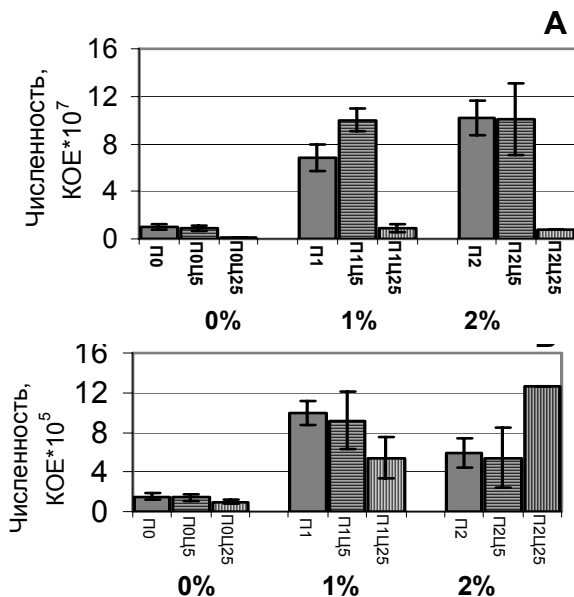


Рис. 1 Влияние различных концентраций (0%,1%,2%) смеси углеводов на численность гетеротрофных (А) и углеводородоксиляющих (Б) микроорганизмов в почве с ЦСП, где П0, П1, П2 – почва с 0%, 1% и 2% УВ, Ц5 и Ц25 – концентрация ЦСП в почве 5% и 25%

Это может быть связано со способностью ЦСП предохранять микроорганизмы от токсического действия загрязнителя, значительная доза которого могла быть сорбирована.

Количество биологического углерода контрольной почвы и почвы с ЦСП при загрязнении УВ (табл.1) изменялось аналогично показателям численности микроорганизмов (рис.1А).

Таблица 1.

Количество биологического углерода почвы

Образец почвы	Количество биологического углерода		
	0%	1%	2%
Почва	0,09±0,009	0,5±0,012	0,4±0,012
Почва+5%ЦСП	0,085±0,022	0,45±0,039	0,34±0,038
Почва+25%ЦСП	0,05±0,008	0,06±0,009	0,085±0,009
Почва+эспарцет	1,20±0,225	0,712±0,225	0,81±0,146
Почва+козлятник	0,23±0,029	0,23±0,029	0,55±0,029
Почва+кострец	0,51±0,049	0,67±0,086	0,63±0,087
Почва+5%ЦСП+эспарцет	0,8215±0,049	0,6540,052	0,72±0,052
Почва+25%ЦСП+эспарцет	1,021±0,039	1,02±0,175	0,78±0,124

Согласно данным литературы дегидрогеназная активность углеводородзагрязненных почв стимулируется действием н-алканов, н-парафинов и циклических УВ в концентрации 0,5%, 1% и 2% (Serra-Witting et al., 1995, Baran et al., 2004, Киреева с соавт., 2001, Marin et al., 2005). В исследуемой нами загрязненной УВ легкой и средней фракции нефти почве тенденция к возрастанию дегидрогеназной активности подтверждается (рис.2А). При внесении ЦСП выявлен дозозависимый характер изменения дегидрогеназной активности, тогда как в почве без минерала показатель стабилизировался на одном уровне при 1% и 2% загрязнении. Это косвенно свидетельствует о протекторной роли ЦСП в отношении микроорганизмов-продуцентов дегидрогеназ.

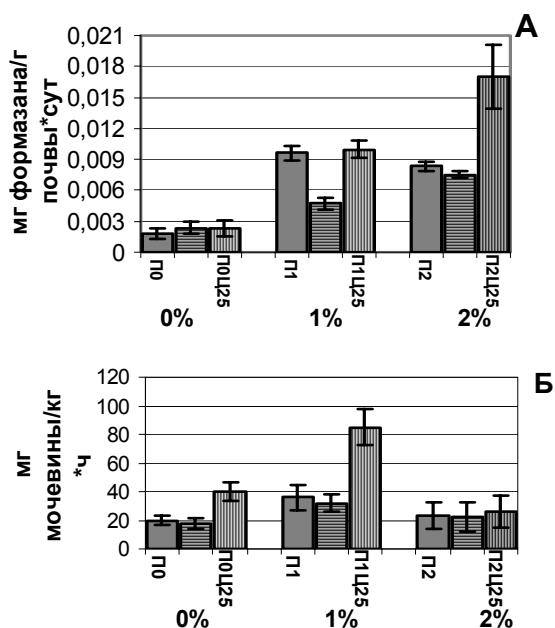


Рис.2. Воздействие различных концентраций (0%,1%,2%) смеси углеводородов на дегидрогеназную (А) и уреазную (Б) активность почвы с ЦСП, где П0, П1, П2 – почва с 0%,1% и 2% УВ, Ц5 и Ц25 – концентрация ЦСП в почве 5% и 25%

Обращает на себя внимание тот факт, что содержание в почве 25% ЦСП при 2% загрязнении привело к значительному повышению показателя (на 55%) по сравнению с почвой с аналогичным уровнем загрязнения, что совпадает с возрастанием численности УОМ (рис.2А, рис. 1Б).

Анализ уреазной активности загрязненной почвы выявил высокую чувствительность этого фермента к 2% загрязнению – показатель, повысившийся при 1% загрязнении, при увеличении токсической нагрузки УВ снизился до исходного уровня, и наличие в почве даже большой дозы сорбента не изменило ситуации (рис.2Б).

Интересным фактом явилась относительно низкая респираторная активность почвы с 25% ЦСП (рис.3). Такие показатели респираторной активности в присутствии ЦСП могут быть объяснены сорбцией  $\text{CO}_2$  в порах минерала. Поставленный опыт по мониторингу дыхательной активности позволил установить, что специфические почвенные условия, сформировавшиеся при внесении сорбционно-активного материала, требуют коррекции методики измерения интенсивности дыхания - увеличение продолжительности экспозиции не менее, чем до 3 часов. Данное условие обеспечивает активную десорбцию накопившегося  $\text{CO}_2$  за счет увеличения градиента его концентрации между свободным и сорбированным на минерале.

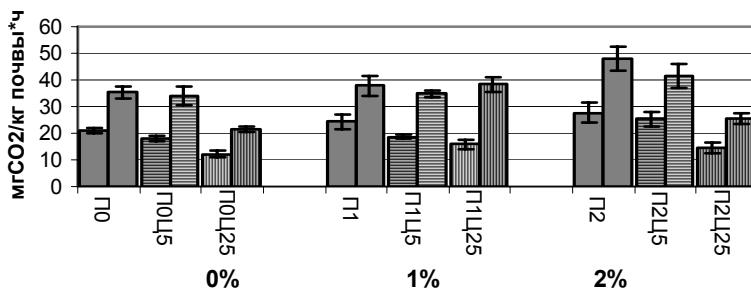


Рис. 3. Активность базального и субстратиндуцированного дыхания (1й и 2й столбец, соответственно) почвы с ЦСП при загрязнении различными концентрациями (0%,1%,2%) смеси углеводородов, где П0, П1, П2 – почва с 0%,1% и 2% УВ, Ц5 и Ц25 – концентрация ЦСП в почве 5% и 25%

Дополнительным аргументом в пользу присутствия 25% ЦСП в загрязненной почве явилось снижение значений коэффициента микробного дыхания с 0,64 до 0,41.

Таким образом, изучение количественных микробных характеристик почв с ЦСП в условиях УВ загрязнения позволило выявить следующие особенности. В присутствии 5% ЦСП микробное

сообщество не имеет сколько-нибудь заметных преимуществ перед обычной почвой. Внесение 25% сорбента хоть и снижает показатели численности микроорганизмов, улучшает экологическую ситуацию загрязненной почвы, что проявляется в активации смесью УВ узкоспециализированной группы УОМ, дегидрогеназной почвенной активности и предоставляет почвенной микробиоте лучшие условия для развития в неблагоприятной экологической среде.

## **2 Особенности изменения биометрических параметров растений и микробного сообщества почвы с вегетацией при загрязнении углеводородами**

По данным литературы растения способны интенсифицировать ремедиацию загрязненных почв [Ferro et al., 2001, Shaw, Burns, 2003, Киреева с соавт., 2004]. Однако нефтяные УВ в силу различных причин ингибируют всхожесть семян и развитие растений [Anoliefo., Vwioko, 1994, Maila, Cloete, 2005, Gunter, 1996]. Из трех растений, изученных в нашей работе, только эспарцет показал относительно большое количество выживших растений при всех уровнях загрязнения (в среднем 60%) (табл.2). Можно предположить, что это связано с наличием у семян эспарцета меньшей проницаемости семенной оболочки для УВ, чем у других растений [Свистова с соавт., 2003].

Таблица 2.

Количество выживших растений в разных вариантах опыта

	% выживших растений		
	0%	1%	2%
кострец	91,5±9,85	66,4±4,62	9,1±5,27
козлятник	33,5±11,26	23,0±8,53	0±2,41
эспарцет	56,5±4,58	60,2±3,64	58,6±5,24
эспарцет+5%ЦСП	28,1±6,12	41,3±5,24	43,3±7,75
эспарцет+25%ЦСП	74,5±4,32	65,1±2,58	54,0±5,06

Полученные данные свидетельствуют о незначительном влиянии углеводородного загрязнителя на надземную часть всех исследуемых растений, не имеющую непосредственного контакта с УВ (табл.3).

Реакция корневой системы на углеводородный загрязнитель проявилась неодинаково вследствие различной видовой принадлежности растений – наибольшую устойчивость к токсическому действию УВ проявил эспарцет, ответив на загрязнение почвы увеличением корневой массы (табл.3).

Корни растений улучшают физико-химические свойства почвы, а их ризодепозиты служат источниками питания прикорневых почвенных микроорганизмов [Aprill, Sims, 1993, Siciliano, Germida, 1998]. Известно, что в прикорневой зоне растений происходит массовое развитие микроорганизмов, в том числе утилизирующих либо трансформирующих органические загрязнители [Lynch, 2002, Cunningham et al., 1995, Shaw, Burns, 2003].

Таблица 3.

Развитие корней и зеленой массы растений при загрязнении почвы смесью УВ (% от развития частей растения в незагрязненной почве)

		Зеленые части, %	Корни, %
Кострец	1%	58,38±21,5	55,56±26,3
	2%	66,25±16,5	66,67±12,8
Козлятник	1%	34,07±18,40	109,80±20,2
	2%	37,23±8,36	7,84±4,7
Эспарцет	1%	100,03±22,10	184,62±16,9
	2%	76,92±21,31	29,23±2,6

Обращает на себя внимание значительное влияние растений на микробное сообщество незагрязненной почвы. Так, число аэробных гетеротрофов увеличилось в среднем в 12 раз, УОМ - в 4 раза, количество биологического углерода - в 6 раз (рис.4).

При загрязнении почвы УВ разница показателей незасеянной и засеянной почвы стала менее отчетливой, так как растения, испытывая действие токсичных для них УВ легкой и средней фракции нефти, не могли оказать значительное влияние на микробиоту. И все же, даже при 2% загрязнении почва с растениями проявила свои преимущества – численность УОМ и биомасса увеличились на 83% и 58%, соответственно, по сравнению с таковыми в незасеянной почве (рис.4Б), то есть в прикорневой зоне растений экологическая ситуация более благоприятна для развития УОМ.

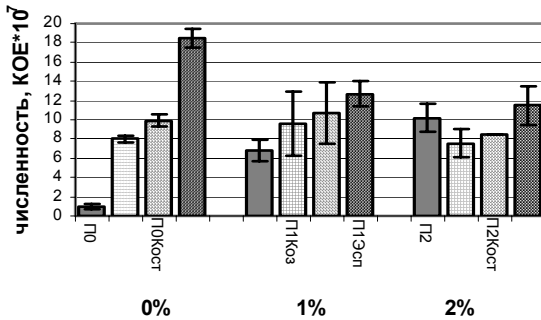
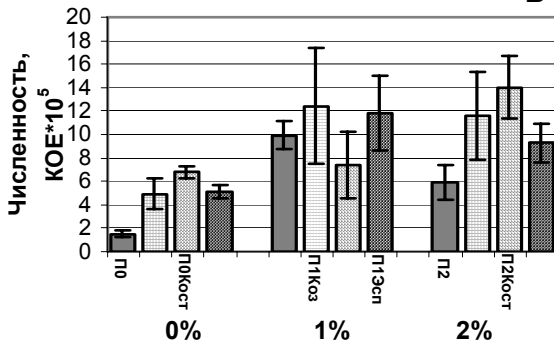
**А**

Рис. 4. Влияние различных концентраций (0%,1%,2%) смеси углеводов на численность гетеротрофных (А), углеводородоксиляющих (Б) микроорганизмов и количество биологического углерода почвы (В) в почве с растениями, где П0, П1, П2 – почва с 0%,1% и 2% УВ, Коз, Костр, Эсп – козлятник, коострец, эспарцет

**Б**

В почве под растениями при 2% загрязнении УВ повышение количества УОМ, ответственных за дегидрогеназный пул в почве, коррелировала с более высокими показателями дегидрогеназной активности (рис.5А). В отличие от дегидрогеназной уреазная активность в этих же образцах почвы была на уровне почвы без вегетации растений (рис.5Б), что по данным литературы связано с количеством гетеротрофов (Хазиев, 1982).

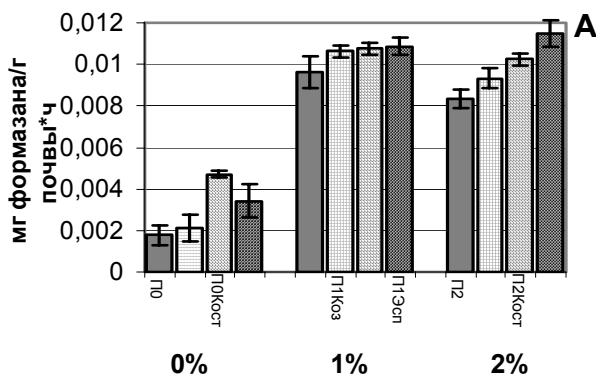
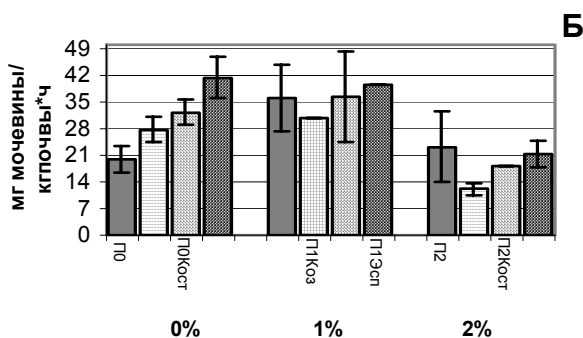


Рис.5. Воздействие различных концентраций (0%,1%,2%) смеси углеводородов на дегидрогеназную (А) и уреазную (Б) активность почвы с растениями, где П0, П1, П2 – почва с 0%,1% и 2% УВ, Коз, Костр, Эсп – козлятник, кострец, эспарцет



Интенсивность почвенного дыхания является чувствительным индикатором биологической активности почв [Anderson, Domch, 1993]. Более высокие, чем в незасеянной почве, показатели респираторной активности были только в почве под эспарцетом, превышая при 2% загрязнении показатель аналогичного почвенного образца примерно на треть (рис.6). О пользе вегетации растений на загрязненной почве свидетельствует коэффициент микробного дыхания. Снижение его значения в засеянной почве, а особенно при максимальной дозе загрязнителя в почве под эспарцетом (на 48%) указывает, на стабилизацию состояния микробиоценоза околор корневого слоя.



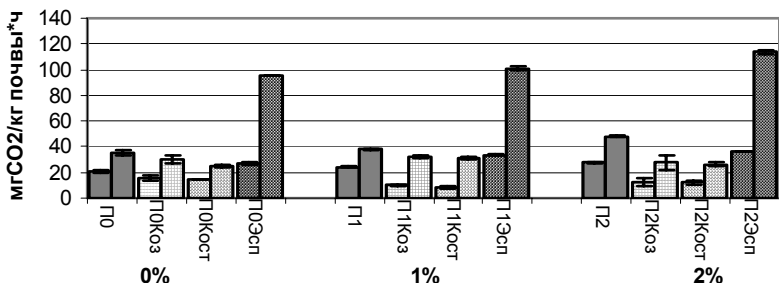


Рис. 6. Оценка активности базального (1й столбец) и субстратиндуцированного (2й столбец) дыхания почвы с растениями при загрязнении различными концентрациями (0%,1%,2%) смеси углеводов, где П0, П1, П2 – почва с 0%,1% и 2% УВ, Коз, Костр, Эсп – козлятник, кострец, эспарцет

При выборе потенциального фитомелиоранта среди исследуемых растений основными критериями стали: относительно высокая всхожесть и развитие массы корней, численность УОМ и связанная с ней дегидрогеназная активность, а также респираторная активность в условиях УВ загрязнения. Таким критериям в наибольшей степени в наших исследованиях соответствовало бобовое травянистое растение эспарцет.

### **3 Особенности биометрических параметров эспарцета и биологических параметров загрязненного углеводородами выщелоченного чернозема на фоне внесения в почву цеолитсодержащей породы**

В условиях загрязнения УВ присутствие в почве цеолита в концентрации 25% не повлияло на количество выживших растений эспарцета (табл.2). Наличие ЦСП в почве отразилось на развитии корней эспарцета, и особенно значимой была относительная стабильность массы корней даже при 2% загрязнении чернозема (табл.4). Снижение токсичности УВ в отношении эспарцета при внесении минерала является результатом, по-видимому, уменьшения концентрации загрязнителя за счет сорбции на минерале [Syamsiash, Nadi, 2004] и улучшения физико-химических свойств почвы, о чем

свидетельствует ряд авторов [Campbell, Davies, 1996, Leggo, 1999, Ишкаев с соавт., 2001].

Таблица 4.

Масса корней и зеленой части растения при добавлении ЦСП и загрязнении почвы смесью УВ ( % от развития в почве без ЦСП при соответствующей концентрации УВ)

	Концентрация УВ	Масса зеленой части, %	Масса корней, %
Эспарцет+5%ЦСП	0%	98,4	150,8
	1%	72,87±11,31	11,67±4,8
	2%	97,89±12,50	110,53±5,5
Эспарцет+25%ЦСП	0%	157,89	129,23
	1%	85,02±9,48	98,33±3,5
	2%	80,52±5,70	284,21±8,6

Известна способность малых доз УВ не только стимулировать развитие и специализацию микроорганизмов [Фатеев с соавт., 2004, Solano-Serena et al., 2000, Margesin et al., 1999], но и увеличивать выделение ризодепозитов [Shaw, Burns, 2003, Siciliano, Germida, 1998] а, следовательно, и развитие прикорневой микробиоты [Ikeda et al., 1997, Reynolds et al., 2001, Тихонович, 2000]. В нашем опыте присутствие 25% ЦСП в почве под эспарцетом привело к стимуляции численности микроорганизмов при 2% загрязнении - увеличение числа высеваемых гетеротрофов и УОМ в 2 и в 5 раз, соответственно, по сравнению с засеянной почвой без сорбента (рис.7). Несомненно, имеет место вклад каждого мелиоранта в достижении такого эффекта, а в случае с численностью УОМ комбинированное действие носит характер синергизма.

Количество биологического углерода почвы в этих же образцах при загрязнении было сравнимо со значениями этого параметра почвы под эспарцетом (табл 1). Сравнивая его с аналогичным показателем незасеянной почвы с минералом и без него, нельзя не отметить доминирующего влияния фитомелиоранта на биомассу чернозема, поскольку внесение цеолита должно было снизить показатель.

При применении двух мелиорантов наряду с высокой численностью УОМ в загрязненной почве в исследуемом образце выявлено увеличение дегидрогеназной активности.

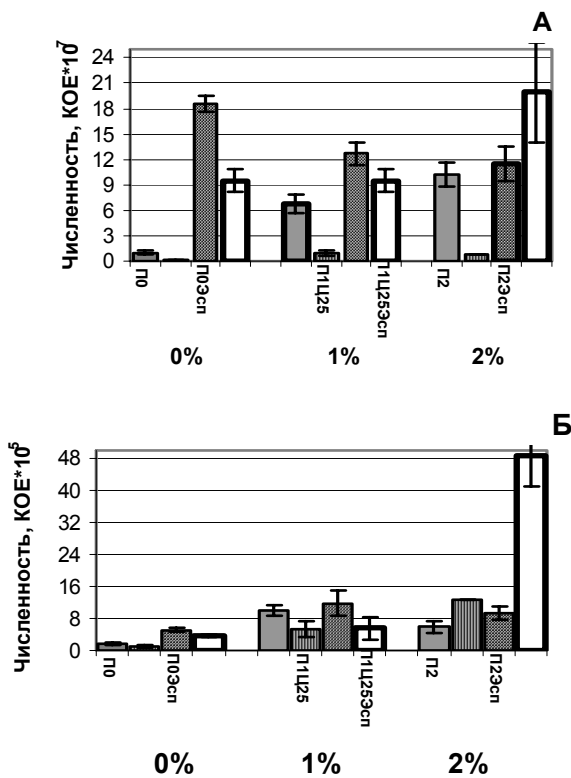


Рис. 7. Влияние различных концентраций (0%,1%,2%) смеси углеводов на численность гетеротрофных (А), углеводородокисляющих (Б) микроорганизмов в почве с ЦСП и растениями, где П0, П1, П2 – почва с 0%,1% и 2% УВ, Ц25 – концентрация ЦСП в почве 25%, Эсп – эспарцет

Это является ответной реакцией на комплексное воздействие нескольких факторов: внесение органического углеводородного субстрата в засеянную почву [Ворпаты, 2000, Baran et al., 2004], снижение токсической концентрации УВ за счет сорбции на цеолите, улучшение физико-химических свойств почвы за счет минерала, выделение корневых экссудатов растением (рис.8А).

Обращает на себя внимание тот факт, что уреазная активность почвы сохраняется на достаточно высоком уровне даже при 2% загрязнении в почве с совместным применением обоих мелиорантов – ЦСП и эспарцета, тогда как применение каждого из них в отдельности сохраняет показатель, близкий к контрольному образцу (рис.8Б). Вероятно, оба мелиоранта вносят вклад в увеличение параметра.

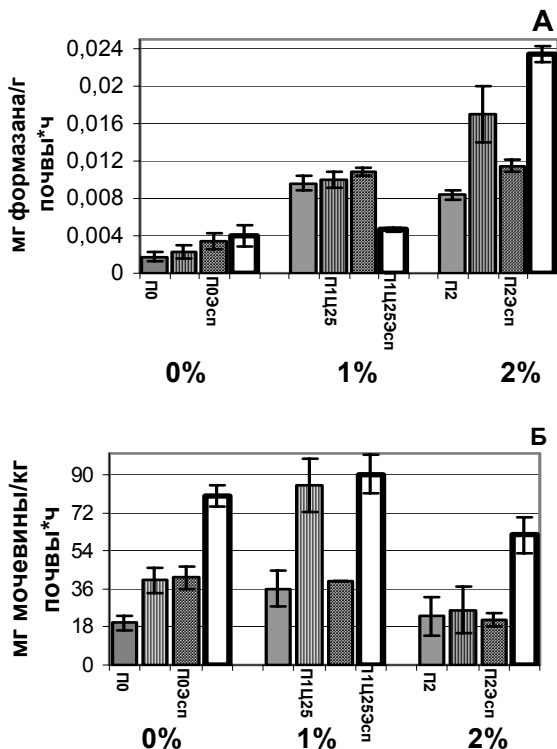


Рис. 8. Воздействие различных концентраций (0%,1%,2%) смеси углеводов на дегидрогеназную (А) и уреазную (Б) активность почвы с ЦСП и растениями, где П0, П1, П2 – почва с 0%,1% и 2% УВ, Ц5 и Ц25 – концентрация ЦСП в почве 5% и 25%, Эсп – эспарцет

При 2% загрязнении, когда уреазная активность в незащищенной почве с 25% ЦСП не отличалась от контрольного варианта, при вегетации в этой почве эспарцета сложилась ситуация, благоприятная для околокорневых микроорганизмов – продуцентов уреазы и уреазная активность повысилась почти в 2 раза.

В этих же почвенных образцах была отмечена относительно низкая респираторная активность загрязненной почвы, что, как отмечалось выше, связано с сорбцией углекислого газа цеолитом (рис.9).

В то же время обнадеживающим фактом явилось снижение коэффициента микробного дыхания загрязненной почвы под эспарцетом, если в почве присутствовал цеолит в концентрации 25%, до 0,27 и 0,09 (для 1% и 2% УВ), так как данный показатель может служить индикатором процессов самоочищения почвы [Благодатская, Ананьева, 1996].

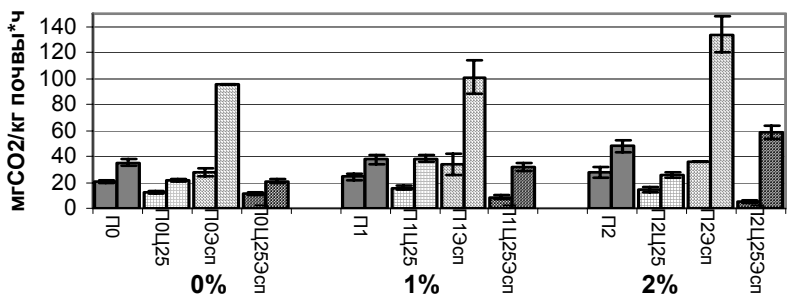


Рис. 9. Оценка активности базального (1й столбец) и субстратиндуцированного (2й столбец) почвы с ЦСП и эспарцетом при загрязнении различными концентрациями (0%,1%,2%) смеси углеводородов, где П0, П1, П2 – почва с 0%,1% и 2% УВ, Ц25 – концентрация ЦСП в почве 25%, Эсп – эспарцет

Таким образом, в наших опытах представлен ряд доказательств того, что применение 25%ЦСП и выращивание эспарцета положительно влияют на микробный статус загрязненного УВ чернозема.

## ВЫВОДЫ

1. Охарактеризованы возможность и масштабы активизации оздоровления тяжелосуглинистого выщелоченного чернозема Западного Закамья Республики Татарстан, загрязненного смесью углеводородов средней и легкой нефтяных фракций, на основе применения цеолитсодержащей породы Татарско-Шатрашанского месторождения РТ и выращивания характерных для РТ дикорастущих растений.

2. Внесение в почву цеолитсодержащей породы как потенциального мелиоранта привело к активизации дегидрогеназной и уреазной активности, увеличению количества углеводородокисляющих микроорганизмов.

3. Выращивание дикорастущих травянистых растений на почве, загрязненной углеводородами, повышало количество биологического углерода почвы (до 60%), численность углеводородокисляющих микроорганизмов (до 90%) и активизировало почвенную дегидрогеназную активность (до 20%).

4. Наибольшая биологическая активность загрязненного углеводородами чернозема выявлена под бобовым травянистым

растением эспарцет. Для эспарцета характерно высокое количество выживших растений и развитие корневой системы в загрязненном черноземе.

5. Цеолитсодержащая порода способствует увеличению массы корней эспарцета (до 185%) в загрязненной почве, при отсутствии существенного влияния на количество выживших растений и зеленую массу растения.

6. Совместное применение двух мелиорантов - 25% цеолитсодержащей породы и эспарцета - на загрязненной смеси углеводов почвы оказало синергическое влияние на биологические свойства тяжелосуглинистого выщелоченного чернозема: количество микроорганизмов исследуемых групп, дегидрогеназную и уреазную активности.

7. Специфические почвенные условия, сформировавшиеся при внесении сорбционно-активного материала, требуют коррекции методики измерения интенсивности дыхания - увеличение продолжительности экспозиции.

**Благодарности.** Автор выражает глубокую и искреннюю признательность научному руководителю к.б.н., с.н.с. Зариповой С.К., д.б.н., профессору Бреус И.П. и аспирантке Ларионовой Н.Л. за внимание и помощь в проведении экспериментов, к.х.н. Гарусову А.В. за техническое обеспечение опытов, а также сотрудникам ЦНИИ Геолнеруд доктору геолого-минералогических наук, профессору Лыгиной Т.З., с.н.с Гревцеву В.А. и технику Михайлову А.А. за помощь в проведении электронно-микроскопических исследований.

Автор искренне благодарит д.б.н., профессора Наумову Р.П. за консультации и участие в обсуждении результатов исследований.

#### **Работы, опубликованные по теме диссертации**

1. Гафарова Е.В. Влияние цеолитсодержащей породы на развитие эспарцета на почве, загрязненной углеводородами / Е.В. Гафарова, Г.А. Ситдикова, Н.Л. Ларионова, С.К. Зарипова // Ученые записки Казанского Государственного Университета. – 2005. – Т.143. – кн.3. –сер. Естественные науки. – С. 81-89.

2. Гафарова Е.В. Влияние цеолитсодержащей породы и эспарцета на биологические параметры выщелоченного чернозема, загрязненного смесью углеводов / Е.В. Гафарова, С.К. Зарипова // Вестник Самарского государственного университета. – 2005. - №6. – кн.40. – С. 146-157.

3. Гафарова Е.В. Микробиологическая активность выщелоченного чернозема при внесении в него цеолита / Гафарова

Е.В., Г.А.Ситдикова, С.К.Зарипова // Тезисы международной школы-конф. - Пушкино, 2005.- с.341.

4. Гафарова Е.В. Влияние цеолитсодержащей породы на рекультивацию углеводородзагрязненных почв / Е.В.Гафарова, Г.А.Ситдикова, С.К.Зарипова // Экология фундаментальная и прикладная: проблемы урбанизации: сб. науч. тр./ Екатеринбург: Изд-во Урал. Ун-та, 2005. - с.294-295.

5. Gafarova (Khorkova) E.V. An influence of mineral sorbent on biological activity of leached chernozem polluted with kerosene / E.V.Gafarova (Khorkova), G.A.Sitdikova, A.V.Garusov, S.K.Zaripova // Environmental radioecology and applied ecology. – 2004. –V10,N.4. - P.4-10.

6. Хорькова Е.В. Влияние цеолита на микробиологическую активность выщелоченного чернозема, загрязненного углеводородами, в условиях фиторемедиации / Е.В.Хорькова, С.К.Зарипова // Биотехнология-охране окружающей среды: сб. науч. тр. / Изд-во «Спорт и Культура». - Москва, 2004. - с. 180.

7. Хорькова Е.В. Активность микробиоценоза выщелоченного чернозема, загрязненного керосином, под действием растений / Е.В.Хорькова, О.С.Норина, С.К. Зарипова // Тезисы международ. науч. конф. - Москва, МГУ, 2004 - С. 383.

8. Ларионова Н.Л. Фиторемедиация загрязненных углеводородами почв / Н.Л.Ларионова, Е.В.Хорькова, С.К.Зарипова // Актуальные экологические проблемы Республики Татарстан: сб. науч. тр. / АНРТ. - Казань, 2003. - с. 170-171.

9. Хорькова Е.В. Влияние костреца и козлятника на микробиоценоз почвы при углеводородном загрязнении / Е.В.Хорькова, О.С.Норина, С.К.Зарипова // Тезисы всероссийской школы-конф. - Пушкино, 2003.- с.443-434.

10. Хорькова Е.В. Влияние выращивания эспарцета на биологическую активность выщелоченного чернозема при углеводородном загрязнении / Е.В.Хорькова, Г.А.Ситдикова, С.К.Зарипова // Тезисы международной школы-конф. - Пушкино, 2003.- с. 284-285.

11. Khorkova E.V. Microorganisms of fuel contaminated soil under phytorehabilitation [el. res.] // E.V.Khorkova, O.S.Norina, S.K. Zaripova. - Prossidings of Internat. Symp. & Exhibition – Prague, 2003. – CD.