

ВЛИЯНИЕ РЕКУЛЬТИВАЦИИ БИОПРЕПАРАТАМИ НА МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ГРИБЫ ПОДЗОЛИСТОГО ГРУНТА

© 2011 М.Д. Бакаева¹, Н.Н. Силищев¹, О.С. Смолова²

¹Институт биологии Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

²ООО «Юганск НИПИ», г. Нефтеюганск

Поступила 29.06.2011

Исследованы численность и видовой состав микроскопических грибов в подзолистом грунте, рекультивированном с помощью биологических препаратов Ленойл и Деойл. Показано, что рекультивация биопрепаратами обеспечивает более высокую скорость разложения углеводов в грунте по сравнению с активностью аборигенных микроорганизмов. Под действием биологических препаратов в грунте формировался более разнообразный и близкий к контрольному комплекс микроскопических грибов.

Ключевые слова: микроскопические грибы, нефтяное загрязнение, биологическая рекультивация.

Существующие технологии разработки нефтяных месторождений и транспортировки нефти и продуктов ее переработки не исключают аварийных ситуаций, при которых в окружающую среду попадает значительное количество углеводов.

Более полное, экологически безопасное и экономически обоснованное восстановление загрязненных нефтью и нефтепродуктами почв и водоемов может быть достигнуто с использованием эффективных биологических препаратов.

Вносимые с биопрепаратами окисляющие углеводороды микроорганизмы включаются в состав микробного сообщества почв, за счет возникающих трофических связей воздействуя на другие его компоненты [1]. Их влияние на микробное сообщество может носить также косвенный характер в связи с изменением физико-химических характеристик почв в результате окисления нефтяных углеводов.

Одной из ведущих групп микроорганизмов в почвах северных территорий являются микроскопические грибы. Они активно участвуют в деструкции органического вещества в условиях невысоких температур и пониженной кислотности среды [2]. Поэтому изучение изменений в видовом составе и численности этой группы микроорганизмов в процессе восстановления почв после нефтяного загрязнения является актуальной задачей.

Цель работы – исследование влияния биологических препаратов Ленойл и Деойл на численность и видовой состав микроскопических грибов загрязненного нефтью подзолистого грунта.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в условиях модельного эксперимента на образцах почвогрунта средне-подзолистого легкосуглинистого, отобранного на территории Тюменской области (гумус 4%; рН_{водный} 6,3; N_{общ.} 1900 мг/кг, влажность 60%).

В качестве загрязнителя использована товарная нефть Угутского месторождения (температура начала кипения 85°C, содержание серы 1,1 мас.%) в концентрации 4%, 8% и 16% от веса грунта.

Через сутки после загрязнения почво-грунт обработан биопрепаратами «Ленойл» (титр 10⁹ КОЕ/г) и «Деойл» (титр 10⁹ КОЕ/г) в количестве 1 г/кг грунта.

Грунт инкубировали в емкостях по 2 кг при температуре воздуха 14-17°C в течение 90 сут.

В состав биопрепарата «Ленойл» входит консорциум микроорганизмов *Bacillus brevis* и *Arthrobacter species*, используемый для очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов и запатентованный в РФ (Патент № 2232806). Биопрепарат с рабочим названием «Деойл» получен в ИБ УНЦ РАН и представляет собой консорциум бактерий, на основе морфолого-культуральных признаков и анализа последовательностей генов 16S рРНК идентифицированных как *Rhodococcus gingshengii* и *Pseudomonas nitroreducens*.

Содержание углеводов в грунте определяли гравиметрически после экстракции гексаном. Выделение и количественный учет микромицетов проводили по общепринятым методикам на питательной среде Чапека [3] в 10-кратной повторности. Идентификацию видов проводили по определителям [4-6]. Видовые названия микроскопических грибов уточняли по пополняемым спискам опубликованных видов в базе данных «Species fungorum» (www.speciesfungorum.org).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определение численности микроскопических грибов показало ее увеличение в вариантах опыта с загрязнением нефтью 8% и 16% по сравнению с незагрязненным контролем, где она составила (1,0±0,3)·10⁴ КОЕ/г через 60 сут и (5,3±0,4)·10³ КОЕ/г через 90 сут (табл. 1).

Введение биологических препаратов в почву в аналогичных вариантах опыта, напротив, способствовало уменьшению численности микроскопических грибов по сравнению с загрязненным грунтом.

Бакаева Маргарита Дмитриевна, канд. биол. наук;
Силищев Николай Николаевич, докт. биол. наук; Смолова
Ольга Сергеевна, e-mail: biolab316@yandex.ru

Таблица 1. Численность микроскопических грибов в загрязненной нефтью и рекультивированной почве, КОЕ/г

Варианты опыта	Концентрация нефти, %					
	4		8		16	
	Срок инкубации, сут					
	60	90	60	90	60	90
Без биопрепаратов	$(9,1 \pm 0,4) \cdot 10^3$	$(9,1 \pm 0,4) \cdot 10^3$	$(8,2 \pm 0,7) \cdot 10^4$	$(3,5 \pm 0,4) \cdot 10^5$	$(9,2 \pm 0,4) \cdot 10^4$	$(2,2 \pm 0,3) \cdot 10^5$
Ленойл	$(2,0 \pm 0,3) \cdot 10^4$	$(3,1 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(1,5 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(7,7 \pm 0,5) \cdot 10^3$	$(3,6 \pm 0,3) \cdot 10^4$	$(4,6 \pm 0,6) \cdot 10^4$
Деойл	$(1,3 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(1,4 \pm 0,3) \cdot 10^4$	$(4,9 \pm 0,3) \cdot 10^4$	$(6,3 \pm 0,5) \cdot 10^3$	$(9,0 \pm 0,7) \cdot 10^3$	$(1,2 \pm 0,3) \cdot 10^4$

Нефть в концентрации 4% не оказывала достоверного влияния на показатель численности микромицетов как в вариантах с биопрепаратами, так и без их применения. Наблюдаемые результаты, возможно, объясняются возникновением конкурентных взаимоотношений между активно размножающимися углеводород окисляющими микроорганизмами и доминирующими в вариантах с 8% и 16% загрязнении микроскопическими грибами.

Через один и два месяца инкубации в образцах почвогрунта был определен и проанализирован видовой состав микроскопических грибов как индикатор экологического состояния почв. Всего было выделено и идентифицировано 56 изолятов микроскопических грибов, относящихся к 9 родам. Для незагрязненного грунта были характерны представители родов *Chrysosporium*, *Cladosporium*, *Huiphoderma*, *Penicillium*, *Paecilomyces* (табл. 2).

Таблица 2. Видовой состав микроскопических грибов подзолистого грунта после загрязнения нефтью и рекультивации биопрепаратами

Виды грибов	Без биопрепаратов			Ленойл			Деойл			Контроль
	Концентрация нефти, %									
	4	8	16	4	8	16	4	8	16	
<i>Acremonium sp.</i>		1,2						2,0	2,9	
<i>Chrysosporium sp.</i>	2,4							5,0		6,2
<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link										2,1
<i>Huiphoderma sp.</i>	76,2			78,8	29,4	1,3	70,4	13,0	8,6	66,6
<i>Mortierella sp.</i>	4,8						1,8			
<i>Mucor sp.</i>	2,4		1,3	1,2		0,6				
<i>Mucor racemosus</i> Fresen.	4,8			2,3						
<i>M. ramanniana</i> (W.I. Moller) Lin-nem.		1,0	1,0			1,9		1,0		
<i>Paecilomyces variotii</i> Bainier				1,2						6,2
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	9,5	67,6	64,7	7,1	60,8	75,6	11,1	60,5	68,5	2,1
<i>Penicillium decumbens</i> Thom		30,2	32,7		3,9	20,5		2,5	11,4	2,1
<i>P. lanosum</i> Westling				3,5				2,0		
<i>P. thomii</i> Maire							5,6	2,5		8,3
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	2,4		0,3	5,9	5,9		11,1	11,5	8,6	
Индекс Шеннона-Винера	0,43	0,32	0,33	0,37	0,42	0,31	0,42	0,59	0,45	0,46

В загрязненных образцах были зарегистрированы изменения в видовом составе микроскопических грибов, характер которых зависел от концентрации нефти в почве. В случае внесения нефти в концентрации 4% от веса почвы наблюдалось увеличение количества выделенных видов с сохранением доминанта, характерного для незагрязненной почвы. Нефть в концентрации 8% и 16% приводила к увеличению доли грибов рода *Penicillium*. Доминировавшие в нефтезагрязненной почве виды микромицетов были идентифицированы как *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium decumbens*.

В присутствии биологических препаратов в грунте формировались комплексы микроскопических грибов, более близкие по видовому составу к контролю, чем при нефтяном загрязнении, в которых присутствовали представители р. *Huiphoderma*, р. *Trichoderma* и др. Описанные выше изменения более или менее ярко проявлялись в зависимости от концентрации загрязнителя. Так при concentra-

ции нефти 4% существенных изменений в видовом составе микромицетов не наблюдалось. При концентрации загрязнителя 8% и 16% в составе комплекса микромицетов под влиянием биопрепаратов снижалась доля вида *Penicillium decumbens* и обнаруживались отдельные колонии *Huiphoderma sp.* Описанные изменения ярче проявлялись в пробах грунта, загрязненного нефтью в концентрации 8%, чем 16%.

Загрязнение грунта нефтью приводило к уменьшению видового разнообразия в комплексе почвенных микромицетов (по индексу Шеннона-Винера). После рекультивации биологическими препаратами разнообразие видов микроскопических грибов вновь увеличивалось за счет появления нескольких малочисленных видов. Биологический препарат Деойл оказывал большее воздействие на показатель видового разнообразия, чем биопрепарат Ленойл.

Для установления взаимосвязи между деструкцией нефти в грунте и видовым составом микроскопических грибов была проанализирована динамика остаточного содержания углеводородов в загрязненном грунте. Уменьшение содержания углеводородов зафиксировано как в вариантах опыта с внесением биологических препаратов, так и без их использования, по-видимому, за счет деятельности аборигенных углеводородоокисляющих микроорганизмов (рис.).

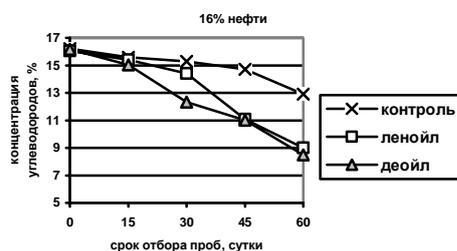
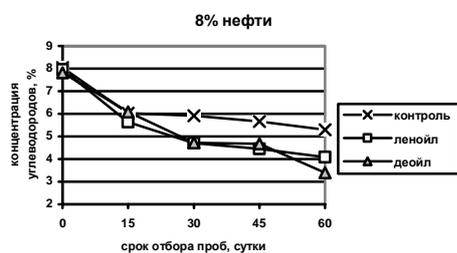
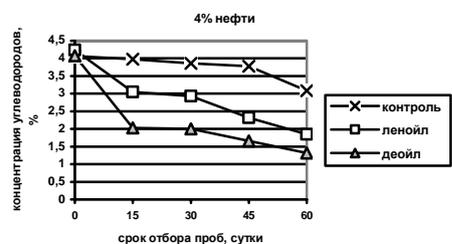


Рис. Остаточное содержание нефти в почве после применения биопрепаратов Ленойл и Деойл.

Определение численности окисляющих углеводороды микроорганизмов подтвердило данное предположение. В незагрязненном грунте она колебалась от $2,2 \cdot 10^6$ КОЕ/г до $8 \cdot 10^6$ КОЕ/г, в загрязненном грунте от $7,8 \cdot 10^7$ КОЕ/г до $3 \cdot 10^9$ КОЕ/г и в рекультивированном от $3,2 \cdot 10^8$ КОЕ/г до $6 \cdot 10^9$ КОЕ/г. Однако средняя скорость разложения нефти в почве с участием биопрепаратов была выше. Это указывает на более высокий потенциал биологических препаратов по сравнению с аборигенными микроорганизмами. Полученные данные указывают на то, что снижение содержания остаточных углеводородов в грунте в процессе рекультивации не является единственным фактором, влияющим на состав микроскопических грибов, поскольку в грунте с тем же уровнем загрязнения без биопрепаратов чувствительные к загрязнению виды не выделяются.

Таким образом, нефть в концентрации 8% и 16% от веса грунта оказывала существенное влияние на численность и видовой состав микроскопических грибов. Рекультивация биопрепаратами обеспечивала более высокую скорость разложения углеводородов в грунте по сравнению с активностью аборигенных микроорганизмов. Под действием биологических препаратов в грунте формировался более разнообразный и близкий к контрольному комплексу микроскопических грибов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Киреева Н.А. Микробиологические процессы в нефтезагрязненных почвах. Уфа: Изд. БашГУ, 1994. 172 с.
2. Хабибуллина Ф.М. Почвенные микромицеты ельника чернично-зеленомошного средней тайги // Лесоведение. 2001. № 1. С. 43-48.
3. Практикум по микробиологии / под ред. А.И. Нетрусова. М.: Академия, 2005. 608 с.
4. Литвинов М.А. Определитель микроскопических почвенных грибов. Л: Наука, 1967. 302 с.
5. Raper K.B., Thom C.A. Manuel of the Penicillia. N.Y.; L: Hafner Publ. Comp., 1968. 875 p.
6. Watanabe T. Pictorial atlas of soil and seed funfi: Morphologies of cultured fungi and key to species. Florida, 2000. 411 p.

INFLUENCE OF REMEDIATION BY BIOLOGICAL PRODUCTS ON MICROSCOPIC FUNGI OF THE PODSOLIC GROUND

© 2011 M.D. Bakaeva¹, N.N. Silishev¹, O.S. Smolova²

¹Institute of Biology, Ufa Sci. Center of RAS, Ufa

²Yugansk Research and Planning Institute, Nefteyugansk

Number and specific structure of microscopic fungi in a podsolic ground, remediated by biological preparations Lenojl and Deojl are investigated. It is shown that remediation by biological products provides higher speed of hydrocarbons decomposition in a ground in comparison with activity of native microorganisms. Under the influence of biological preparations in a ground the complex of microscopic fungi was more diverse and like a control one.

Key words: microscopic fungi, oil pollution, biological remediation.

Bakaeva Margarita Dmitrievna, Candidate of Biology, Silishev Nikolay Nikolaevich, Doctor of Biology, Smolova Olga Sergeevna, e-mail: biolab316@yandex.ru