

БИОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И ФУНКЦИОНАЛЬНО-СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МИКРОБНОГО ЦЕНОЗА ЧЕРНОЗЕМА ТИПИЧНОГО, ЗАГРЯЗНЕННОГО ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ

Т.А. Гринченко¹, Е.И. Маклюк², И.М. Журавлева¹

¹Харьковский национальный педагогический университет

имени Г.С. Сковороды, г. Харьков, Украина

²ННЦ «ИПА имени А.Н. Соколовского» НААН Украины, г. Харьков, Украина

ВВЕДЕНИЕ

Биологическая деградация техногенно загрязненных почв является процессом стойких изменений их биологических особенностей, проявляется в изменении численности микроорганизмов, уменьшении видового разнообразия и нарушении оптимального соотношения разных видов почвенной мезо- и микрофауны, развитии патогенной микрофлоры и изменении интенсивности протекания биохимических процессов [1, 2]. Соответственно, оценить уровень техногенного влияния на формирование деградации можно с помощью биологических показателей. Характер их изменений зависит от типа антропогенной нагрузки, его продолжительности и интенсивности влияния на почву, взаимодействия с другими природными и антропогенными факторами. Вместе с этим, в научных публикациях отмечена способность определенных микробных сообществ к саморегуляции и приспособлению к изменениям окружающей среды [3]. Резистентность (толерантность) микроорганизмов к тяжелым металлам (ТМ) проявляется в способности расти при высоких концентрациях поллютантов. При определенной концентрации тяжелых металлов может происходить адаптация микроорганизмов. В бактериальном сообществе, которое поддается влиянию одного из металлов, увеличивается резистентность именно к этому металлу, при этом следует учитывать природу самого металла. С увеличением толерантности микроорганизмов к тяжелым металлам негативное влияние последних на микробные сообщества уменьшается. Развитие резистентности к металлам позволяет микробным сообществам сохранять свои функции. Таким образом, активизацию жизнедеятельности почвенных микроорганизмов можно осуществлять путем искусственного обогащения почвы высокоэффективными селекционными культурами микроорганизмов, которые благодаря своей резистентности к ТМ обеспечивают надежное функционирование микробной системы почвы и предотвращают снижение продуктивности сельскохозяйственных культур.

Цель исследования – разработать микробиологический агроприем для снижения техногенной нагрузки на почву и сохранения ее биологической активности путем интродукции активных микробных культур, в частности, штамма гриба *Trichoderma viride*.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом исследования был чернозем типичный тяжелосуглинистый. Почву для экспериментов отбирали из пахотного слоя (0–30 см) опытного поля учебно-опытного хозяйства «Докучаевское» Харьковского национального аграрного университета имени В.В.Докучаева – «Роганский стационар».

Для выполнения поставленной цели и задач была применена следующая схема лабораторного опыта в количестве 10 вариантов:

- № 1 – контроль (с природным уровнем содержания ТМ);
- № 2 – включает обработку почвы Триходермином;
- № 3 – включает загрязнение почвы Ni_8 ;
- № 4 – включает загрязнение почвы Ni_8 на фоне Триходермина;
- № 5 – включает загрязнение почвы Pb_8 ;
- № 6 – включает загрязнение почвы Pb_8 на фоне Триходермина;
- № 7 – включает загрязнение почвы Cr_8 ;
- № 8 – включает загрязнение почвы Cr_8 на фоне Триходермина;
- № 9 – включает загрязнение почвы Cd_8 ;
- № 10 – включает загрязнение почвы Cd_8 на фоне Триходермина.

В качестве загрязняющих веществ использовали тяжелые металлы – Cd, Pb, Cr, Ni. При этом исходили из литературных данных [4], что в черноземе типичном данной зоны фоновое содержание для Cd составляет 0,8–1 мг/кг, для Pb – 10 мг/кг, для Cr – 52 мг/кг, для Ni – 25 мг/кг. Тяжелые металлы вносили в почву в виде растворов нитратов, в количестве, превышающем местный кларк этих металлов для черноземов Харьковской области в 8 раз (коэффициент 8). Так же на вариантах № 2, 4, 6 и 8 вносили Триходермин – биопрепарат на основе штамма гриба *Trichoderma viride*, в количестве 50 мл на 2 л теплой воды. Грибы этого рода подавляют развитие фитопатогенов путем прямого паразитизма, конкуренции за субстрат, выделения ферментов, антибиотиков (глиотоксин, виридин, триходермин), за счет высокой биологической активности быстро осваивают субстрат, активно разлагают органические соединения, принимают участие в процессах аммонификации и нитрификации, обогащают почву подвижными питательными веществами.

В образцах почвы определяли численность основных групп микрофлоры в колониеобразующих единицах (КОЕ) методом микробиологического посева почвенной суспензии на твердые питательные среды [5]: органотрофных бактерий – на мясопептонный агар (МПА), микроорганизмов, усваивающих азот минеральных соединений и актиномицетов, – на крахмало-аммиачный агар (КАА), микроскопических грибов – на среду Рихтера, микроорганизмов, которые мобилизуют минеральные фосфаты, – на среду Муромцева, органические фосфаты – на среду Менкиной. Расчетные показатели, в том числе минерализации и трансформации органических веществ, которые характеризуют напряжение минерализационных процессов и трофический режим почвы, определялись по соотношениям отдельных групп микроорганизмов; интегрированные показатели биогенности (ИПБ), биологической активности (ИПБА) и биологического состояния почвы (ИПБС) – по методике на основе расчета суммарного биологического показателя по Дж. Ацци [6].

Биохимические свойства почвы определялись по показателям активности ферментов инвертазы фотоколориметрическим методом [7] и дегидрогеназы по Галстяну [7]. Способность почвы к накоплению аммонийного и нитратного азота – по методу Ваксмана [8, 9, 10].

Полученные в результате исследований данные статистически обработаны с помощью метода дисперсионного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований показали тенденцию к увеличению биогенности почвы при внесении в нее грибной культуры. По структурной и функциональной характеристике микробного ценоза чернозема типичного установлено, что под действием тяжелых металлов (последствие загрязнения на уровне 8 кларков) происходит его перестройка (табл. 1). При этом влияние каждого ТМ на микробиоту специфично в соответствии со степенью его агрессивности. С одной стороны, мы наблюдали стимулирующее влияние менее агрессивного тяжелого металла, а с другой стороны – соответствующую реакцию на внешний фактор, которая сопровождается значительным изменением количественного соотношения микробных популяций. Так, на вариантах без интродукции гриба *Trichoderma viride* под действием ТМ численность микроорганизмов большинства экологотрофических группировок уменьшалась; только для микроорганизмов, которые усваивают органический азот, проявилось стимулирующее последствие тяжелых металлов. В экотоксикологии известны случаи стимулирующего действия разных химических соединений, которые поступают в живые организмы или в почву. Они получили название «эффекта малых доз» [11].

Для группы микроорганизмов, которые усваивают органический азот, влияние триходермы было значительно эффективней: на варианте с Ni и грибом *Trichoderma viride* отмечается увеличение показателя в 4,8 раза по сравнению с контролем и на 6% по сравнению с вариантом загрязнения почвы, на варианте с Pb и *Trichoderma viride* – в 3,2 раза по сравнению с контролем и на 32% под действием триходермы, вариант с Cr и интродукцией – в 4,5 раза, биогенность под влиянием гриба выросла на 67% в загрязненной почве, с Cd – в 3,9 раза и на 34% выросла биогенность. Самый высокий эффект наблюдался на фоне менее агрессивных металлов (Ni и Cr), а немного меньший – на фоне металлов Pb и Cd. Приведенные результаты свидетельствуют о специфичности взаимодействия микробного ценоза и тяжелого металла, где важным фактором выступают его природные особенности.

Что касается представителей микроскопических грибов – отмечено снижение их численности на всех вариантах загрязненного чернозема типичного. Внесение Триходермина позитивно повлияло на этот показатель: численность грибов немного выросла на загрязненной тяжелыми металлами почве, на некоторых вариантах несущественно, что возможно объясняется типичной борьбой за питательные вещества представителей одной экологической ниши.

По полученным данным установлено, что под влиянием интродукции штамма гриба *Trichoderma viride* почти на всех вариантах загрязненной почвы наблюдается снижение интенсивности процессов минерализации (показатель минерализации определяется как соотношение микроорганизмов, усваивающих

1. Почвенные ресурсы и их рациональное использование

минеральный азот к микроорганизмам, усваивающим органический азот). Что касается показателя трансформации органического вещества почвы (определяется как соотношение суммы микроорганизмов, усваивающих минеральный азот и микроорганизмов, усваивающих органический азот, к коэффициенту минерализации), то здесь прослеживается противоположная тенденция: обогащение микрофлоры грибной культурой триходермы значительно усиливает процесс в черноземе без загрязнения и с последствием тяжелых металлов.

Важным показателем биологической активности почвы является ее ферментативная активность. Установленная корреляционная связь между активностью ферментов и плодородием почвы позволяет использовать уровень ферментативной активности для сравнительной оценки эффективности агротехнических приемов, а также диагностики изменений почвы при разных антропогенных нагрузках [12].

Аналогичное стимулирующее действие на активность ферментов, которые относятся к разным классам, наблюдали как под влиянием фактора тяжелых металлов, так и под влиянием интродукции на большинстве вариантов. Дегидрогеназа относится к классу оксидоредуктаз, которые играют ведущую роль в окислительно-восстановительных процессах почвы и принимают участие в синтезе гумусных веществ в почве. Инвертаза относится к классу гидролаз, которые принимают участие в обогащении почвы подвижными и доступными для растений и микроорганизмов питательными веществами, разрушая высокомолекулярные органические соединения.

В соответствии с природными особенностями тяжелых металлов определены некоторые отличия в ферментативной активности, а именно: если на варианте незагрязненной почвы внесение грибной культуры способствовало повышению дегидрогеназной активности на 12%, то для загрязненной этот прием был эффективным только на вариантах со свинцом и хромом, где показатель вырос на 46% и 8% соответственно; показатель инвертазной активности на незагрязненной почве увеличился под влиянием микробной интродукции на 34%, а на загрязненной – только на 4% и 8% соответственно для вариантов со свинцом и хромом.

Важным циклом микробиологических процессов в почве является трансформация азота, которая представляет собой последовательные реакции разложения органических азотосодержащих соединений до аммиака, его окисление до азотной кислоты и восстановление азота. Внимание привлекает именно аммонификационная и нитрификационная способность почвы, показатели которой характеризуют состояние азотного режима и обеспечиваются активностью микробного пула [13, 14]. Под влиянием тяжелых металлов, о котором свидетельствуют полученные данные (табл. 2), оба показателя были существенно меньше по сравнению с вариантом незагрязненной почвы. Искусственное внесение гриба *Trichoderma viride* на 12% увеличило аммонификационную активность незагрязненного чернозема типичного, а также почвы, загрязненной никелем, – почти в 2,6 раза и хромом – на 7%. При последствии свинца такого эффекта от интродукции не наблюдалось, а наоборот, произошло снижение аммонификационной способности на 24%. Для нитрификационной способности эффект от внесения триходермы проявился на вариантах с никелем и свинцом, где произошел рост на 15% и 5% соответственно. Другие варианты

позитивного влияния не проявили. Отличия в биохимических показателях между контрольными вариантами и вариантами с интродукцией гриба, а также между вариантами загрязненной почвы указывают на специфичность взаимодействия интродуцированной микробиоты с тяжелыми металлами, где существенное влияние имеет природа загрязнителя, концентрация его в почве, что в свою очередь сказывается на эффективности агроприема.

ИПБ – интегральный показатель биогенности – рассчитали по численности микроскопических грибов, микроорганизмов, усваивающих органический и минеральный азот, микроорганизмов, усваивающих фосфор. ИПБА – интегральный показатель биологической активности – рассчитали по показателям ферментативной активности (активность инвертазы, дегидрогеназы).

Для суждения о биологической активности и эколого-биологическом состоянии почвы недостаточно какого-либо одного показателя, так как каждый из них отражает лишь какую-то одну сторону биологических и биохимических процессов в почве. В последнее время все большее внимание привлекает комплексная оценка биологических свойств почв, особенно в связи с оценкой их плодородия и антропогенных изменений. Для этого необходимо использовать широкий набор показателей состояния почвы [15].

При антропогенном воздействии на почву среднее значение выбранных показателей в большинстве случаев снижается, в то время как отдельные показатели биологической активности почвы могут увеличиваться.

Снижение интегрального показателя биологического состояния почвы, как правило, находится в прямой зависимости от степени воздействия антропогенного фактора. При расчете ИПБС должны использоваться не любые показатели биологической активности почв, а наиболее информативные.

Поэтому для определения общей тенденции влияния искусственного внесения гриба *Trichoderma viride* с учетом всех колебаний указанных показателей использована методика расчета интегрированного показателя биологического состояния почвы (ИПБС). Данная методика позволяет оценить совокупность биологических показателей [16]. При диагностике различных антропогенных факторов за 100% принимается значение каждого из показателей незагрязненной почвы (контроль) и по отношению к нему в процентах рассчитывается значение этого показателя в загрязненной почве. ИПБС рассчитывается по формуле:
$$\text{ИПБС} = (B_1 + B_2 + B_3 + \dots + B_n) / N$$
 где B_1, B_2, B_3, B_n – значения каждого показателя в % по отношению к этому же показателю в незагрязненной почве; N – количество показателей. Снижение или рост ИПБС на 10% и больше указывает на существенное влияние на исследуемый фактор.

При характеристике функциональной структуры микробных ценозов использованы наиболее информативные показатели. Известно, что для мониторинга и диагностики почвы, загрязненной тяжелыми металлами, в первую очередь необходимо определить биохимические и количественные показатели структуры микробиоценозов [16, 17].

Проведенная оценка изменения структуры и функционирования микробного ценоза с интродукцией триходермы в чернозем типичный, загрязненный ТМ, по рассчитанным интегрированным показателям биологического состояния почвы (ИПБС) (табл. 2) позволяет определить самые благоприятные условия для проявления эффективности данного агроприема. По полученным данным, загрязнение тяжелыми металлами почвы негативно повлияло на биологическое состояние чернозема типичного на всех вариантах.

1. Почвенные ресурсы и их рациональное использование

Таблица 1

Влияние Триходермина на функционально-структурные особенности микробного ценоза чернозема типичного, загрязненного тяжелыми металлами

Вариант	Грибы, тыс. КОЕ/г	Микроорганизмы, которые усваивают органический азот, млн КОЕ/г	Микроорганизмы, которые усваивают минеральный азот, млн КОЕ/г		Микроорганизмы, которые усваивают фосфор, млн КОЕ/г		Показатели		ИПБ
			общая численность	актиномицеты	органический	минеральный	минерализации	трансформации орган. веществ	
Контроль 1	1,59	1,34	10,4	2,39	3,9	0,99	7,76	1,51	65,7
Триходермин	0,37	3,70	5,33	2,48	1,22	0,61	1,44	6,27	42,0
Ni ₈	0,36	6,05	7,05	1,13	2,85	0,28	1,16	11,6	49,0
Ni ₈ + Триходермин	2,26	6,44	0,88	0,4	2,66	3,62	0,13	56,3	65,0
Pb ₈	0,88	3,23	6,33	1,33	1,92	0,33	1,95	4,9	41,8
Pb ₈ + Триходермин	0,94	4,27	6,27	1,82	1,12	0,56	1,46	7,2	45,0
Cr ₈	1,15	3,58	4,22	1,42	1,12	0,60	1,17	6,6	39,6
Cr ₈ + Триходермин	1,09	5,99	5,58	1,01	1,19	0,39	0,93	12,4	44,7
Cd ₈	0,45	3,88	7,99	3,15	1,29	0,32	2,05	5,79	49,8
Cd ₈ + Триходермин	0,73	5,21	4,51	2,34	2,66	0,43	0,86	11,3	51,8
НСР ₉₅	0,76	0,87	3,3	1,87	1,63	0,41		–	

Таблица 2

Изменение биохимической активности чернозема типичного, загрязненного тяжелыми металлами, под действием биопрепарата Триходермин

Вариант	Дегидрогеназа, мг*ТФФ в 100 г за 24 часа	Инвертаза, мг глюкозы в 100 г за 24 часа	Нитрификационная способность, мг N-NO ₃ ⁻ на 100 г почвы	Аммонификационная способность, мг N-NH ₃ на 100 г почвы	Интегрированный показатель биологического состояния (ИПБС)
Контроль	91,2	386	0,67	3,99	73
Триходермин	102,1	516	0,52	4,45	64
Ni ₈	115,9	525	0,46	1,73	60
Ni ₈ + Триходермин	114,75	479	0,53	4,48	76
Pb ₈	95,9	378	0,40	1,70	50
Pb ₈ + Триходермин	139,6	394	0,42	1,30	55
Cr ₈	104,9	540	0,47	2,92	58
Cr ₈ + Триходермин	113,3	584	0,30	3,11	60
Cd ₈	122,5	581	0,51	2,87	66
Cd ₈ + Триходермин	107,1	513	0,50	2,75	64
НСР ₉₅	2,3	1,28	0,11	0,44	–

1. Почвенные ресурсы и их рациональное использование

Наибольшее значение ИПБС (76) имеет вариант с искусственным внесением триходермы в чернозем типичный, загрязненный никелем, даже в контрольном варианте ИПБС составлял 73. Учитывая роль этого элемента в метаболизме микроорганизмов, можно сделать вывод о формировании благоприятных условий, которые создает никель для приспособления интродуцированного гриба и его функционирования в почве. В целом, произошло улучшение биологического состояния загрязненной почвы при интродукции штамма гриба *Trichoderma viride*. Так, на фоне свинца ИПБС чернозема типичного вырос с 50 до 55, на фоне хрома – с 58 до 60. Только при условии загрязнения почвы кадмием позитивный эффект интродукции не проявился, где, вероятно, на функционирование грибной культуры повлияла природная особенность элемента и химического соединения, в форме которого его внесли.

ВЫВОДЫ

Установлено, что Триходермин способен усиливать биохимическую активность почвы, даже при неблагоприятных для аборигенной микрофлоры условиях – загрязнении тяжелыми металлами.

Для эффективности микробиологического агроприема в практическом применении следует учитывать специфичность негативного влияния на почвенную микробиоту или интродуцированный микроорганизм каждого металла и физиологические особенности внесенной культуры. В целом, результаты исследований показали ухудшение экологического состояния чернозема типичного в условиях загрязнения ТМ на уровне 8 кларков за счет искусственного внесения в почву штамма гриба *Trichoderma viride*: из четырех вариантов загрязненного чернозема типичного три выявили улучшение биологического состояния при условиях интродукции микробной культуры – на фоне никеля, хрома, свинца.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вальков, В.Ф. Методология исследования биологической активности почв на примере Северного Кавказа / В.Ф. Вальков, К.Ш. Казеев, С.И. Колесников // Научная мысль Кавказа. – 1999. – № 1. – С. 32–37.
2. Левин, С.В. Тяжелые металлы как фактор антропогенного воздействия на почвенную микробиоту / С.В. Левин, В.С. Гузев, И.В. Асеева // Микроорганизмы и охрана почв. – Москва: МГУ, 1989. – С. 5–46.
3. Іутинська, Г.О. Ґрунтова мікробіологія / Г.О. Іутинська. – К.: Арістей, 2003. – С. 238–250.
4. Фоновий вміст мікроелементів у ґрунтах України / А.І. Фатєєв [та інш.]; за ред. А.І. Фатєєва, Я.В. Пащенко. – Х., 2003. – 120 с.
5. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Д.Г. Звягинцев [и др.]. – М.: МГУ, 1980. – 224 с.
6. Ацци, Дж. Сельскохозяйственная экология / Дж. Ацци. – Москва-Ленинград, 1959. – 480 с.
7. Хазиєв, Ф.Х. Методы почвенной энзимологии / Ф.Х. Хазиєв. – М.: Наука, 2005. – 252 с.

8. Почвы. Определение нитратов ионометрическим методом: ГОСТ 26951–86. – М.: Изд-во стандартов, 1986. – 10 с.
9. Основные микробиологические и биохимические методы исследования почвы: метод. рекомендации. – Ленинград: ВНИИСХМ, 1987. – С. 108–114.
10. Сэги, Й. Методы почвенной микробиологии / Й. Сэги. – М.: Колос, 1983. – 135 с.
11. Пономарева, С.В. Изменение эколого-биологических свойств чернозема обыкновенного при загрязнении тяжелыми металлами: автореф. дис. ...канд. биол. наук / С.В. Пономарева. – Ростов-на-Дону, 2008.
12. Хазиев, Ф.Х. Системно-экологический анализ ферментативной активности почв / Ф.Х. Хазиев. – М.: Наука, 1982. – 203 с.
13. Мишустин, Е.М. Микробиология / Е.М. Мишустин, В.Т. Емцев. – М.: Колос, 1970. – 344 с.
14. Якість ґрунту. Визначення амонійного азоту в модифікації ННЦ ім. О.Н.Соколовського: ДСТУ 4729:2007 (зі скасуванням в Україні ГОСТ 26488–85).
15. Казеев, К.Ш. Биологическая диагностика и индикация почв: методология и методы исследований / К.Ш. Казеев, С.И. Колесников, В.Ф. Вальков. – Ростов-на-Дону: Изд-во Рост. ун-та, 2003. – 204 с.
16. Колесников, С.И. Биоэкологические принципы мониторинга и нормирования загрязнения почв / С.И. Колесников, К.Ш. Казеев, В.Ф. Вальков. – Ростов-на-Дону: Изд-во ЦВВР, 2001. – 64 с.
17. Колесников, С.И. Влияние загрязнения тяжелыми металлами на микробную систему чернозема / С.И. Колесников, К.Ш. Казеев, В.Ф. Вальков // Почвоведение. – 1999. – № 4. – С. 505–511.

BIOCHEMICAL ACTIVITY AND FUNCTIONAL-STRUCTURAL PECULIARITIES OF MICROBIOCENOSIS OF TYPICAL CHERNOZEM SOILS CONTAMINATED OF HEAVY METALS

T.O. Grinchenco, O.I. Maklyuk, I.M. Zhuravlyova

Summary

This paper highlights researching of restructuring of microbiocenosis and levels biochemical activity of chernozem belt with contamination of heavy metals and melioration Trihodermini. The influence of pollution on microbiocenose soil in specification of heavy metal. A soil microflora of a typical mushroom culture of Trihodermini greatly enhances the transformation of soil organic matter as without pollution and with the aftereffect of heavy metals.

Поступила 19.08.13