

## Трансформация сообщества микромицетов в торфяно-глеевых почвах Крайнего Севера при нефтяном загрязнении

© 2011. Ф. М. Хабибуллина<sup>1</sup>, д.б.н., с.н.с., И. З. Ибатуллина<sup>2</sup>, аспирант,

<sup>1</sup>Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН,

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,

e-mail: fluza@ib.komisc.ru

В статье приведены результаты многолетних исследований по оценке изменения состава и структуры микобиоты торфяно-глеевых почв крайнесеверной тайги после нефтяного загрязнения при исходно высокой начальной концентрации нефти на примере одного из экспериментальных участков. Исследования показали, что при низких концентрациях загрязнения прослеживается стимулирование развития микромицетов, а при высоких – снижение разнообразия грибных комплексов в почвах по сравнению с фоновыми почвами. Наблюдается появление грибов, характерных для более южных регионов. Под влиянием нефтезагрязнений в почве исследуемых территорий происходит накопление потенциально опасных для человека видов микромицетов *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium moniliforme*, *Paecilomyces variotii*. При загрязнении почвы нефтепродуктами до 30% в ризосфере крестовника было отмечено снижение остаточной концентрации нефти до 1,4%. Местное аборигенное сорное растение крестовник скученный (*Thephrosia palustris*), обладающий способностью к быстрому заселению на местах разливов нефти, рекомендовано для проведения фиторемедиации нефтезагрязнённых почв.

The long-term study of microbiota of oil polluted tundra peat-gleyic soils showed that oil hydrocarbons stimulate development of soil fungi in low concentrations, while soils with high oil contamination are characterized with low biodiversity of fungal complexes and decrease of their amount. After oil pollution species of micromycetes typical for more southern regions appear in the microbial soil complexes. Oil pollution drives to accumulation of hazardous and potentially pathogenic fungi in the soil, such as *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium moniliforme*, *Paecilomyces variotii*. Effective remediation of soils takes place in the rhizosphere of ragwort (*Thephrosia palustris*), where the level of oil hydrocarbons decreases from 30% to 1,4%. This makes the plant effective to be used in phytoremediation of oil polluted soils in the conditions of northern tundra.

Ключевые слова: микромицеты, рекультивация нефтезагрязнённых почв, эдафосфера, ризосфера, ризоплана

Key words: micromycetes, recultivation of soils with high oil contamination, edaphosphere, rhizosphere, rhizoplane

### Введение

Широкое вовлечение во второй половине XX в. в промышленное освоение минеральных ресурсов Севера серьезно обострило в этом регионе экологическую ситуацию. Интенсивная добыча полезных ископаемых, в том числе и нефти, сопровождается серьёзными нарушениями природной среды, а часто и полным уничтожением растительности и почв. Высокая степень неустойчивости к техногенным воздействиям северных экосистем, их низкий потенциал самоочищения в суровых климатических условиях, изменение мерзлотного режима и ускоренное развитие эрозии показали недостаточность приёмов рекультивации, используемых в более южных условиях, и определили необходимость разработки приёмов восстановления нарушенных земель с учётом специфических условий Севера. Основной

задачей становится восстановление природных экосистем, важнейшими структурными компонентами которых являются растительные сообщества, почва и соответствующие им микро-фаунистические комплексы. В связи с этим необходимы комплексные исследования растительности и почвенной биоты, одним из важнейших компонентов которой являются грибы.

Микромицеты – ведущие деструкторы растительного опада. Они продуцируют широкий спектр экзоферментов и имеют развитую мицелиальную сеть в почвах, обладают высокой линейной скоростью роста, способны развиваться при низких температурах вплоть до отрицательных, благодаря чему оказывают большое влияние на формирование и функционирование наземных биоценозов, и в особенности на почвенные экосистемы Севера. Характерной особенностью микобиоты северных

почв является зависимость активно протекающих процессов от температурных условий, сезонного увлажнения и поступления в почву питательных веществ [1]. Процессы активного почвообразования сосредоточены в верхнем органогенном слое и приурочены к самой поверхности почвы [2]. Продолжительность тёплого периода года с температурами выше 0 °С около 3,5 месяца, с температурами выше 4 °С – 2-2,5 месяца.

Скорость процессов самоочищения почв от нефти в любой климатической зоне зависит от взаимодействия и эффективности таких природных факторов, как физический (процессы выветривания), физико-химический (процессы фотохимического и биохимического преобразования углеводородов) и биологический (микробная деструкция). В конечном итоге решающим в процессах самоочищения почв от нефти является биологический фактор, обусловленный функциональной активностью почвенной микробиоты, в том числе микромикробов, которая определяет скорость и глубину трансформации нефтяных соединений.

Вопрос о влиянии нефти на комплекс почвенной микробиоты и процессы микробиологической деструкции нефти наиболее полно изучен для южных регионов [3, 4], зон средней тайги [5]. В данных почвенно-климатических зонах влияние нефти на почвенную микробиоту в целом сходно, характеризуется относительным стимулированием активности основных трофических групп почвенной микробиоты при низких дозах загрязнения (до 1%), дифференцированным ингибированием отдельных групп при концентрации нефти до 5% и практически полным ингибированием всех групп почвенных микроорганизмов при дозах нефти выше 10%. Степень повреждающего действия нефти на микробиоту почв зависит от свойств самой почвы, состава нефти, а продолжительность процесса самоочищения связана с продолжительностью тёплого периода года. После аварийных разливов нефти концентрация загрязнения почв бывает значительно более высокой, может достигать 30–60%, соответственно и скорость микробной трансформации загрязнения должна замедлиться.

Реакция почвенных водорослей и прокариотных организмов на нефтезагрязнения в районах Крайнего Севера изложена в работах Зимониной Н. М. [6], Хомяковой Д. В. [7] и Маркаровой М. Ю. [8]. Изучение микромикробов, обитающих в нефтезагрязнённых почвах Европейского Северо-Востока, до сих пор не проводилось.

В задачи наших исследований входили: 1) оценка влияния нефтяного загрязнения на структуру почвенных микромикробных комплексов при самоочищении и проведении рекультивационных мероприятий, 2) изучение ризосферной микробиоты растений, устойчивых к нефтяному загрязнению и рекомендуемых в качестве эффективных агентов фиторемедиации торфяно-глеевых почв Крайнего Севера.

### Объекты и методы

Объектами исследования были микромикробы тундровой торфяно-глеевой почвы экспериментального участка. В качестве экспериментального участка выбран нефтяной разлив в районе скважины № 203 Верхневозейского нефтяного месторождения Усинского района Республики Коми. Этот участок с 1995 г. был использован как опытный для отработки приёмов рекультивации загрязнённых нефтью почв в условиях Севера. Возраст нефтяного загрязнения к моменту начала опытных исследований составлял 10–12 лет. Загрязнение почвы нефтью в пределах участка носило мозаичный характер, концентрация колебалась от 5 до 45%. К моменту закладки опыта нефтезагрязнённый участок представлял собой заболоченное понижение с торфянисто-(торфяно)-глеевой суглинистой почвой, техногенно изменённой в результате первичных работ по локализации и частичной уборке нефтяного пятна. Наблюдения за состоянием микробиоты почвы участка проводили на протяжении 10 лет. Фоновыми (контрольными) служили незагрязнённые нефтью торфяно-глеевые почвы, развитые на переувлажнённых участках в лесотундре, занятых низкорослыми сосново-берёзовыми насаждениями с моховым напочвенным покровом. Профили исследованных почв представлены следующей последовательностью горизонтов:  $A_0$  (0–10 см) –  $A_0A_1$  (10–20) – G (20–25) – Bg (25–30) [9].

Варианты опыта – контрольный участок № 1, расположенный вне зоны загрязнения; участок № 2 с первоначальным высоким уровнем загрязнения нефтью (35–40%); участок № 4 с низким уровнем загрязнения (1–5%), участок № 3 с первоначальным высоким уровнем загрязнения нефтью, где была проведена рекультивация почвы с применением микробиологического препарата МУС-1 на фоне органических (БАГ) и минеральных удобрений с последующим посевом многолетних трав. МУС-1 – биопрепарат, состоящий

из пяти штаммов углеводородокисляющих психрофильных бактерий (*Flavobacterium barbe*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhodococcus equi*, *Agrobacterium radiobacter*, *Arthrobacter* sp.). Штаммы выделены Маркаровой М. Ю. из нефтезагрязнённых почв района исследований [8]. БАГ – нетрадиционное органическое удобрение, полученное по разработанной сотрудниками ИБ КНЦ УрО РАН технологии из гидролизного лигнина, применяемое в гранулированной форме [10]. При закладке опыта использовали следующие дозы внесения минеральных удобрений (кг/га): N – 90, P – 90, K – 90.

Образцы почв для микробиологического анализа отбирали в конце июля в 2004 – 2006 годах с соблюдением стерильности. Для анализов использовали смешанные образцы из 10 индивидуальных с каждого участка. Количество микромицетов определяли методом разведения почвенной суспензии с последующим высевом её на агаризованные питательные среды Чапека и Гетчинсона [11]. Идентификацию микроскопических грибов проводили по определителям для различных таксономических групп [12, 13]. Комплексы микромицетов почв характеризовали на основе относительного обилия в % (выше 0,1%) и встречаемости видов (случайные виды с частотой встречаемости 1–25%, редкие – 26–50%, частые – 56–75% и доминирующие – 76–100%) [14, 15].

Микробиологический анализ эдафосферы (почвы, находящейся вне влияния корней растений), ризосферы (почвы, на которую воздействуют корни растений) и ризопланы (поверхности корней растений) крестовника скученного (*Thephrosia palustris*) и лисохвоста лугового (*Alopecurus pratensis*) проводили согласно руководству [11, 16].

Определение агрохимических показателей почв проводили по стандартным методикам [17]. Анализ содержания  $C_{орг}$  в почвенных образцах выполняли по методу Тюрина в модификации Никитина. Кислотность почвы ( $pH_{водн.}$ ) определяли потенциометрически. Содержание подвижных форм фосфора и калия изучали по методу Кирсанова в солянокислой вытяжке. Общий азот в почве определяли методом Кьельдаля.

Определение содержания нефтепродуктов в почвах проводили методом экстракции нефтепродуктов с помощью четыреххлористого углерода с последующим хроматографическим отделением нефтепродуктов от сопутствующих органических соединений других классов и количественным определением

нефтепродуктов по интенсивности поглощения в ИК-области спектра [18].

## Результаты и обсуждение

На начальных стадиях после нефтяного загрязнения (первый-второй год после разлива) при высоких концентрациях нефти практически были подавлены почти все группы микроорганизмов, в том числе и микромицеты [8].

Исследования были продолжены в 1999–2004 гг. К этому моменту концентрация остаточной нефти на участках № 2, 3, 4 ощутимо снизилась и составила 26,9, 10–12 и 1% соответственно.

Через семь лет на самовосстанавливающихся участках наблюдались явные изменения в составе почвенной микробиоты [19], в том числе и микромицетов.

Необходимо отметить, что с уменьшением количества нефти в почве в ходе процесса самоочищения на участке с первоначально высоким загрязнением (№ 2) численность целлюлозолитических грибов в почве еще недостаточно высока по сравнению с рекультивированной и слабозагрязнённой самовосстанавливающейся почвой. Известно, что активизация этой группы микромицетов может служить критерием положительных изменений в процессе очищения почвы от нефтяного загрязнения до состояния, обеспечивающего начало роста растений [8].

В наиболее загрязнённой почве после 7-летнего процесса самоочищения численность сахаролитических микромицетов, учитываемая на среде Чапека, увеличилась на 2-3 порядка по сравнению с фоновыми показателями (табл. 1).

Почва, в которой проходил процесс самоочищения и уровень нефтяного загрязнения не превышал 1%, характеризовалась наибольшей численностью микромицетов, поскольку низкие концентрации нефти и её фракций не токсичны и являются дополнительным источником питания для гетеротрофных почвенных микроорганизмов [20]. Содержание целлюлозоразрушающих микроорганизмов в рекультивированных почвах с низким содержанием нефти высокое. Вероятнее всего, эти почвы пригодны для нормального роста и развития растений.

Показатели биомассы грибного мицелия свидетельствуют о том, что присутствие нефтяных углеводородов способствует развитию микромицетов в почве. После 7-летнего процесса самоочищения, рекультивации нефте-

Таблица 1

Количественная характеристика микобиоты в фоновых, самовосстанавливающихся и рекультивированных почвах Возейского месторождения (скважина № 203) Усинского района (2004 г.)

Глубина взятия образца, см	Количество микромицетов на средах, млн. КОЕ/г в.с.п.		Мицелиальная биомасса микромицетов, мг/г
	Гетчинсона	Чапека	
Фоновая почва			
0-10	<u>0,6</u> 0,3-0,9	<u>2,06</u> 1,07-3,06	0,032±0,001
Почва, степень загрязнения 26,9%			
0-10	<u>17,3</u> 14,0-20,6	<u>18,7</u> 14,2-21,4	0,19±0,004
Почва, степень загрязнения 10–12%			
0-10	<u>820,1</u> 238,9-1074	<u>27,5</u> 12,0-32,03	0,23±0,005
Почва, степень загрязнения 1%, после проведения рекультивации			
0-10	<u>815,8</u> 95,7-1032	<u>22,97</u> 7,14-38,8	0,22±0,004

Примечание: в числителе – среднее значение, в знаменателе – минимальное и максимальное значение.

загрязнённых участков численность грибных зачатков в торфяно-глеевой почве возрастала в 9–11 раз, превосходя фоновые показатели. Данные, полученные при определении длины и биомассы грибного мицелия в почве, также подтверждают этот факт. Из нефтезагрязнённых почв в 5–7 раз по массе было выделено больше мицелия, чем из фоновых почв.

Данные по изменению видового состава и структуры комплексов почвенных микроскопических грибов отражают влияние сроков нефтяного загрязнения, его концентрации, а также проведённых рекультивационных мероприятий по восстановлению почвенного покрова. Из исследованных фоновых почвенных образцов, взятых на участке № 1 вне зоны загрязнения, было выделено 28 видов почвенных микромицетов, которые относятся к 13 родам из отделов *Zygomycota*, *Ascomycota*, формального класса *Anamorphic fungi*, и три культуры микромицетов, идентифицированные только до родов (табл. 2).

Было отмечено, что среди почвенных горизонтов органогенный гумусовый горизонт характеризуется наиболее разнообразным видовым составом микобиоты и её количеством. Количество колониеобразующих единиц в верхнем горизонте достигает значений  $20,6 \times 10^4$  пропагул на 1 г воздушно-сухой почвы (табл. 1).

Из сильно загрязнённой почвы (№ 2) были выделены тёмноокрашенный стерильный мицелий и 10 видов микромицетов из отдела *Ascomycota* и формального класса *Anamorphic fungi*. Отдел *Ascomycota* пред-

ставлен тремя видами – целлюлозолитиками рода *Chaetomium*, *Anamorphic fungi* – одним видом из рода *Aspergillus* и пятью видами рода *Penicillium* (табл. 2). При нефтезагрязнении наблюдается подавление видового разнообразия микромицетов. Выделенная микобиота так же, как и на фоновом участке, характеризуется преобладанием представителей рода *Penicillium* – по численности и видовому разнообразию. Значительным обилием характеризуются тёмноокрашенный стерильный мицелий и *Aspergillus fumigatus*. Пять выделенных нами из нефтезагрязнённых почв видов микромицетов (*A. fumigatus*, *Penicillium funiculosum*, *P. paxilli*, *P. lanosum*, *P. tardum*) по результатам исследований ряда авторов являются устойчивыми к антропогенным воздействиям и являются надёжным биоиндикационным показателем неблагоприятного экологического состояния изучаемого объекта [20 – 25].

Микромицеты в загрязнённой почве обнаружены только в верхнем слое (0–5 см). На глубине 5–10 см отмечено полное отсутствие грибов. Таким образом, загрязнение нефтью приводит к существенному уменьшению видового богатства микромицетов, их разнообразия, подавлению их жизнедеятельности в нижних профилях почвы, появлению несвойственных данным зональным условиям видов, изменению представленности отдельных видов (табл. 2).

Из почвы (№ 4), где первоначальное загрязнение нефтью составляло всего около 1–5%, были выделены 16 видов микромице-

Видовой состав микромицетов, выделенных из исследованных почв

Микромицеты	Участки							
	№ 2		№ 3		№ 4		№ 1	
	Глубина отбора образцов, см							
	0-5	5-10	0-5	5-10	0-10	10-20	0-10 (A <sub>0</sub> ' )	10-20 (A <sub>0</sub> '' )
Отдел <i>Zygomycota</i>								
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>M. racemosus</i> Fres.	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Mucor</i> sp.	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>Rhizopus</i> sp.	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Umbellopsis isabellina</i> (Oudem.) W. Gams	-	-	+	-	+	-	+	-
<i>U. ramanniana</i> (Moller) W. Gams	-	-	+	-	+	+	-	-
<i>U. vinacea</i> Dixon-Stewart	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Mortierella verticillata</i> Linnem.	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Mortierella</i> sp.	-	-	+	-	+	-	+	+
Отдел <i>Ascomycota</i>								
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Ch. indicum</i> Cda	+	-	+	-	-	-	+	-
<i>Ch. spirale</i> Zopf.	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Chaetomium</i> sp.	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Anamorphic fungi</i>								
<i>Acremonium strictum</i> W. Gams	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Aspergillus flavus</i> Link.	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>A. fumigatus</i> Fres.	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>A. oryzae</i> Cohn.	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Geomyces pannorum</i> (Link) Sigler, Carm.	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers) Lk.	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cl. cladosporioides</i> (Fres.) de Vries	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Cladosporium</i> sp.	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Humicola grisea</i> Traaen	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Humicola</i> sp.	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Fusarium moniliforme</i> Sheldon	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Paecilomyces variotii</i> Bain.	-	-	+	-	+	-	+	-
<i>Penicillium daleae</i> Zaleski	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>P. decumbens</i> Thom	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>P. rugulosum</i> Thom, Bull et al.	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>P. lanosum</i> Westl	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>P. funiculosum</i> Thom	+	-	+	-	+	-	-	-
<i>P. lividum</i> Westl	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>P. luteum</i> Zuk.	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>P. nigricans</i> (Bain.) Thom	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>P. olivaceum</i> Sopp.	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>P. paxilli</i> Bain.	+	-	+	+	+	-	+	-
<i>P. tardum</i> Thom	+	-	+	-	+	-	-	-
<i>P. thomii</i> Maire	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>P. verrucosum</i> Dierckx var. <i>cyclopium</i> Samson Stolk et Hadlok.	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Trichoderma viride</i> Pers. ex Fr.	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>T. sympodanum</i> Kulik	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>T. album</i> Hreuss	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Trichosporiella</i> sp.	-	-	-	-	-	-	+	-

Микромицеты	Участки							
	№ 2		№ 3		№ 4		№ 1	
	Глубина отбора образцов, см							
	0–5	5–10	0–5	5–10	0–10	10–20	0–10 (A <sub>0</sub> ' )	10–20 (A <sub>0</sub> '' )
<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers) Link ex Fries	–	–	–	–	–	–	+	–
<i>Macrosporium commune</i> Raben.	–	–	–	–	–	–	+	–
<i>Phoma</i> sp.	–	–	–	–	–	–	+	–
<i>Mycelia sterilia</i>								
<i>Mycelia sterilia</i> (светлоокрашенный)	–	–	+	–	+	–	+	+
<i>Mycelia sterilia</i> (тёмноокрашенный)	+	–	+	+	+	–	–	–
Всего 47	9	0	18	4	17	2	29	5

Примечание. № 1 – контрольный участок; № 2 – участок с высокой степенью загрязнения; № 3 – участок после рекультивации и № 4 – слабозагрязнённый участок.

тов, принадлежащих к 10 родам из отделов *Zygomycota*, *Ascomycota* и *Anamorphic fungi* (табл. 2), а также 5 штаммов грибов, определённых только до родов. Доминирующее положение занимает тёмноокрашенный стерильный мицелий, который характерен и для сильно загрязнённой почвы, а также грибы с более широкой экологической амплитудой (табл. 2).

Рассмотрим результаты изучения микромицетов в рекультивированной почве (№ 3), где был использован комплекс мер по восстановлению почвенного покрова – обработка микробным препаратом МУС-1 при внесении органических и минеральных удобрений с последующим посевом многолетних трав. Из данной почвы было выделено 20 микромицетов, принадлежащих к 8 родам из отделов зигомикетов, аскомикетов и анаморфных грибов (табл. 2). После проведения рекультивации по сравнению с участком № 2 возросло видовое разнообразие и количество грибных пропагул. В составе микромицетов 40% приходится на виды рода *Penicillium*, а стерильный мицелий представлен как тёмноокрашенными, так и светлоокрашенными формами. Однако отметим, что микобиота всё ещё характеризуется преобладанием грибов, типичных для антропогенно нарушенных почв. Светлоокрашенные микромицеты, часто встречающиеся в целинной почве, малочисленны и оказались в разряде редких и случайных (табл. 3). Состав доминантов стал существенно разнообразнее, чем на сильно загрязнённом участке, появились типичные редкие виды.

Таким образом, на восстановительные меры микромицеты отреагировали перегруппировкой видов и увеличением разнообра-

зия. Можно предположить, что начался процесс очищения субстрата. Однако надо отметить, что активизация биологических процессов не распространяется глубже верхнего слоя (0–5 см). Вместе с тем корни растений охватывают слой до 7–10 см; они вовлекаются в процесс очищения субстрата.

Для суждения о процессе восстановления загрязнённых экосистем с участием микобиоты использован коэффициент сходства по Жаккару (табл. 4).

Наибольшее сходство сообществ микромицетов наблюдалось в почве после проведения рекультивации и на участке с низким уровнем нефтяного загрязнения почвы, наименьшее сходство отмечено для сообщества микромицетов незагрязнённой целинной и сильно загрязнённой почвы. Микобиота целинных почв характеризуется наибольшим разнообразием видов микромицетов; коэффициенты сходства с микобиотой нефтезагрязнённых почв здесь имеют самые низкие значения [26].

На вышеперечисленных опытных участках впервые были исследованы микромицеты прикорневой зоны лисохвоста лугового (*Alopecurus pratensis*), который посеяли для проведения дополнительной фиторемедиации рекультивированного участка с первоначальным использованием микробиологического препарата и органоминеральных удобрений, а также крестовника скученного (*Thephrosia palustris*), пионерного растения на нефтезагрязнённых почвах [9].

Известно, что растения тесно взаимосвязаны с микроорганизмами и за счёт изменения качественного и количественного состава ми-

Таблица 3

Структура комплекса типичных видов микромицетов торфяно-глеевой почвы при разной степени загрязнения нефтью

Доминирующие	Типичные частые	Типичные редкие
Фоновая почва		
<i>Mycelia sterilia</i> (с/о) <i>Geomyces pannorum</i> <i>Acremonium strictum</i> <i>Penicillium decumbens</i>	<i>P. thomii</i> <i>Mucor racemosus</i> <i>Mortierella ramanniana</i>	<i>Penicillium lanosum</i> <i>P. lividum</i> <i>P. luteum</i> <i>P. verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i> . <i>Trichoderma viride</i> <i>Macrosporium commune</i> <i>Chaetomium indicum</i>
Почва, степень загрязнения 26,9%		
<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Mycelia sterilia</i> (т/о)	<i>Chaetomium globosum</i> <i>Ch. indicum</i> <i>Ch. spirale</i> <i>Penicillium funiculosum</i> <i>P. paxilli</i> , <i>P. lanosum</i> <i>P. tardum</i>	<i>P. daleae</i>
Почва, степень загрязнения 1%, после проведения рекультивации		
<i>Mycelia sterilia</i> (т/о) <i>Chaetomium globosum</i> <i>Fusarium moniliforme</i> <i>Penicillium paxilli</i>	<i>Ch. spirale</i> <i>Paecilomyces variotii</i> <i>Penicillium funiculosum</i> <i>P. lanosum</i> <i>P. tardum</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i> <i>Mucor hiemales</i> <i>Umbellopsis ramanniana</i> <i>U. vinacea</i> <i>Ch. indicum</i>
Почва, степень загрязнения 10–12 %		
<i>Mycelia sterilia</i> (т/о) <i>Penicillium paxilli</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Penicillium funiculosum</i> <i>P. daleae</i> <i>P. lanosum</i> <i>P. tardum</i>	<i>Paecilomyces variotii</i> <i>Penicillium</i> sp.1 <i>Umbellopsis ramanniana</i> <i>U. vinacea</i> <i>Mucor</i> sp.

Таблица 4

Сходство комплексов микромицетов опытных участков по Жаккару, %

Номера участков	Коэффициенты Жаккара, %			
	1	2	3	4
1	–			
2	5,4	–		
3	9,1	31,8	–	
4	18,2	30,8	42,9	–

Примечание. 1 – контрольный участок; 2 – участок с высокой степенью загрязнения; 3 – участок после рекультивации и 4 – слабозагрязнённый участок.

кробиоты в прикорневой зоне способны влиять на процессы, протекающие в почве. Микромицеты являются постоянным компонентом почвенных и ризосферных микробных сообществ, наряду с другими ризосферными микроорганизмами играют важную роль в развитии растений, участвуя в снабжении последних элементами питания, фитогормонами, витаминами и другими факторами роста [16, 27, 28]. Между тем в мире растёт интерес к ризосфере в аспекте её использования для очищения загрязнённых земель. Микроорганизмы ризосферы растений способны к деградации

самых разнообразных загрязнителей. В ризосфере клевера, который также был использован для биорекультивации нефтезагрязнённых почв в зоне южной тайги [16], наблюдалась более высокая скорость деструкции нефти, содержание микроорганизмов в ризосфере превышало в несколько раз их количество в зоне, удалённой от корней.

Было проведено сравнительное исследование структуры микромицетных комплексов прикорневой зоны растений лисохвоста и крестовника в условиях нефтезагрязнения и роли комплекса «растение+микробиота»

в очистке почвы от нефтезагрязнения в условиях Севера. Исследования проводились на тех же опытных участках, где определяли их микромицетный состав с различным остаточным содержанием нефти.

**Крестовник скученный (=болотный)** (*Thephrosia palustris*). Это растение одно из первых заселяет нефтезагрязнённые почвы. В связи с этим было предпринято детальное изучение почвы в зоне корней этого растения.

С этой целью на сильно загрязнённом участке вне опыта в июне, июле и августе 2006 г. были отобраны монолиты на глубине до 15 см из-под крестовника скученного для проведения химического и микологического анализов. Содержание нефти составляло в эдафосфере – 27%, в ризосфере – 2,6%, ризоплане – 0,2% (табл. 5).

Пробы, отобранные в июне месяце, характеризовались низкой биогенностью. В слое 0–3 см прикорневая почва характеризовалась количеством грибов в среднем  $3 \times 10^2$  КОЕ/г в.с.п., а в зоне ризоплана (почва на корнях) –  $5 \times 10^2$  КОЕ/г в.с.п. В прикорневой почвенной массе, как и в ризосфере, были обнаружены только светло- и тёмноокрашенные представители порядка *Mycelia sterilia*.

К июлю состав микромицетов существенно изменился. Содержание грибов в ризосферной зоне и в ризоплане существенно увеличилось. Появились новые виды грибов: *Alternaria alternata*, *Trichoderma viride*, *Umbelopsis isabellina*, *Penicillium paxilli*, *P. funiculosum*, *P. tardum*, *Aspergillus ustus*, *Chaetomium globosum* и др. – всего около 15 видов.

Наибольшим биоразнообразием микромицетов характеризовались пробы, взятые в августе. При этом количество грибов в ризосфере увеличилось в 20 раз по сравнению с июльскими данными, а видовой состав дополнился видами *Mortierella alpina*, *Chaetomium spirale*. Численность остальных микроорганизмов составила при этом  $6 \times 10^8$  КОЕ/г в.с.п., в то время как их содержание вне корня было в среднем  $13 \times 10^6$  КОЕ/г почвы.

Количество и состав грибов в почве вне зоны роста крестовника значительно беднее, чем в ризосфере. Это объясняется тем, что ризосфера богата питанием (табл. 5), обусловленным корневыми выделениями, в которых содержатся сахара, аминокислоты, витамины, ауксины, фосфатиды и различные ароматические вещества [16, 29]. Известно, что в ризосфере более энергично протекают многие химические и биохимические процессы (быстрее разрушаются различные минералы, горные породы, активнее инактивируются загрязняющие вещества и т. д.). Этот процесс вызывается не только корневыми выделениями, но и микробиотой ризосферы. В зоне ризосферы крестовника, развивающегося на почве, подвергшейся нефтяному загрязнению, увеличилось количество видов грибов, характерных для нефтезагрязнённых почв, – *Penicillium tardum*, *P. paxilli*, *Aspergillus ustus*, *Rhizopus sp.*, а также чувствительных к нефтяному загрязнению – *P. versicolom var. cyclopium*, *Trichoderma viride*, *T. symposium*, *Umbelopsis ramanniana*, *Mucor racemosus*. Появление первых говорит об идущих процессах деструкции нефти, а последних – свидетельствует о положительной восстановительной сукцессии.

Эта тенденция подтверждается содержанием остаточной нефти в почве: ризосферная почва характеризовалась нефтяным загрязнением менее 3%, в ризоплане содержание нефти составляло 0,2% (рис.) на фоне загрязнения вне зоны роста растений в 26,9%.

Таким образом, можем предположить, что крестовник способен заселять территории, подверженные нефтяному загрязнению до 27% и более, создавая в комплексе с почвенными микроорганизмами очищенные зоны вблизи корней.

**Лисохвост** (*Alopecurus pratensis*). Под хорошо развитым растением лисохвоста лугового в августе был взят почвенный монолит, проведён анализ микобиоты в дернине и в прикорневой массе. По количественным показателям микобиоты почва ризосферы лисохвоста относится к богатым субстратам [30].

Таблица 5

Химическая характеристика почвы под крестовником (участок № 2) и вне зоны его роста

Вариант	Глубина отбора образца, см	рН <sub>водн.</sub>	N <sub>гидр.</sub>	К	Р	Содержание нефти, %
Эдафосфера	0–5	6,8	2,9	9,7	15,7	26,9
Ризосфера	0–10	7,0	2,3	14,0	18,7	2,6
Ризоплана	0–10	6,9	5,6	43,8	25,0	0,2

По нашим данным, в ризосфере лисохвоста насчитывается в несколько раз больше грибов, чем в почве без растений. Численность микромицетов здесь достигает 86 млн КОЕ/г в.с.п., в то время как их количество в почве без растений составляет 23 млн КОЕ/г в.с.п.

Самыми распространёнными по частоте встречаемости были виды родов *Mucor*, *Mortierella*, *Umbellopsis*, *Rhizopus*, *Penicillium* и *Trichoderma*. Род *Mucor* был представлен 12 видами, составляющими более 50% грибов, определённых в ризосфере и эдафосферной зоне. Частота встречаемости этих видов рода *Mucor* была очень высокой и составляла 90–100%, что позволяет считать их доминантами для ризосферы лисохвоста в рассматриваемом опыте. В составе видов определены *Mucor racemosus*, *M. hiemalis*, *M. circinelloides*, *M. plumbeus*, *M. corimbifer*, *M. pussillus*, *Mucor* sp. и др. Было выделено 2 вида рода *Mortierella*: непосредственно на корнях – *M. alpina*, в ризосфере и зоне эдафосферы – *M. elongata*, и виды рода *Umbellopsis* – *U. ramanniana*, *U. vinacea*. Род *Rhizopus* был представлен видом *R. nigricans*, обильно растущим в ризосфере и во внекорневой зоне; род *Penicillium* – видами *P. citrinum*, *P. paxilli*. Из рода *Trichoderma* в ризосфере встречается вид *T. viride*.

Из прикорневой зоны был выделен также тёмноокрашенный стерильный мицелий. Встречаемость этого гриба составила 9%, тогда как в загрязнённой почве под крестовником именно этот вид характеризуется высокой частотой встречаемости.

На основании проведённых исследований необходимо отметить, что естественное самоочищение торфяно-глеевых почв на Крайнем Севере от нефтяного загрязнения является длительным процессом. Значительную роль в процессах самоочищения почв от нефти играют микроорганизмы, в том числе и ми-

кромицеты, что делает необходимым включать их в состав биологических препаратов для рекультивации, которые по традиции создают из бактериальных углеводородокисляющих культур. Важно использовать также и аборигенные микромицеты, проявляющие высокую нефтедеструктивную активность.

При рекультивации процесс разрушения нефтезагрязнения проходит, по крайней мере, в два этапа: 1) микробное воздействие, способствующее снижению степени загрязнения до уровня, не препятствующего росту растений; 2) поселение растений и доочистка субстрата под воздействием концентрирующейся в корневой зоне бактериально-грибной микробиоты.

Опыт также показал, что местные виды как микроорганизмов, так и растений являются наиболее эффективными в освоении нефтезагрязнённых земель. Испытанные в опыте виды многолетних трав способны, вероятно, развиваться при уровне загрязнения 10–27%.

Установлены изменения комплексов микромицетов в исследуемых почвах под влиянием нефтезагрязнений. Во-первых, прослеживается снижение разнообразия грибных комплексов в почвах по сравнению с фоновыми, зональными биогеоценозами, во-вторых, происходит увеличение доминирующих и часто встречающихся видов при уменьшении числа редких, появление резистентных к нефтезагрязнениям видов почвенных микроскопических грибов. В нефтезагрязнённых почвах, где происходит самовосстановление и ведутся рекультивационные мероприятия, наблюдается формирование грибных комплексов, характерных для более южных регионов по сравнению с зональными, что подтверждается данными других исследователей [28, 31, 32]. Под влиянием нефтезагрязнений в почвах исследуемых территорий происходит накопление потенциально опасных для человека штаммов видов микромицетов: *A. fumigatus*, *Paecilomyces variotii*, *F. moniliforme* и т. д. [24].

При глубоких нарушениях природного биогеоценоза, в том числе при нефтезагрязнении, интенсивные меры очистки способствуют активизации процесса восстановления микробиоты. Однако процесс восстановления биогеоценоза, близкого к типу ненарушенного, в целом зависит от восстановления характерного для территории типа растительного сообщества и биологического оборота растительного материала.

Наилучшие результаты рекультивации нефтезагрязнённых почв получены в вари-

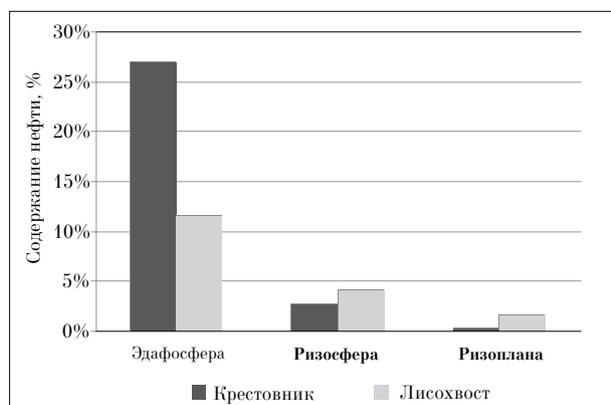


Рисунок. Содержание нефти (в %) в прикорневой зоне лисохвоста и крестовника

анте с применением сочетания биопрепарата, минеральных удобрений и последующего посева лисохвоста. В этом случае наблюдалось резкое снижение концентрации нефти в почве и увеличение количества и видового разнообразия грибов.

На основе полученных результатов были сделаны следующие выводы.

Загрязнение нефтью и нефтепродуктами торфяно-глеевых почв на Севере вызывает изменения комплексов микромицетов. При низких уровнях загрязнения прослеживается стимулирование развития микромицетов, а при высоких – снижение разнообразия грибных комплексов в почвах по сравнению с фоновыми почвами. Наблюдается появление грибов, характерных для более южных регионов. Под влиянием нефтезагрязнений в почве исследуемых территорий происходит накопление потенциально опасных для человека видов микромицетов *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium moniliforme*, *Paecilomyces variotii*.

Интенсивность восстановления нефтезагрязнённых почв повышается при проведении рекультивационных мероприятий. Наиболее эффективным способом восстановления почвенного покрова в условиях Севера является комплексное использование биопрепаратов на основе местных углеводородокисляющих микроорганизмов, внесение необходимых минеральных удобрений, а также проведение последующей фиторемедиации аборигенными растениями, устойчивыми к высоким дозам нефтепродуктов в почве.

В ходе работы было установлено, что крестовник скученный (*Thephrosia palustris*) устойчив к нефтяному загрязнению в условиях Севера, обладает способностью к быстрому заселению, формируя пионерную группировку на нефтезагрязнённой территории. Лисохвост луговой, используемый при проведении фиторемедиации нефтезагрязнённых почв, активно участвует в восстановлении почвенного покрова, подверженного загрязнению нефтью, в условиях Крайнего Севера. Ризосфера крестовника и лисохвоста богата микромицетами, которые участвуют в процессе деструкции нефтяных углеводородов, численность грибов на 3-4 порядка больше по сравнению с количеством микромицетов в почвах без растительного покрова. В зоне ризосферы крестовника происходит снижение содержания нефти с 30 до 1,4%. Крестовник скученный является перспективным агентом для проведения фиторемедиационных работ в условиях Севера.

## Литература

1. Паринкина О.М. Микрофлора тундровых почв: Эколого-географические особенности и продуктивность. Л.: Наука, 1989. 159 с.
2. Стенина Т.А. Биологическая активность // Подзолистые почвы центральной и восточной частей европейской территории СССР. Л.: Наука, 1980. С. 160–165.
3. Андерсон Г.К., Пропадуца Л.А. Изучение факторов, влияющих на биоразложение нефти в почве // Коррозия и защита в нефтегазовой промышленности. 1979. № 3. С. 30–32.
4. Киреева Н.А., Водопьянов В.В., Мифтахова А.М. Биологическая активность нефтезагрязнённых почв. Уфа: Гилем, 2001. 376 с.
5. Оборин А.А., Калачникова И.Г., Масливец Т.А. и др. Биологическая рекультивация нефтезагрязнённых земель в условиях таёжной зоны // Восстановление нефтезагрязнённых почвенных экосистем. М.: Наука, 1988. С. 140–159.
6. Зимонина Н.М. Почвенные водоросли в условиях нефтяного загрязнения (на примере Возейского месторождения Усинского района Республики Коми). Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Сыктывкар. 1996. 27 с.
7. Хомякова Д.В. Состав углеводородокисляющих микроорганизмов нефтезагрязнённых почв Усинского района Республики Коми. Дисс. канд. биол. наук. М.: МГУ, 2003. 113 с.
8. Маркарова М.Ю. Использование углеводородокисляющих бактерий для восстановления нефтезагрязнённых земель в условиях Крайнего Севера. Дис. канд. биол. наук. Пермь. 1999. 156 с.
9. Посттехногенные экосистемы Севера. СПб.: Наука, 2000. 159 с.
10. Переработка гидролизного лигнина и получение на его основе материала для рекультивации техногенно-нарушенных территорий Крайнего Севера // Химия в интересах устойчивого развития. 1998. Т. 6. С. 303–309.
11. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991. 303 с.
12. Егорова Л. Н. Почвенные грибы Дальнего Востока: Гифомицеты. Л.: Наука, 1986. 207 с.
13. Domsh K. H., Gams W., Anderson T.-H. Compendium of soil fungi. INW-Verlag Eching. 2007. 672 p.
14. Мирчинк Т.Г., Озерская С.М., Марфенина О.Е. Способы выявления типичных для определённых условий комплексов микроскопических грибов на основе характеристики их структуры // Биологические науки. 1982. Вып. 20. С. 198–226.
15. Кураков А.В. Методы выделения и характеристики комплексов микроскопических грибов наземных экосистем: Учебно-методическое пособие. М.: МАКС Пресс, 2001. 92 с.
16. Иларионов С.А. Экологические аспекты восстановления нефтезагрязнённых почв. Екатеринбург: УрО РАН, 2004. 194 с.

17. Аринушкина Е.В. Руководство по химическому анализу почв. М.: Изд-во МГУ, 1970. 487 с.
18. Методика выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в почвах и донных отложениях методом ИК-спектроскопии. ПНД Ф 16.1:2.2.22-98Ю, Тюменский ГУ М. 1998.
19. Хабибуллина Ф.М., Арчегова И.Б., Шубаков А.А. Изучение микробиоты нефтезагрязнённых почв Усинского района Республики Коми // Современные проблемы загрязнения почв: Тезисы Междунар. науч. конф. Москва: МГУ, 2004. С. 286–287
20. Гузев В.С., Левин В.С., Селецкий Г.И., Бабьева Е.Н., Калачникова И.Г., Колесникова Н.М., Оборин А.А., Звягинцев Д.Г. Роль почвенной микробиоты в рекультивации нефтезагрязнённых почв // Микроорганизмы и охрана почв. М.: Изд-во МГУ, 1989. С. 121–150.
21. Жданова Н.Н., Васильевская А.И. Экстремальная экология грибов в природе и эксперименте. Киев: Наук. думка, 1982. 167 с.
22. Лебедева Е.В. Микробиоты – индикаторы техногенного загрязнения почв // Микология и криптогамная ботаника в России: традиции и современность: Труды Междунар. конф. СПб. 2000. С. 173–176.
23. Марфенина О.Е. Антропогенные изменения комплексов микроскопических грибов в почвах. Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М. 1999. 49 с.
24. Марфенина О.Е. Изменение комплекса грибов рода *Penicillium* в почвах подзолистой зоны при антропогенных воздействиях // Микология и фитопатология. 2000. Вып. 4. Т. 34. С. 38–41.
25. Киреева Н.А., Галимзянова Н.Ф., Мифтахова А.М. Микробиоты почв, загрязнённых нефтью, и их фитотоксичность // Микология и фитопатология. 2000. Вып. 4. Т. 35. С. 36–41.
26. Хабибуллина Ф.М., Арчегова И.Б., Шубаков А.А. Исследование способности нефтеокисляющих бактерий утилизировать углеводы нефти // Биотехнология. 2002. № 6. С. 57–62.
27. Широких И.Г., Широких А.А. Микробные сообщества кислых почв Кировской области. Киров. 2004. 332 с.
28. Кураков А.В., Ильинский В.В., Котелевцев С.В., Садчиков А.П. Биоиндикация и реабилитация экосистем при нефтяных загрязнениях. М.: Издательство «Графикон», 2006. 336 с.
29. Мирчинк Т.Г. Почвенная микология. М.: Изд-во МГУ, 1988. 220 с.
30. Звягинцев Д.Г. Почва и микроорганизмы. М.: Изд-во МГУ, 1987. 256 с.
31. Atlas R.M., R. Bartha. Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation / Ed. by K.C. Marshall // Adv. Microb. Ecol. 1992. V. 12. P. 287–338.
32. Киреева Н.А., Рафикова Г.Ф. Диагностика нефтезагрязнённых почв по показателям комплекса микробиоты // Современные проблемы загрязнения почв: Матер. II Междунар. науч. конф. М. 2007. С. 80–82.