

На правах рукописи

**ТЕРЕЩЕНКО Наталья Николаевна**

**ЭКОЛОГО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ И МЕХАНИЗМЫ  
РЕМЕДИАЦИИ  
АНТРОПОГЕННО-НАРУШЕННЫХ ПОЧВ**

Специальность 03.00.16 – Экология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Томск - 2007

Работа выполнена в Государственном научном учреждении Сибирском научно-исследовательском институте сельского хозяйства и торфа СО Россельхозакадемии в лаборатории микробиологии

*Научный консультант:*

доктор биологических наук  
Середина Валентина Петровна

*Официальные оппоненты:*

доктор биологических наук, профессор Островерхова Галина Петровна, кафедра зоологии беспозвоночных, ГОУ ВПО «Томский государственный университет»

доктор биологических наук, профессор Чупрова Валентина Владимировна, кафедра почвоведения, ГОУ ВПО «Красноярский государственный аграрный университет»

доктор биологических наук, профессор Антонова Ольга Ивановна, НИИ Химизации ГОУ ВПО «Алтайский государственный аграрный университет»

*Ведущая организация:*

Институт почвоведения и агрохимии СО РАН

Защита состоится « 2 » ноября 2007 г. в .... часов на заседании диссертационного совета Д 212.267.10 при ГОУ ВПО «Томский государственный университет» по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Томского государственного университета

Автореферат разослан «2» октября 2007 года

Ученый секретарь диссертационного совета  
кандидат биологических наук

Е.Ю. Просекина

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

*Актуальность исследований.* Начиная с конца 18 столетия, стремительный рост населения планеты обернулся небывалыми темпами наступления человека на новые еще неосвоенные земли, и, как следствие, постепенным изменением естественного почвенного покрова, а бурное развитие промышленности в последующие столетия привело к полной деградации значительных площадей почвенного покрова планеты. Учитывая важную экологическую роль почвы в поддержании основных параметров биосферы и атмосферы, подобные разрушительные тенденции не могут оставаться без внимания. Не удивительно, что изучение условий устойчивого функционирования почвенных экосистем, а также поиск эффективных технологий обработки пахотных и ремедиации антропогенно-нарушенных почв становится одним из центральных направлений исследований большинства экологических научных школ. Причем в научном поиске все большее внимание начинают уделять развитию биологических методов рекультивации, основанных на использовании и стимулировании потенциала самой почвы, ее способности к самовосстановлению (Pritchard, 1992; Gallego et al., 2001).

Однако даже поверхностный анализ наиболее широко используемых методов свидетельствует о доминировании формального, механистического подхода к почве при разработке данных технологий. В частности, при биоремедиации нефтезагрязненных почв технологическая схема, как правило, сводится к простому рыхлению и использованию бактериальных препаратов по фону внесения весьма высоких доз минеральных удобрений (Capelli et al., 2001; Bento et al., 2005). Подобная практика часто приводит к еще большему ухудшению ситуации: засеянный многолетними травами участок в первый год дает дружные всходы, однако восстановления исходного фитоценоза часто так и не происходит, и в почве неизбежно запускаются механизмы ее медленной деградации. Не лучше обстоит дело и с разнообразными почвозащитными технологиями в сфере аграрного производства, основанными на применении биологически активных органических удобрений.

Причина краткосрочности эффектов обусловлена отсутствием четких представлений об основных принципах функционирования микробного сообщества почвы. В последнее время формируется новое представление о популяции микроорганизмов не просто как о сумме клеток, вписанных в условия конкретной экологической ниши, а как о своеобразной надорганизменной системе, в определенном отношении аналогичной многоклеточному организму, адаптация которого к экстремальным внешним условиям представляет собой совокупность весьма сложных и специфических реакций (Николаев, 2004). С теоретической и практической точек зрения чрезвычайно важно определить ключевые, экологически наиболее значимые группы микроорганизмов, запускающие данные реакции, определяющие их направленность, скорость и в конечном итоге эффективность биоремедиации.

Кроме того, одним из основных вопросов почвенной экологии становится возможность оценки и прогнозирования изменений, происходящих в почве после ее вовлечения в сферу хозяйственных интересов человека. Для этого необходимо разработать систему критериев, позволяющую судить о степени деградации почвы как природной экосистемы под влиянием антропогенного воздействия (Doran et al., 2000). Такие традиционно используемые в настоящее время показатели, как содержание подвижных и валовых форм элементов, уровень кислотности, общая порозность и т.д., а также средние показатели биологической продуктивности почвы свидетельствуют скорее о степени ее загрязнения и уровне эффективного плодородия почвы, а не об экологической стратегии ее трансформации.

**Цель работы.** Целью работы является определение основных закономерностей функционирования микробных сообществ антропогенно-нарушенных почв и выявление ключевых биологических факторов и механизмов, определяющих эффективность биоремедиации почв, загрязненных нефтью, а также деградированных вследствие длительного нерационального аграрного освоения.

**Задачи исследований.**

1. Изучить особенности взаимодействия сапротрофных микроорганизмов органического субстрата и дождевого червя в процессе вермикюльтивирования.
2. Исследовать влияние дождевых червей разных морфо-экологических групп (почвенных и навозных) на характер микробиологических и биохимических процессов трансформации органического субстрата.
3. Исследовать динамику основных показателей биологической активности вермикомпоста в процессе его созревания.
4. Установить ключевые микробиологические факторы и механизмы, обуславливающие высокую ростостимулирующую и фунгистатическую активность вермикомпоста и почв, населенных дождевыми червями.
5. Исследовать эффективность применения почвозащитной технологии Полевого круглогодичного вермикюльтивирования и вермикомпоста для восстановления плодородия агрогенной дерново-подзолистой почвы подтайги Западной Сибири.
6. Изучить влияние природных цеолитов на интенсивность процессов биологической азотфиксации и деструкции углеводов в нефтезагрязненных почвах.
7. Выявить основные биологические факторы и механизмы, определяющие эффективность применения комплексной технологии биоремедиации нефтезагрязненных почв, основанной на стимулировании аборигенной микрофлоры почвы.
8. Установить значимые микробиологические критерии экологической устойчивости почвы и эффективности почвозащитных технологий.

**Защищаемые положения.**

1. Биологическая активность вермикомпоста обусловлена присутствием в его составе стимуляторов роста как аминной-аминокислотной, так и гумусовой природы, в первую очередь фульвокислот, основными продуцентами которых являются микроорганизмы органического субстрата, стимулируемые дождевыми червями, поставляющими протеолитические экзоферменты. Основными факторами, определяющими фунгистатические свойства вермикомпоста, являются высокая численность в нем бактерий рода *Pseudomonas*, отличающихся повышенной супрессивной активностью, и наличие ослабленных форм фитопатогенных грибов, в частности рода *Fusarium*, стимулирующих формирование у растений системной неспецифической устойчивости к агрессивным штаммам грибов. Основным механизмом, обуславливающим повышенную супрессивную активность *Pseudomonas* в вермикомпосте, является индукция активности бактерий динамическими характеристиками их популяции и сообщества низших грибов, а именно: цикличностью численности *Pseudomonas* и микромицетов, приводящей к периодическим всплескам плотности популяций, и, как следствие, к обострению внутри- и межпопуляционной конкуренции за субстрат.

2. В условиях техногенного загрязнения почв нефтью ведущим фактором биологической деструкции углеводов в почве являются микробиологические процессы, связанные с циклом превращения азота – азотфиксация и денитрификация. Наиболее эффективной формой азота является нитратная, обеспечивающая двойной путь использования азота углеводородокисляющими микроорганизмами, наименее эффективной – аммонийная, способствующая массовому развитию в почве микроскопических грибов, и повышению фитотоксичности почвы. Высокая эффективность органических форм

азота при биоремедиации обусловлена медленным течением процессов аммонификации в условиях нефтяного загрязнения и дозированным высвобождением аммония, исключая массовое размножение грибов и подавление процессов азотфиксации.

3. Наиболее значимыми критериями экологической устойчивости почвы и эффективности почвозащитных технологий являются: характер изменения трофической стратегии микробоценоза почвы в отношении таких источников углерода как гумус и свежие растительные остатки в ответ на внесение в почву избытка минерального азота; динамический критерий скорости круговорота азота в системе «почва-растение-атмосфера», определяемый как скорость противоположно направленных микробиологических процессов цикла азота, таких как азотфиксация и денитрификация (данный критерий также применим для оценки уровня биологической активности почвы и органических удобрений).

**Научная новизна.** В работе впервые установлена ключевая роль микробного сообщества органического субстрата, перерабатываемого дождевыми червями, в формировании биологической активности вермикомпоста, раскрыты основные механизмы и факторы. Разработана новая методика количественной оценки суммарной фунгистатической активности сложного микробного сообщества. Определены наиболее значимые для жизнедеятельности дождевого червя физиологические группы микроорганизмов. Дана сравнительная характеристика микробных сообществ вермикомпостов, получаемых при переработке органического субстрата различными морфо-экологическими группами дождевых червей, установлены достоверные различия в трофической стратегии навозных и почвенных червей, а также технологичного Калифорнийского гибрида.

В стационарных условиях модельного эксперимента впервые установлен гармонический характер колебания численности микроорганизмов органического субстрата в процессе вермикультивирования.

Обнаружен эффект и установлен механизм формирования системного неспецифического иммунитета у выращенных на вермикомпосте растений, индуцированного контактом с присутствующими в вермикомпосте ослабленными формами *Fusarium*.

В многолетнем полевом эксперименте показана высокая эффективность почвозащитной технологии Полевого круглогодичного вермикультивирования (ПКВК), раскрыты основные биологические механизмы и факторы, обуславливающие ее позитивное влияние на эффективное и потенциальное плодородие дерново-подзолистой легкосуглинистой почвы подтайги Западной Сибири.

Для условий северных регионов РФ и центрального Поволжья разработаны научные основы создания комплексной технологии биоремедиации почв, загрязненных нефтью. Впервые установлена экологическая роль нитратной, аммонийной и органической форм азота в запуске микробной сукцессии деструкции углеводов и их влияние на уровень остаточной токсичности почвы. Показано стимулирующее воздействие природных цеолитов на процессы несимбиотической азотфиксации и биodeградации нефти.

Установлен ряд значимых микробиологических критериев экологической устойчивости почвы и эффективности почвозащитных технологий.

**Практическая значимость.** Результаты исследований были положены в основу создания комплексной технологии биоремедиации нефтезагрязненных почв, обеспечивающей 70-75% степень очистки почвы в течение первого вегетационного периода и 80-85% степень на второй год рекультивации. В настоящее время технология уже прошла успешную апробацию в ряде предприятий нефтегазодобывающей промышленности, таких как НГДУ «Комиарктикнефть», «Комитермнефть», ООО «Сервисэкология»,

МП «Полигон» (г. Томск) и ФГУП «Томскавиа». В настоящий момент технология проходит производственные испытания на объектах респ. Коми и Казахстане. Установленные микробиологические факторы и механизмы, определяющие ростостимулирующую и фунгистатическую активность вермикомпоста, были использованы для модификации и оптимизации технологии производства органических удобрений и вермикомпост содержащих грунтов. Результаты исследований, имеющих потенциальное коммерческое значение, защищены 4 патентами РФ.

**Публикации и апробация работы.** По теме диссертации опубликовано 65 работ, в том числе 9 работ в изданиях, рекомендованных ВАК, 3 – в зарубежных изданиях, 2 – монографии, 1 – учебное пособие. Основные положения работы были представлены и обсуждены на международных научно-практических конференциях: научных Жилинских чтениях (Новосибирск, 1997); «Научное обеспечение АПК Западной Сибири» (Новосибирск, 1999); «Энерго- и ресурсосберегающие технологии в земледелии аридных территорий» (Абакан, 2000); «Промышленно-экономическое развитие Западно-Сибирского региона на базе местного природного органического сырья» (Омск, 2000); «Измерение, моделирование и информационные системы, как средства снижения загрязнения на городском и региональном уровнях» (Томск, 2002); «Высокие технологии добычи, глубокой переработки и использования озерно-болотных отложений» (Томск, 2003); «Дождевые черви и плодородие почв» (Владимир, 2004); на Международной конференции "Peat in Horticulture" (Амстердам, 1997); на первом Российском симпозиуме общества «Setac» «Risk assessment for environmental contamination» (Санкт-Петербург, 1998); на 11 международном конгрессе по торфу «Sustaining Our Peatlands» (Финляндия, 2000); на III и IV съездах Общества почвоведов им. В.В. Докучаева (Москва, 2000; Новосибирск, 2004); на IV международном симпозиуме «Контроль и реабилитация окружающей среды» (Томск, 2004); на 1-м, 2, 3 и 4-м Московском Международном Конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2002, 2003, 2005, 2006).

**Вклад автора в разработку проблемы.** Автору принадлежит постановка проблемы и разработка научной программы исследований, а также ее реализация на всех основных этапах: в полевых и лабораторных экспериментах, обработке и обобщении информации. Отдельные разделы диссертационной работы выполнены в рамках тематического плана СО Россельхозакадемии и при частичной финансовой поддержке ООО НТО «Приборсервис» и ПК «Темп-2» (г. Томск). Автор благодарна за внимание к работе и оказанную помощь д.б.н. профессору Е.В. Евдокимову, д.б.н. В.П. Серединой, всем сотрудникам и студентам кафедры сельскохозяйственной биотехнологии ТГУ, а также сотрудникам лаборатории микробиологии СибНИИСХиТ СО Россельхозакадемии.

**Объем и структура работы.** Диссертация изложена на 381 странице, состоит из введения, 6 глав, выводов, приложения, включает 95 таблиц и 95 рисунков. Список литературы включает 403 источника, из которых 129 на иностранном языке.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. СОСТОЯНИЕ ИЗУЧЕННОСТИ ПРОБЛЕМЫ БИОРЕМЕДИАЦИИ АНТРОПОГЕННО-НАРУШЕННЫХ ПОЧВ

**1.1. Микробиологические аспекты вермикюльтивирования.** В разделе приводится анализ отечественной и зарубежной литературы, освещающей вопросы взаимодействия почвенных люмбрицид и сапротрофной микрофлоры почвы, микробиологических и биохимических аспектов вермикюльтивирования и эффективности применения вермикомпоста.

**1.2. Биологическая рекультивация нефтезагрязненных почв.** В разделе рассматриваются проблемы биоремедиации нефтезагрязненных почв, основные биологические методы рекультивации, а также особенности микробиологических процессов деградации углеводов в почве.

**1.3. Основные биологические критерии экологической устойчивости почвы.** Анализ представленных в отечественной и зарубежной печати сведений позволяет сделать заключение об обширности применяемых в настоящее время методов определения биологических критериев устойчивости почвы, большинство из которых основано на показателях биоразнообразия. И лишь небольшое количество методологических подходов и методов позволяет оценить динамические характеристики микробиоценозов почвы.

## 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основными объектами, исследуемыми в рамках диссертационной работы, являются: 1. микробные сообщества целинных и антропогенно-нарушенных почв (дерново-подзолистой легкосуглинистой и серой лесной оподзоленной тяжелосуглинистой юга Томской области, а также чернозема южного тяжелосуглинистого с 1.50, 3.94 и 5.81%-м содержанием гумуса соответственно; 2. вермикомпосты, произведенные различными морфо-экологическими группами дождевых червей (почвенными (*endogeic*), навозными (*epigeic*) и технологичным Красным калифорнийским гибридом).

Изучение биологических факторов и механизмов ремедиации агрогенных почв, а также поиск значимых микробиологических критериев экологической устойчивости почвы проводили на основе 12-ти и 5-ти летних полевых экспериментов, заложенных на дерново-подзолистой легкосуглинистой и серой лесной оподзоленной тяжелосуглинистой почве соответственно. В первом эксперименте исследовали эффективность почвозащитной технологии – полевого круглогодичного вермикультивирования, во втором – эффективность применения разных доз и способов внесения вермикомпоста в сравнении с традиционными органическими удобрениями (навозом КРС и торфонавозной смесью (ТНС)). Биологическую активность вермикомпоста исследовали в серии модельных лабораторных опытов, целью которых было изучение особенностей меж- и внутривидовых взаимодействий в органическом субстрате, перерабатываемом дождевыми червями, а также ключевых микробиологических процессов, ответственных за накопление в вермикомпосте стимуляторов роста растений и формирование его фунгистатических свойств. Особенности взаимоотношений микрофлоры органического субстрата и червей разных морфо-экологических групп (почвенных и навозных) изучали путем сравнительных исследований состава микробных сообществ и биохимических свойств копролитов червей.

Изучение биологических факторов и механизмов ремедиации почв, загрязненных нефтью, проводили на основе полевых и лабораторных опытов в рамках разрабатываемой автором совместно с ООО НТО «Приборсервис» технологии биоремедиации нефтезагрязненных почв, суть которой состоит в комплексном подходе к активации собственного биоресурса почвы, а также в системном применении всего арсенала технических средств рекультивации, в особенности в рациональной, экологически оправданной схеме применения азотных удобрений. Основными регионами апробации технологии были Усинский район Тюменской области и Самарская область. Для определения ключевых микробиологических процессов, запускающих микробную сукцессию биодegradации углеводов, в рамках модельных лабораторных и полевых экспериментов проводили исследование влияния на микробиоценоз почвы природных цеолитов (Шивиртуин и Пегассин), различных видов (аммонийных, нитратных, органических) и доз

азотных удобрений, а также сроков их внесения в сравнении с контролем – почвой без внесения мелиорирующих добавок.

При разработке тест-системы микробиологических критериев устойчивости экологических функций почвы и эффективности почвозащитных технологий были использованы следующие методологические подходы: 1. Сравнительный анализ структуры и функциональных свойств микробных сообществ целинной почвы, а также агро- и техногенно-трансформированных почв. 2. Изучение характера и скорости реакции микробного сообщества исследуемых вариантов почвы на определенный тип и интенсивность антропогенного воздействия. Исследования в рамках вышеуказанных методологических подходов проводили с использованием следующих методов: микробиологический анализ основных систематических и физиологических групп почвенных микроорганизмов; анализ степени биоразнообразия микробного сообщества в целом и внутри отдельных экологически наиболее значимых физиологических групп микроорганизмов при помощи индексов Шеннона, Симпсона и Бергера-Паркера; метод иницированного микробного сообщества (ИМС) (Экологическая роль..., 1986) и разработанные сотрудниками лаборатории микробиологии СибНИИСХиТ модификации метода для изучения целлюлозолитического микробного сообщества и деструкторов гумуса.

Микробиологический анализ включал в себя определение следующих систематических и физиологических групп микроорганизмов: аммонификаторов – на МПА; микроорганизмов, усваивающих минеральный азот – на КАА; спорообразующих бактерий – на СА:МПА=1:1 из пастеризованной водной взвеси; актиномицетов – на КАА; микромицетов – на среде Чапека с рН = 4,5-5 и на КГА (картофельно-глюкозный агар) (Практикум по микробиологии..., 1976); актиномицетов – на аспарагино-глицериновом агаре; фосфатрастворяющих и фосфатмобилизующих микроорганизмов – на среде Муромцева с добавлением соответственно  $Ca_3(PO_4)_2$  и фитина (Ежов, 1974); гумусразрушающих микроорганизмов – на жидкой и твердой минеральных средах с добавлением 0,01% гумата натрия (Сэги, 1983); нитрификаторов – на среде Виноградского; денитрификаторов – на простой среде для денитрификаторов; (Практикум по микробиологии, 1976); уробактерии – на среде Федорова (Аникеев, Лукомская, 1983); олигонитрофильных микроорганизмов – на среде Эшби; целлюлозолитических микроорганизмов – на среде Гетчинсона-Клейтона; микроорганизмов, активно продуцирующие аминокислоты – на среде Асаи с наложением фильтров, обработанных раствором нингидрина в ацетоне; актуальную и потенциальную активность азотобактера – по методу Виноградского (Методы почвенной ..., 1980).

Условно-патогенную и патогенную микрофлору учитывали: бактерии группы кишечной палочки – на среде Эндо; *Proteus vulgaris* и бактерии тифозно-дизентерийной группы – на среде Левина; *Bac. perfringens* – на среде Вильсона-Блера; сальмонеллезные бактерии – на висмут-сульфитном агаре (Мишустин, 1954).

Химический анализ почвы включал определение: нитратного азота с фенолдисульфокислотой (ГОСТ 26488-85), аммонийного азота с реактивом Несслера (ГОСТ 26489-85), а также общего азота (СТП 0493925-009-93) и фракционного состава азота по методу Шконде и Королевой (СТП 0493925-010-93). Общее содержание гумуса в почве анализировали по методу Тюрина (ГОСТ 26213-84), фракционный состав гумуса – по Пономаревой-Плотниковой (Определение фракционного ....., 1975), активность азотфиксации – ацетиленовым методом на газовом хроматографе «Хром-4».

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакетов прикладных программ «Snedekor v.5» и «Statistica 5.5 и 6.0».



### 3. БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ВЕРМИКОМПОСТА: ФАКТОРЫ И МЕХАНИЗМЫ

**3.1. Влияние сапротрофных микроорганизмов органического субстрата и симбиотической микрофлоры дождевого червя на его жизнедеятельность и качество получаемого вермикомпоста.** Одним из наиболее перспективных и экологически обоснованных направлений современного аграрного производства является развитие так называемого органического земледелия, основанного на соблюдении ключевых принципов устойчивого функционирования почвы: минимизации механического воздействия, исключаяющей нарушение строения почвенного профиля, применении оптимальных доз минеральных удобрений, строгом соблюдении севооборотов, а также обязательном поступлении необходимого количества органического вещества. Развитие органического земледелия невозможно без производства и применения биологически активных органических удобрений, обладающих выраженными ростостимулирующими и фунгистатическими свойствами. К числу подобных удобрений относится вермикомпост – продукт переработки разнообразных органических отходов дождевыми червями.

Поскольку вермикомпостирование по своей сути является сложным комплексом разнообразных микробиологических процессов, обусловленных и регулируемых жизнедеятельностью дождевых червей, для производства высококачественного вермикомпоста необходимо глубокое и всестороннее изучение этих процессов в целях их направленного регулирования. Кроме того, так как ризосфера является местом тяготения большинства представителей почвенной биоты, в том числе и дождевых червей, изучение микробиологических процессов формирования ростостимулирующей и фунгистатической активности вермикомпоста будет способствовать более глубокому пониманию природы биологической активности самой почвы.

Для выявления роли сапротрофной микрофлоры органического субстрата в процессах вермикомпостирования были проведены микробиологические и агрохимические исследования вариантов вермикомпоста, полученных в результате культивирования Красного калифорнийского гибрида (*Eisenia fetida Andrei*) в исходно различающихся условиях: на стерильном и нативном исходном торфоновозном субстрате. Для определения влияния симбиотической микрофлоры дождевого червя на его жизнедеятельность в опыте использовали как нормальных червей, так и червей с нарушенной специальной обработкой микробным сообществом кишечника и внешних слизистых покровов.

Результаты исследований свидетельствуют о том, что дождевой червь посредством своеобразного «селективного отбора» микроорганизмов-симбионтов оказывает значительное влияние на формирование структуры микробного сообщества копролитов. При этом в готовом вермикомпосте заметно увеличивается доля флюоресцирующих бактерий рода *Pseudomonas*, актиномицетов, микроорганизмов, участвующих в трансформации органических и минеральных фосфатов, нитрификаторов и целлюлозолитической микрофлоры. О симбиотических отношениях этих групп микроорганизмов с дождевым червем свидетельствует факт значительного уменьшения их численности в субстрате, перерабатываемом червями с нарушенной вследствие специальной обработки структурой микробного сообщества кишечника и внешних покровов (табл. 1). Одной из наиболее важных для червя групп микроорганизмов, обеспечивающих его защиту от повышенных концентраций аммиака, являются нитрификаторы. Угнетение деятельности нитрификаторов приводит к массовой гибели червей уже на 2-3 день культивирования.

Кроме того, экспериментально установленный факт супрессивного воздействия червя на патогенную микрофлору (сальмонеллезные бактерии, палочку Шига, *Bac. perforans*) свидетельствует о значительном улучшении санитарного состояния вермикомпоста по сравнению с исходной ТНС.

Таблица 1 – Влияние обработки дождевых червей на состав микрофлоры вермикомпоста;  $N \cdot 10^n$

Вариант опыта	<i>Pseudo-</i> <i>monas</i> , $N \cdot 10^9$	Нитри- фикаторы, $N \cdot 10^4$	Растворяющие $Ca_3(PO_4)_2$ $N \cdot 10^7$	Мобилизующие органофосфаты, $N \cdot 10^7$	Актино- мицеты, $N \cdot 10^5$	Миксо- бактерии, $N \cdot 10^5$
Субстрат без червей	29,2	5,5	16,4	28,2	3,1	14,5
Нормальные (необработанные) черви	61,0	16,6	63,0	169,3	35,2	42,5
Обработанные черви	7,3	2,3	35,4	35,1	$<10^2$	18,9
НСР <sub>05</sub>	4,8	9,3	2,5	5,6	0,8	7,6

*Примечание.* НСР<sub>05</sub> – наименьшая существенная разница при 95% уровне значимости.

О значительном влиянии сапрофитной микрофлоры исходного органического субстрата на качество готового вермикомпоста свидетельствует 3-х кратное снижение содержания минерального азота и 1,3-х кратное подвижных форм фосфора в вариантах вермикомпоста, полученных при переработке стерилизованной ТНС по сравнению с нестерилизованным субстратом.

**3.2. Влияние дождевых червей разных морфо-экологических групп (почвенных и навозных) на характер микробиологических и биохимических процессов трансформации органического субстрата.** Результаты предпринятых сравнительных исследований копролитов дождевых червей, принадлежащих к разным морфо-экологическим группам, позволили сделать заключение об избирательном характере их взаимодействия с микроорганизмами исследованных физиологических и систематических групп. Основное отличие Красного калифорнийского гибрида от остальных изученных видов навозных (*Eisenia fetida* киргизской и сибирской популяций) и почвенных червей (*Aporrectodea caliginosa*) состоит в значительном ускорении темпов аммонификации и минерализации азотсодержащих органических веществ уже на первых этапах переработки ТНС. Численность аммонификаторов и микроорганизмов, усваивающих минеральный азот, в копролитах Красного калифорнийского гибрида после первого месяца вермикультивирования значительно (в 6-7 раз) превышала численность данных микроорганизмов в копролитах остальных червей. Навозные черви в целом отличаются от почвенных активным стимулированием микробиологических процессов минерализации азотсодержащих органических веществ, а также нитрификации. Почвенные черви, напротив, способствуют усилению микробной деструкции лигно-целлюлозного комплекса органического субстрата. Кроме того, почвенные черви являются активными стимуляторами несимбиотической азотфиксации, в десятки раз превосходя по этому показателю навозных червей.

Для ответа на вопрос о степени сходства и различия между исследованными видами дождевых червей по их влиянию на биохимические и микробиологические свойства производимого вермикомпоста была проведена статистическая обработка всего массива экспериментальных данных при помощи дискриминантного анализа. Сравнение копролитов четырех видов червей по признакам накопления биомассы микроорганизмов, интенсивности выделения  $CO_2$  («дыхания»), а также активности таких ферментов как нитрогеназа, целлюлаза, полифенолоксидаза и каталаза показало, что все исследованные виды дождевых червей образуют 4 хорошо обособленные кластера, что, в свою очередь, свидетельствует о наличии значимых отличий в направленности и уровне стимулируемых ими биологических процессов в органическом субстрате (рис. 1а). При этом наи-

более обособленную группу формируют почвенные черви – в природных условиях тяготеющие к принципиально иной среде обитания, чем остальные исследованные представители навозных червей.

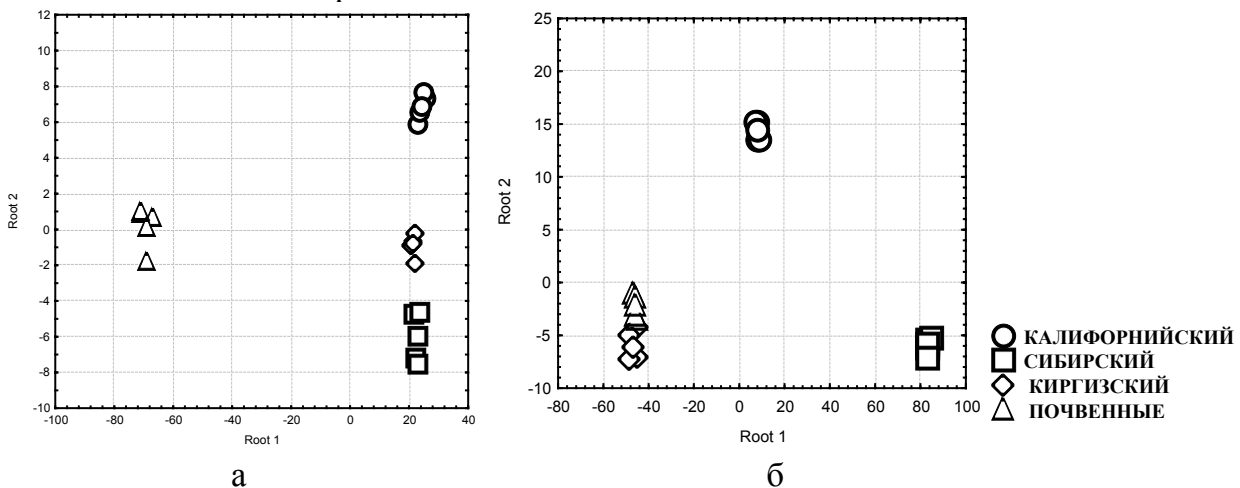


Рисунок 1 – Результаты дискриминантного анализа копролитов дождевых червей разных морфо-экологических групп, по факторам накопления биомассы микроорганизмов, интенсивности «дыхания» и активности ферментов (а); по факторам, отражающим микробиологические процессы цикла азота (б)

Несмотря на то, что данные дискриминантного анализа в целом относят Калифорнийский гибрид в группу навозных червей, на рисунке он все же заметно обособливается от навозных червей природных популяций: сибирского и киргизского. Наиболее заметным данное отличие становится при анализе микробиологических процессов цикла азота (содержание в копролитах общего и нитратного азота, накопление аминокислот, численность аммонификаторов, нитрификаторов и денитрификаторов), что подтверждает наличие определенных особенностей в характере стимулируемых гибридом микробиологических процессов и является результатом его направленной селекции с целью адаптации к повышенным концентрациям азота в субстрате.

**3.3. Роль микробного сапротрофного сообщества в формировании ростостимулирующих свойств вермикомпоста.** Анализ данных, представленных как в отечественной, так и зарубежной литературе, подтверждает установленную автором высокую ростостимулирующую активность вермикомпоста (Терещенко, 1994; Колесник, 2002; Edwards, Arancon, 2004; Norman et al., 2006). Изучение динамики активности кислотной и щелочной вытяжек из вермикомпоста, периодически отсеиваемого из перерабатываемой червями ТНС, показало, что наибольшее стимулирующее влияние и на корни, и на зеленую массу оказывает кислотная вытяжка, способствуя почти 40%-ой прибавке веса корней и зеленой массы пшеницы. Следовательно, в вермикомпосте стимуляторы роста растений представлены главным образом аминокислотами, органическими кислотами и витаминами – основными продуктами кислотного гидролиза. Это подтверждается положительной корреляцией ( $r_{xy} = 0,88$ ) динамики кислотных вытяжек и накопления нингидрин-положительных продуктов в органическом субстрате в процессе вермикультивирования. Максимальные показатели активности щелочной вытяжки по отношению к зеленой массе проростков составили 20-25 %.

Определение роли, которую играют дождевые черви и сапротрофная микрофлора органического субстрата в синтезе и накоплении в вермикомпосте соединений аминной и аминокислотной природы, осуществляли в рамках модельного опыта, схема которого предполагала культивирование Красного калифорнийского гибрида на двух видах органического субстрата: смеси (1:4) низинного торфа и подстилочного навоза КРС, а так-

же – смеси низинного торфа со свиным навозом (1:4). В качестве контроля использовали вариант с ТНС на основе навоза КРС без червей.

Сходный характер динамики активности кислотных вытяжек в вариантах с вермикультивированием и в контроле показал, что динамика в большей степени определяется метаболической активностью микрофлоры самого субстрата, а не червя (рис. 2). Однако присутствие червей обуславливает тенденцию к увеличению абсолютных значений активности вытяжек, что в конечном итоге сказывается на возрастании показателей ростостимулирующей активности вермикомпоста по сравнению с исходной ТНС.

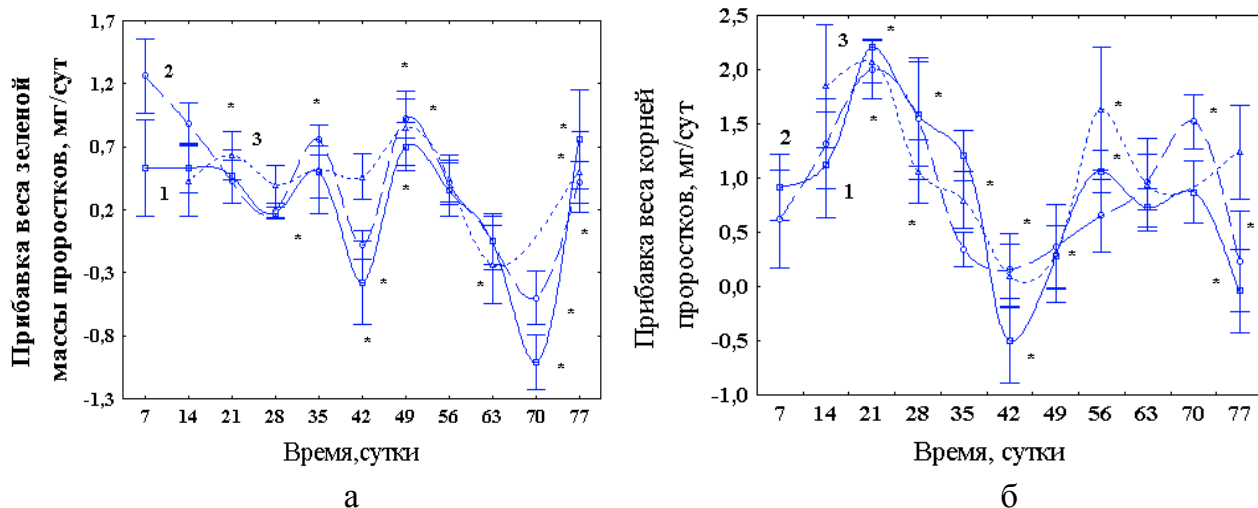


Рисунок 2 – Динамика активности кислотных вытяжек из торфонавозного субстрата без червей и двух вариантов вермикомпоста по отношению к зеленой массе проростков (а) и корням (б)

*Примечание.* \* – здесь и далее в рисунках различия достоверны при 95%-м уровне значимости. 1 – контроль (без червей); 2 – вермикультивирование на навозе КРС; 3 – вермикультивирование на свином навозе

Исследование динамики активности соединений гумусовой природы, экстрагируемых щелочными вытяжками из отсеваемого вермикомпоста, на всем протяжении культивирования дождевых червей, по отношению, как к зеленой массе, так и к корням проростков, показало, что в кривой активности наблюдалась определенная периодичность (рис. 3).

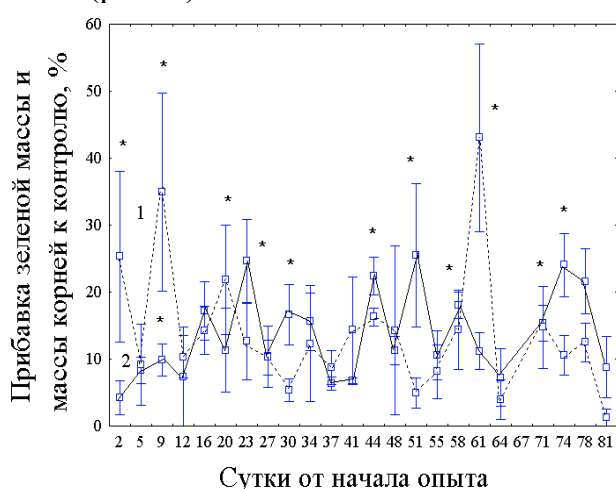


Рисунок 3 – Динамика активности щелочных вытяжек из вермикомпоста по отношению к зеленой массе (1) и корням (2) проростков

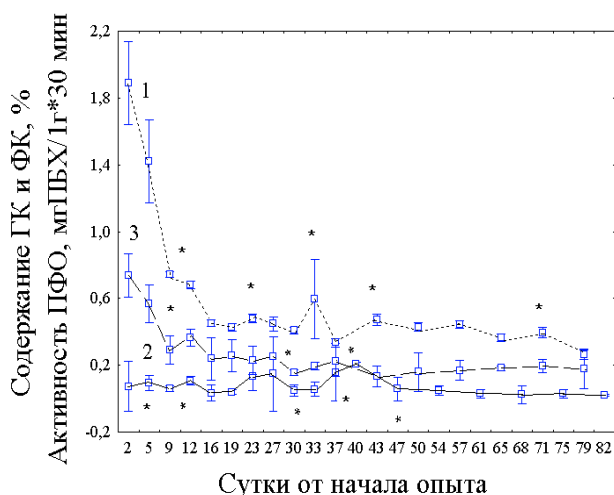


Рисунок 4 – Динамика накопления в вермикомпосте гуминовых кислот (2) и фульвокислот (3), а также активности полифенолоксидазы (1)

Динамика накопления фульвокислот и гуминовых кислот, а также активности ответственной за их синтез полифенолоксидазы также имела статистически достоверный колебательный характер (рис. 4). Сопоставление кривых активности щелочных вытяжек с кривыми накопления фульвокислот выявило хорошо выраженную прямую зависимость (рис. 5а). Тогда как, вопреки существующему мнению ряда специалистов о решающем вкладе гуминовых кислот в ростостимулирующие свойства вермикомпоста (Калинина, 2002; Norman, 2006), зависимости между интенсивностью накопления гуминовых кислот и активностью щелочных вытяжек установить не удалось (рис. 5 б).

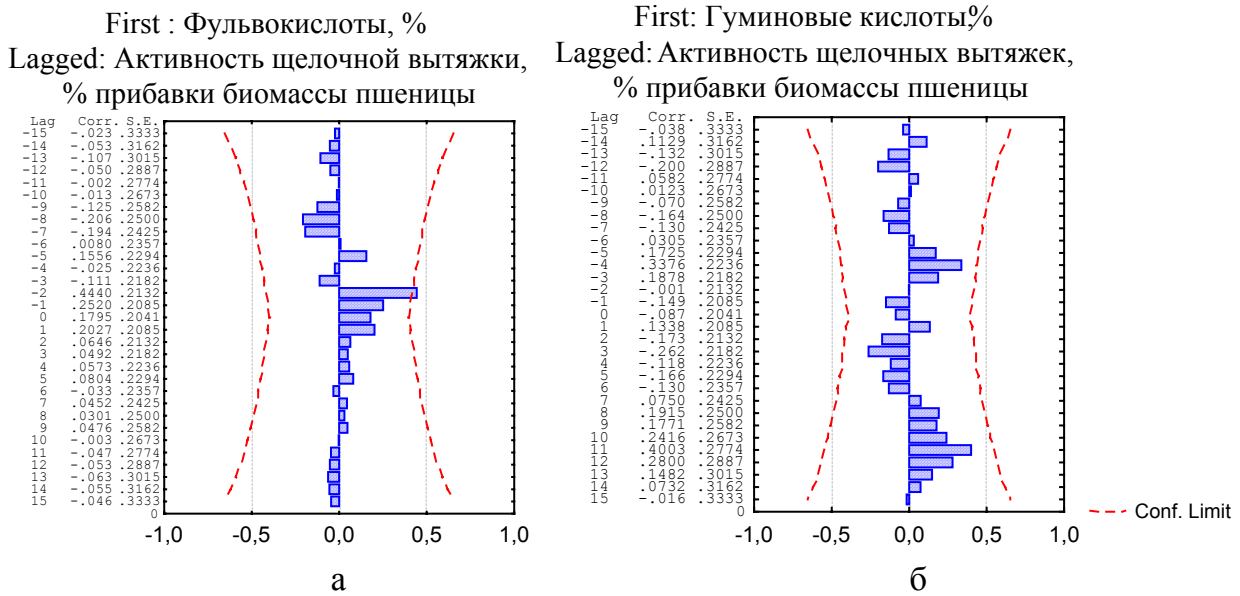


Рисунок 5 – Зависимость динамики активности щелочных вытяжек от динамики накопления гуминовых кислот (а), фульвокислот (б)

Сопоставление динамики активности полифенолоксидазы с динамикой накопления фульвокислот и гуминовых кислот также свидетельствует о наличии зависимости между данными параметрами. Кросскорреляционный анализ показал, что активность полифенолоксидазы в большей степени обуславливает накопление фульвокислот, чем гуминовых кислот (рис. 6 а, б).

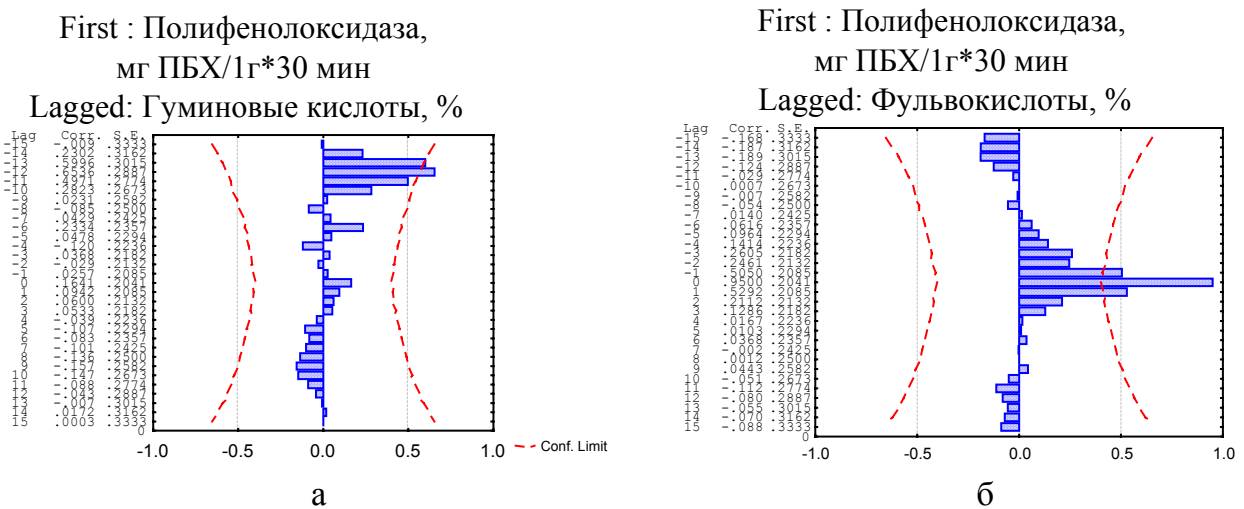


Рисунок 6 – Зависимость динамики накопления гуминовых (а) и фульвокислот (б) от динамики активности полифенолоксидазы

Возможно, это связано с тем, что фульвокислоты являются менее зрелыми и менее сложными соединениями, по сравнению с гуминовыми кислотами и являются непосредственным продуктом активности полифенолоксидазы. Гуминовые кислоты, напро-

тив, это – соединения более зрелые и, как правило, начинают накапливаться на более поздних этапах вермикультивирования (Еськов, 2004). Согласно полученным в данном эксперименте результатам в «молодом» вермикомпосте ростостимулирующая активность определяется в большей степени воздействием фульвокислот, чем гуминовых кислот.

Сопоставление кривой активности полифенолоксидазы с кривой численности микроорганизмов показало, что динамика активности фермента полифенолоксидазы в большой степени обусловлена динамикой численности микроорганизмов-аммонификаторов с коэффициентом корреляции 0,7. Эти данные свидетельствуют о том, что накопление в органическом субстрате фульвокислот, а соответственно и ростостимулирующие свойства субстрата в большой степени обусловлены метаболической активностью аммонификаторов. Согласно сведениям Н.П. Битюцкого с соавт. (2005) дождевые черви способны сами выделять фенолоксидазы клетками эпителия. Однако полученные в ходе рассматриваемого эксперимента данные свидетельствуют о том, что поставщиками полифенолоксидаз наряду с дождевыми червями могут быть также и микроорганизмы субстрата.

Как известно в кишечнике беспозвоночных активно протекают процессы гумификации органических остатков. У дождевых червей эти процессы наиболее выражены. При переработке органических субстратов происходит не только новообразование низкомолекулярных форм гумусовых кислот, но и их полимеризация, увеличение степени ароматизации, что является признаком более зрелых стадий гумификации. Высокое содержание в вермикомпостах «готовых» гумусовых веществ, термодинамически стабильных, устойчивых к минерализации, имеет важное значение для гумусового состояния почв. Однако основными ростостимулирующими веществами в вермикомпосте (по крайней мере – в свежеприготовленном) являются не столько гуминовые, сколько менее высокомолекулярные фульвокислоты.

**3.4. Влияние микрофлоры вермикомпоста на уровень его фунгистатической активности.** Изучение микробиологических аспектов вермикультивирования показало, что в вермикомпосте значительно возрастает численность микрофлоры биоконтроля, в частности, бактерий рода *Pseudomonas* (Toyota, Kimura, 2000; Терещенко, 2003). При этом скрининг бактериальных культур рода *Pseudomonas*, выделяемых из вермикомпоста, показал очень высокий уровень фунгистатической активности у большинства изолятов по отношению к фитопатогенным грибам, который может достигать 50-80% подавления скорости роста чистых культур фитопатогенных грибов *Bipolaris sorokiniana* и *Fusarium oxysporum*.

Поскольку одной из доминирующих групп микроорганизмов в вермикомпосте являются низшие сапротрофные грибы, возникло предположение о возможной индукции супрессивной активности *Pseudomonas* микромицетами. Чтобы проверить предположение о зависимости уровня фунгистатической активности псевдомонад от численности низших грибов в вермикомпосте, был предпринят эксперимент, в ходе которого спровоцировали резкое скачкообразное увеличение численности грибов в перерабатываемой червями ТНС за счет первоначального снижения влажности субстрата на 10% и последующего обильного увлажнения. Непосредственно до и после увлажнения субстрата из него выделяли бактериальные культуры рода *Pseudomonas* и в биотесте методом прямого штриха (Методы почвенной микробиологии..., 1980) определяли уровень их фунгистатической активности, о котором судили по степени подавления скорости радиального роста чистых культур грибов *Bipolaris sorokiniana* и *Fusarium oxysporum*.

Резкое увеличение влажности субстрата привело не только к более чем двукратному возрастанию численности грибов (с 412 тыс. КОЕ в 1 г до 841), но и к увеличению

таких показателей роста микромицетов, как длина и плотность гиф (с 3,7 мм и 16 шт/мм<sup>2</sup> перед увлажнением до 5,7 мм и 44,8 шт/мм<sup>2</sup> после увлажнения соответственно). Фунгистатическая активность бактериальных изолятов рода *Pseudomonas*, выделенных из вермикомпоста после увлажнения, возросла по отношению к *Fusarium oxysporum* и *Bipolaris sorokiniana* с 10,9±2,9% до 24,1±2,3% и с 32,3±1,9% до 60,36±2,8% соответственно. Таким образом, результаты эксперимента подтвердили вероятность того, что фунгистатическая активность бактерий в вермикомпосте в значительной степени может быть обусловлена активностью грибной составляющей микробсообщества вермикомпоста.

Полученные результаты соответствуют сведениям S. Scheu и D. Parkinson (1994) об увеличении в субстратах, перерабатываемых червями, прежде всего быстрорастущих форм микромицетов. Кроме того, в субстратах, где обитают дождевые черви, на фоне увеличения общей численности грибов часто наблюдается перестройка структуры сообщества микромицетов, которая выражается в увеличении доли ряда сапротрофных грибов, в частности рода *Trichoderma*, и сокращении количества некоторых патогенных грибов за счет подавления прорастания спор (Moody, Briones, 1995; McLean, Parkinson, 2000). В связи с этим, возникает предположение о том, что фунгистатическая активность вермикомпоста может быть обусловлена не только показателями общей численности грибов в вермикомпосте, но также и численностью микромицетов с разной трофической стратегией, т.е. сапротрофов и патогенов. Поскольку основными агентами биоконтроля в вермикомпосте являются бактерии рода *Pseudomonas*, актуальным становится вопрос о влиянии сапротрофных и патогенных микромицетов на уровень фунгистатической активности псевдомонад. Серия биотестов с чистыми культурами грибов и бактериальными изолятами рода *Pseudomonas* показала отсутствие статистически значимых отличий в величинах подавления роста патогенных и сапротрофных грибов псевдомонадами (табл. 2).

Таблица 2 – Средние по серии биотестов показатели подавления скорости роста чистых культур фитопатогенных и сапротрофных грибов под влиянием *Pseudomonas*

Культура гриба	Скорость роста грибов в присутствии бактерий, мм/ч	Скорость роста грибов в контроле, мм/ч	Подавление роста гриба по отношению к контролю, %
<i>Fusarium oxysporum</i>	0,169±0,023	0,249±0,011	32,0
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	0,069±0,002	0,150±0,020	53,7
<i>Rhizoctonia solani</i>	0,176±0,016	0,228±0,023	31,6
<i>Penicillium sp.</i>	0,157±0,044	0,206±0,014	24,0
<i>Aspergillus sp.</i>	0,325±0,030	0,475±0,031	31,5
<i>Trichoderma viride</i>	0,403±0,029	0,640±0,025	36,9

В связи с тем, что помимо *Pseudomonas* в вермикомпосте содержится довольно широкий в систематическом отношении спектр бактерий, также способных оказывать влияние на его фунгистатические свойства, была разработана новая методика, позволяющая проследить динамику суммарной фунгистатической активности всего консорциума бактериальных культур по отношению к фитопатогенным грибам, обеспечивающая совместное культивирование гриба и бактерий, при котором отсутствует экранирование питательной среды для гриба колониями бактерий.

Результаты, представленные на рисунке 7, свидетельствуют о том, что кривая динамики суммарной фунгистатической активности бактериального консорциума верми-

компоста и кривая численности бактерий на протяжении 2 месяцев вермикультивирования имеют вид, близкий к синусоиде. Анализ временных рядов Фурье показал, что обе кривые характеризуются одинаковыми значениями периода колебаний, равными 14-15 суткам (рис. 9 а, б). Следовательно, существует вероятность того, что изменение во времени уровня фунгистатической активности вермикомпоста может быть обусловлено изменением численности самих бактерий, продуцирующих биофунгициды.

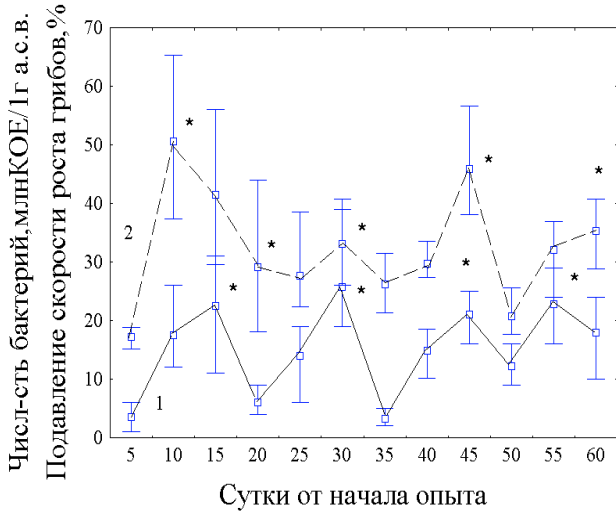


Рисунок 7 – Сопоставление динамики численности микроорганизмов (1) и суммарной фунгистатической активности микробного сообщества (2)

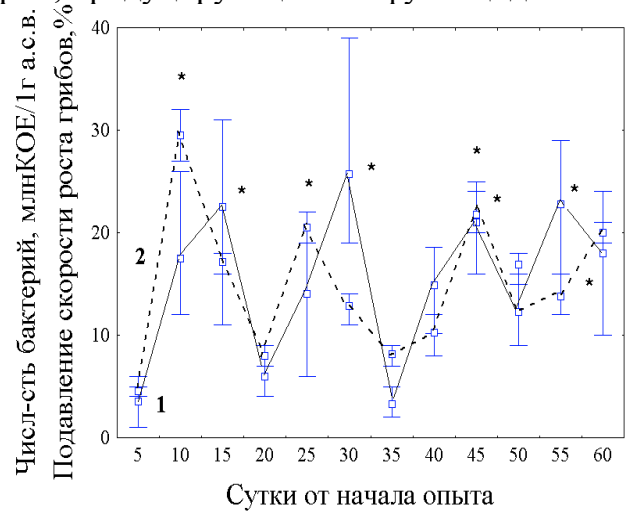


Рисунок 8 – Сопоставление динамики численности микроорганизмов (1) и фунгистатической активности одной бактериальной клетки (2)

Пересчет суммарных показателей фунгистатической активности на одну бактериальную клетку показал, что активность отдельных клеток бактерий также носит циклический характер (рис. 8). При этом период колебаний активности отдельных клеток совпадает с периодом колебаний суммарной активности бактериального консорциума (рис. 9 б, в). Следовательно, характер периодических изменений фунгистатической активности вермикомпоста в процессе его созревания может быть обусловлен не только простым колебанием общей численности бактерий, продуцирующих биофунгициды, но и изменением уровня фунгистатической активности самих бактериальных клеток.

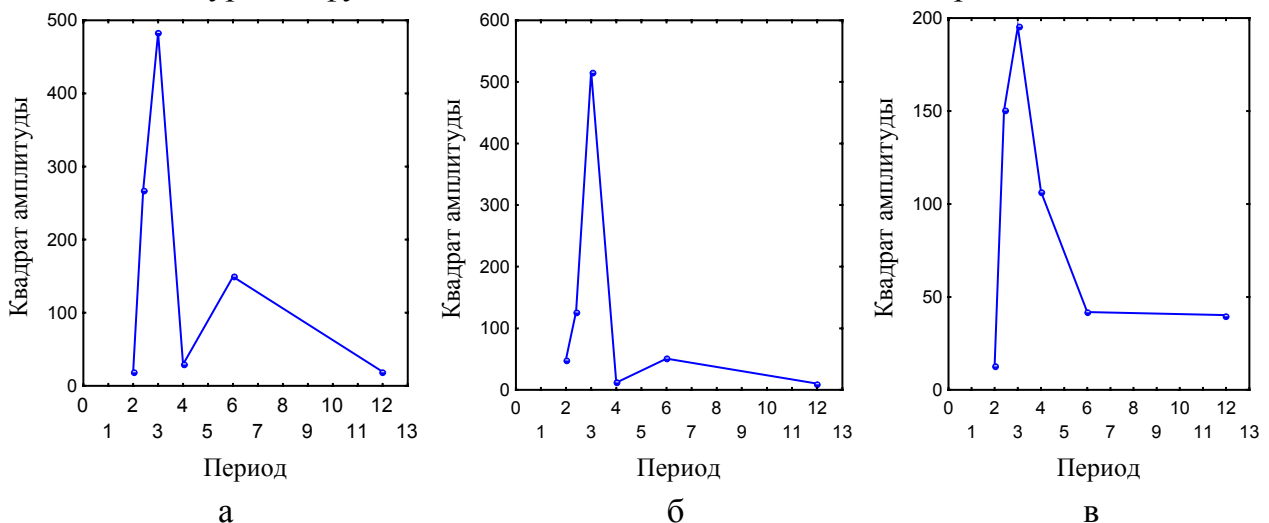


Рисунок 9 – Значение периода колебания для функций, описывающих динамику численности микроорганизмов (а), суммарной фунгистатической активности микробного сообщества вермикомпоста (б), а также активности одной бактериальной клетки (в)



Изучение технологических процессов производства антибиотиков позволило установить, что динамика накопления антибиотика в культуральной жидкости, как правило, имеет вид зависимости, характерной для биологического синтеза вторичных метаболитов, т.е. максимум образования биомассы микроорганизмов во времени предшествует максимуму продуцирования микроорганизмами антибиотика (Быков и др., 1987). Подобная прямая зависимость между продуцированием биологически активных веществ и плотностью популяции наблюдается не только в условиях закрытых биотехнологических систем, но и в условиях открытых природных экосистем, в частности у ризосферных *Pseudomonas* (Хмель и др. 2002). Явление взаимного антибиотического подавления у бактерий, принадлежащих к одному роду, было также установлено Б.В. Таракановым с соавт. (2001) в экспериментах с *Escherichia coli*.

Результаты кросскорреляционного анализа подтвердили прямую зависимость динамики суммарной фунгистатической активности бактериального консорциума от динамики численности бактерий (рис. 10 а).

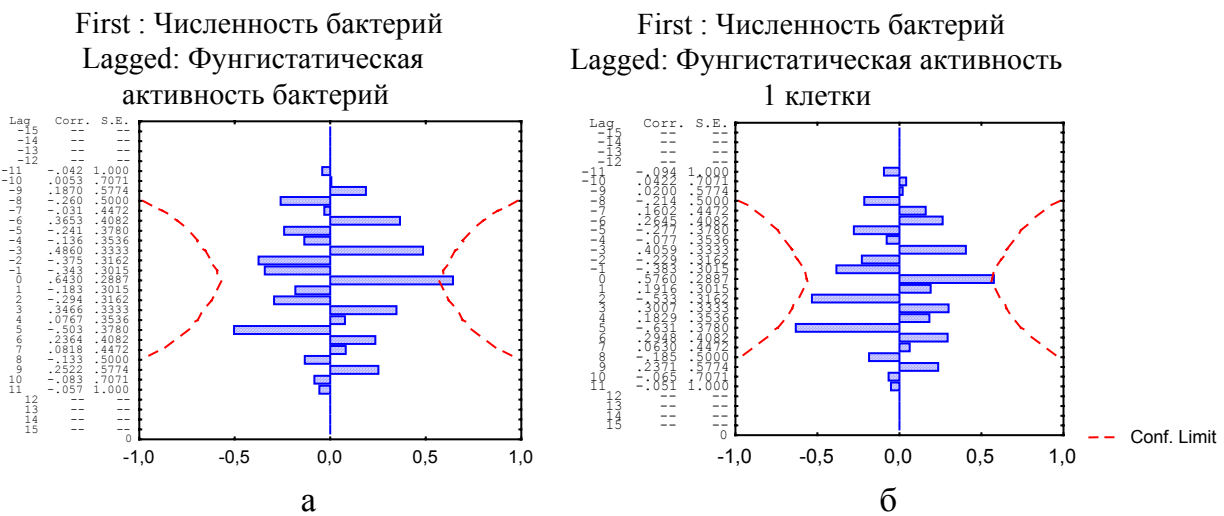


Рисунок 10 – Зависимость динамики суммарной фунгистатической активности бактериального консорциума вермикомпоста (а) и динамики фунгистатической активности отдельной бактериальной клетки (б) от динамики численности бактерий

Этот же анализ показал высокую вероятность прямой зависимости между уровнем фунгистатической активности одной отдельно взятой бактериальной клетки и численностью бактерий в один определенный срок наблюдений, подтвердив предположение об индуцированном характере фунгистатической активности бактерий в вермикомпосте (рис. 10 б). При этом в качестве индуктора может выступать не только конкуренция бактерий за субстрат с обильно населяющими вермикомпост низшими грибами, но и конкуренция между самими бактериями, высокая численность которых поддерживается физиологической активностью дождевых червей.

**3.5. Гармонический характер динамики численности микроорганизмов и роль динамических характеристик микробного сообщества вермикомпоста в формировании его фунгистатических свойств.** Анализ большого массива полученных автором экспериментальных данных о микробиологических процессах в перерабатываемых дождевыми червями органических субстратах убедительно свидетельствует о колебательном характере динамики численности микроорганизмов (рис. 11 а, б). Статистический анализ достоверности колебаний во всех экспериментах подтвердил истинность полученной картины динамики численности микроорганизмов при 95-ти % уровне значимости.

Колебания численности микроорганизмов различных трофических групп на начальных стадиях разложения свежих растительных остатков непосредственно после внесения их в почву наблюдали многие исследователи (Kuikman et al., 1991; Zelenev et al., 2000; Mamilov et al., 2001). В качестве основной причины большинство авторов полагают изменение численности простейших – основных хищников бактерий (Verhoeff, Brussaard, 1990) или связывают это явление с концентрацией легкодоступных субстратов (Ferris et al., 1998; Calbrix et al., 2007).

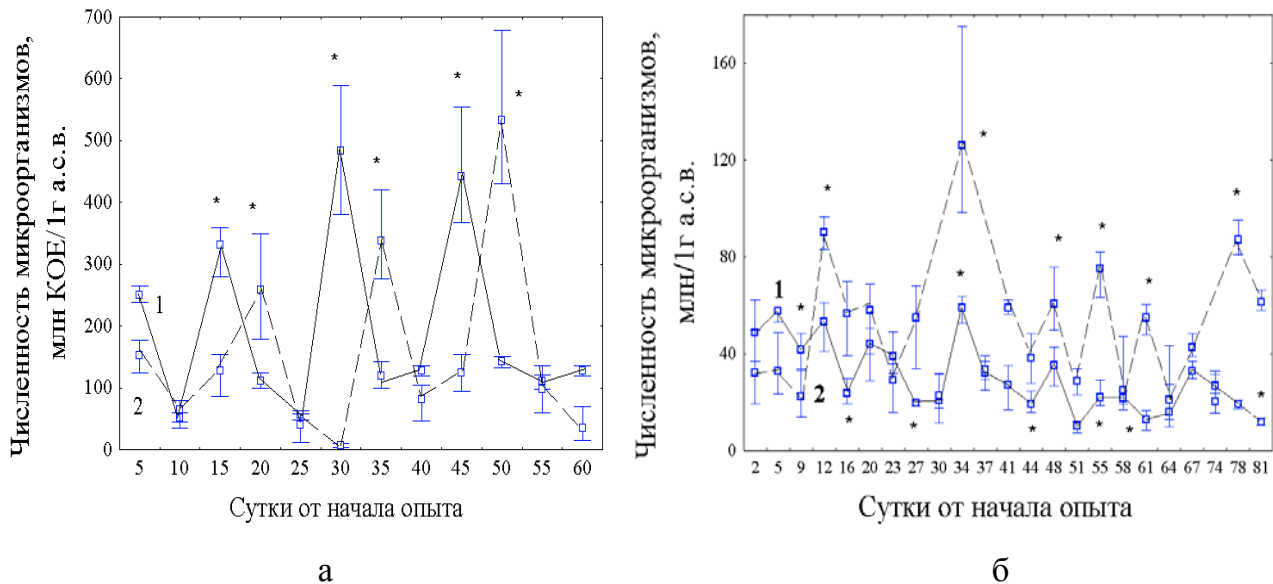


Рисунок 11 – Динамика численности аммонификаторов (1) и микроорганизмов, усваивающих преимущественно минеральный азот (2) в органическом субстрате, перерабатываемом червями в процессе вермикюльтивирования (данные 2004 (а), 2006 (б) годов)

Исследование характера колебаний при помощи статистического анализа временных рядов Фурье позволило выявить хорошо различимый период, подтвердив тем самым их гармонический характер (рис. 9 а), одной из наиболее вероятных причин которого могут быть автоколебания, возникающие в любой достаточно сложной биологической системе, включающей две и более взаимодействующие и взаимозависимые друг от друга популяции (Базыкин, 1985).

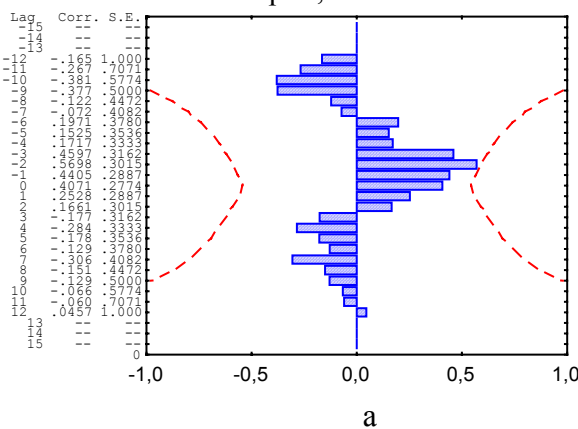
Расчет коэффициента кросскорреляции между динамикой численности микроорганизмов-аммонификаторов (на МПА) как ведущего фактора, и динамикой численности микроорганизмов, преимущественно усваивающих минеральный азот (на КАА), как зависимой переменной, показал наличие прямой взаимосвязи между данными показателями с коэффициентом корреляции 0,85. Данное явление может быть обусловлено тем, что для микроорганизмов, учитываемых на КАА, продукты трофической активности аммонификаторов являются основным пищевым субстратом.

В соответствии с выдвинутой V.V. Zelenev с соавт. (2006) гипотезой при доминировании в субстрате представителей г-стратегии, составляющих основу микробной сукцессии на легкодоступных источниках углерода, ведущую роль в возникновении автоколебаний начинают играть внутри- и межпопуляционные взаимодействия быстрорастущих форм микроорганизмов, конкурирующих за данный субстрат, а не отношения типа «хищник-жертва». Поскольку торфоновозная смесь, перерабатываемая червями в процессе вермикюльтивирования, отличается очень высоким содержанием доступных для микробов источников углерода, населяющее ее микробное сообщество имеет ярко выраженные черты г-стратегии с доминированием быстрорастущих неспорообразующих форм бактерий (Toyota, Kimura, 2000; Терещенко, 2003). По этой причине роль ин-

дуктора обнаруженных в перерабатываемом дождевыми червями органическом субстрате колебаний численности микроорганизмов, вероятнее всего, играют взаимодействия типа «микроорганизмы – субстрат», а не «черви – простейшие – микроорганизмы», т.е. «хищник – жертва».

Математический анализ динамики численности низших грибов также обнаружил гармонический характер колебаний с периодом, равным 12-14 суткам. Чтобы подтвердить влияние низших грибов на уровень фунгистатической активности *Pseudomonas* в вермикомпосте, исследовали кросскорреляционную зависимость динамики фунгистатической активности бактерий от динамики численности грибов. Для изучения динамики фунгистатической активности *Pseudomonas* использовали методику, отличную от описанной в разделе 3.4, согласно которой по мере созревания вермикомпоста через каждые 3-4 дня проводили выделение *Pseudomonas* в чистую культуру. Затем определяли супрессивную активность штаммов в биотесте с *Fusarium oxysporum* и рассчитывали усредненные показатели активности. Результаты кросскорреляционного анализа подтвердили высказанное в разделе 3.4 предположение о зависимости уровня фунгистатической активности бактерий рода *Pseudomonas* от численности низших грибов в вермикомпосте (рис. 12 б). Поскольку представленные в вермикомпосте преимущественно быстрорастущие виды микромицетов являются одними из основных конкурентов *Pseudomonas* за энергетический субстрат, велика вероятность того, что цикличность численности грибов в значительной степени обуславливает цикличность супрессивной активности бактерий.

First: Динамика численности грибов  
Lagged: Динамика фунгистат. активности бактерий, %



First : Динамика численности *Pseudomonas*

Lagged: Динамика фунгистат. активности, %

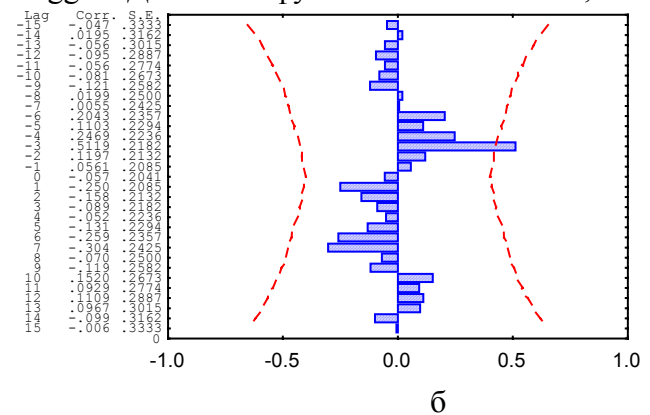


Рисунок 12 – Влияние динамики численности флюоресцирующих бактерий (а) и динамики численности низших грибов (б) на фунгистатическую активность бактериальных изолятов рода *Pseudomonas*

В свою очередь расчет кросскорреляционным методом зависимости динамики показателей фунгистатической активности псевдомонад от динамики численности бактерий подтвердил ранее высказанное предположение о возможности индукции активности бактерий динамическими характеристиками их популяции, а именно: цикличностью их численности, обуславливающей периодические всплески плотности популяции, и, как следствие, обострение внутривидовой конкуренции за пищевой субстрат (рис. 12 а).

**3.6. Микробиологические механизмы формирования системного неспецифического иммунитета у растений под воздействием вермикомпоста.** Как известно помимо локальной устойчивости к патогенам растения могут формировать и системную устойчивость, проявляющуюся на расстоянии от точки взаимодействия с патогеном и

захватывающую все растительные ткани. В большинстве случаев в производственных условиях для иммунизации растений используют обработку семян или вегетирующих растений фитоалексинами или индуцирующими их синтез элиситорами, а также растворами иммунных индукторов, полученных из культуральных сред фитопатогенных грибов или компонентов клеточных стенок грибов (Ayers, 1976; Yoshikawa et al., 1993).

Кроме того, предпринимались также попытки иммунизации растений ослабленными культурами патогенных грибов и их авирулентными расами (цит. по Метлицкий, 1985). Последний способ иммунизации растений наиболее интересен для объяснения механизма формирования системного иммунитета у растений, выращиваемых на грунтах, содержащих вермикомпост, и на почвах, обильно населенных дождевыми червями.

Известно, что вермикомпост отличается высокой численностью и видовым разнообразием микроорганизмов, в том числе и микроскопических грибов. В основном в копролитах доминируют сапротрофные виды грибов, однако встречаются и представители рода *Fusarium*, как известно, способные поражать широкий спектр сельскохозяйственных культур. Так, например, *Fusarium ventricosum* и *Fusarium oxysporum* наряду с *Trichoderma viride* часто составляет основу целлюлозолитического грибного сообщества копролитов. Однако, несмотря на это, растения, выращиваемые на вермикомпост содержащих субстратах, практически никогда не проявляют признаков фузариоза. Это может быть обусловлено тем, что патогенные грибы находятся в вермикомпосте в угнетенном состоянии из-за постоянного супрессивного воздействия на них бактериального сообщества вермикомпоста, многие представители которого являются активными продуцентами биофунгицидов. Наличие в вермикомпосте ослабленных форм *Fusarium* позволяет сделать предположение о присущей вермикомпосту способности индуцировать у выращиваемых на нем растений неспецифическую системную устойчивость к агрессивным штаммам *Fusarium*.

Для проверки данного предположения в рамках модельного эксперимента первоначально получили два вида рассады овощных культур, путем выращивания на нативном и на стерилизованном (т.е. без микромицетов) вариантах грунта, содержащем вермикомпост. Затем проводили наблюдение за вегетативным ростом обоих видов рассады после пересадки на торфо-минеральный грунт по инфекционному фону *Fusarium oxysporum* и без него. Об уровне устойчивости растений судили по степени проявления основных признаков фузариозного поражения, а именно: по увяданию молодых листьев и гибели растений, по общему угнетению вегетативного роста, выражающемуся в снижении вегетативной массы, а также по специфическому эффекту вытягивания растений, стимулируемому грибом, посредством выделения гибберелиноподобных веществ. Для более наглядного представления результатов эксперимента был рассчитан удельный вес рассады, как отношение массы растений к их длине.

В вариантах с инфекционным фоном максимальная степень поражения *Fusarium oxysporum* (33%) была зафиксирована у растений капусты, выращенных из «стерильной» рассады, здесь же были отмечены случаи гибели (13% от общего числа). Удельный вес растений капусты и огурца, выращенных из рассады, полученной на нормальном нестерильном грунте, был больше, чем растений, выращенных из «стерильной» рассады (рис. 13). Это может быть обусловлено тем, что рассада, полученная на нативном вермикомпост содержащем грунте, предположительно была иммунизирована и потому оказалась более устойчива к фузариозу, чем растения, выращенные в стерильных условиях.

Аналитическая обработка результатов фенологических наблюдений показала, что эффект иммунизации у «нестерильной» рассады проявлялся не только в больших значениях массы растений и удельного веса, но и в меньшей степени деформации листовой

пластинки. Расчет соотношения длины и ширины листовой пластинки выявил эффект вытягивания листовой пластинки у неиммунизированных растений при их выращивании на зараженном *Fusarium oxysporum* грунте. Особенно хорошо это было заметно на 4-м, более молодом листе (рис. 14).

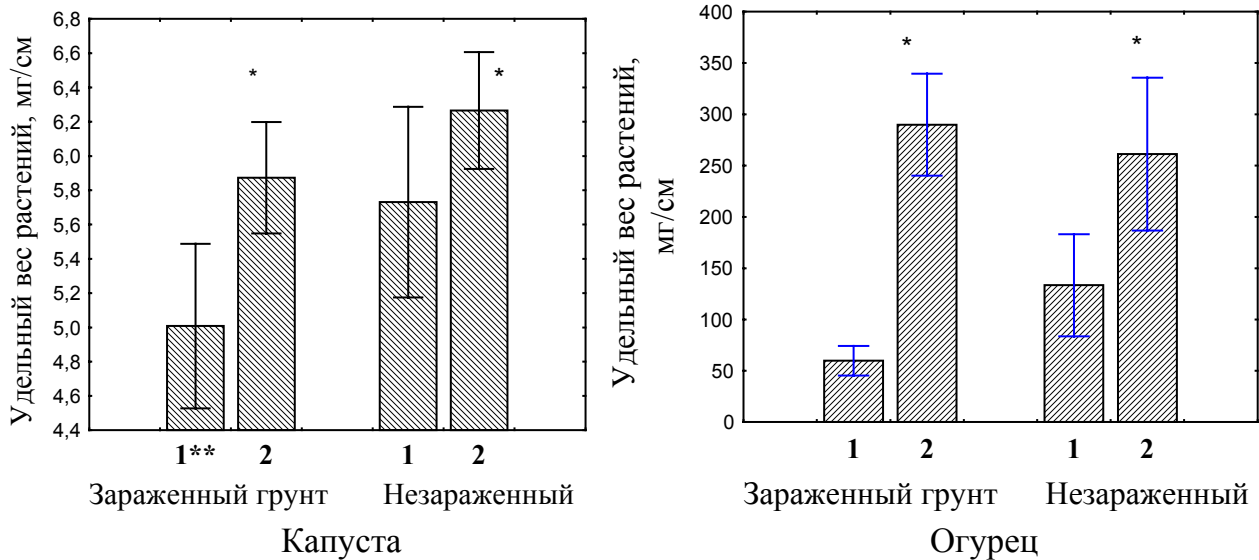


Рисунок 13 – Показатели удельного веса растений капусты и огурца, выращенных из рассады, полученной на «стерильном» и нативном (нормальном) вариантах грунта  
*Примечание.* \*\* 1 – «Стерильная» и 2 – «нестерильная» рассада – предположительно неиммунизированная и иммунизированная рассада соответственно

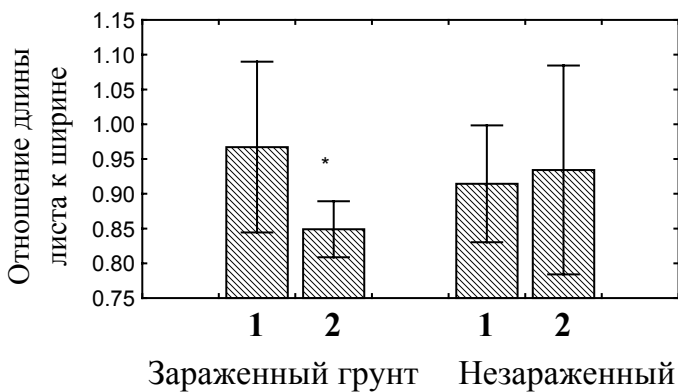


Рисунок 14 - Соотношение длины и ширины 4-го листа

*Примечание.* - 1,2 - см. рис. 13

Результаты микробиологического анализа ризосферы обоих типов рассады показали, что численность неспорообразующих флуоресцирующих форм бактерий в ризосфере «стерильной» рассады была не меньше, чем в ризосфере «нестерильной» и составила соответственно  $87,2 \pm 20,8$  и  $36,8 \pm 5,7$  млн. КОЕ/1г. Данное явление обусловлено обсеменением ризосферы «стерильной» рассады собственной микрофлорой семени. Следовательно, корни «стерильной» рассады в момент ее пересадки на зараженный и незараженный

грунт были обсеменены полезной микрофлорой в не меньшей степени, чем корни рассады, выращенной на нестерилизованном грунте. Поэтому более высокая устойчивость «нестерильной» рассады в опыте по сравнению со «стерильной» обусловлена именно эффектом иммунизации, а не присутствием полезной микрофлоры на корнях.

#### 4. ОСОБЕННОСТИ БИОРЕМЕДИАЦИИ АГРОГЕННО-ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ПОЧВ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОЧВОЗАЩИТНОЙ ТЕХНОЛОГИИ ПКВК

**4.1. Основные этапы и особенности технологии ПКВК и модифицированной технологии получения грунта на основе вермикомпоста.** Одной из наиболее актуальных экологических проблем современности является необходимость утилизации разнообразных органических отходов при вполне очевидном дефиците органических удобрений, особенно в нечерноземной зоне, где почвы отличаются исходной малогу-

мусностью. Однако свежий навоз и другие органические отходы в чистом виде вносить на поля нельзя из-за присутствия в них патогенной микрофлоры и других, опасных для почв и сельскохозяйственных растений организмов. Поэтому все органические отходы сельского хозяйства нуждаются в предварительной переработке в компосты, но процесс этот довольно длительный и требует немалых затрат. Выход из ситуации видится в разработке комплексных безотходных способов сельскохозяйственного производства, к числу которых относится и вермикультура – переработка органических отходов при помощи дождевых червей.

Современная практика вермикультивирования располагает большим разнообразием технологических приемов и технических средств. Вместе с тем большинство из них разработаны для условий Европейского региона и потому не всегда применимы в Сибири. В частности, использование обогреваемых помещений зимой для сохранения поголовья червей сводит на нет доходы от вермикультивирования, полученные за летний период. Следовательно, в условиях длительных зим с устойчивыми морозами, но при значительной мощности снегового покрова экономически и экологически целесообразно перемещение вермикультивирования непосредственно на паровое поле, нуждающееся в биологической рекультивации (Чичерин, Терещенко, 1996). В этом случае для зимнего содержания нарастающей массы червей создаются специальные, увеличенные в размерах и укрытые соломой вермибурты, в которых обеспечивается и необходимый запас корма червям (на всю зиму), и удовлетворительные условия для жизнедеятельности и даже воспроизводства червей (температура внутри вермибурта зимой не опускается ниже +6...8°C).

Весной бурты вскрываются и трансформируются в вермигряды оптимальных размеров, которые используются для получения вермикомпоста и воспроизводства червей в коммерческих целях, частично для внутренних потребностей самого производителя (фермерского и государственного хозяйства), а также для наращивания маточной культуры червей. Непереработанные червями остатки вермигряд (как правило, нижние их слои), но претерпевшие преобразование за счет компостирования, могут использоваться в качестве органических удобрений на полях. На следующий год вермикультивирование перемещается на соседнее поле, которое отводится под пар, а прошлогоднее поле, после проведения на нем вермикультивирования, вспахивается и используется под выращивание конкретной сельскохозяйственной культуры. Так, в результате планомерного применения на полях технологии Полевого круглогодичного вермикультивирования (ПКВК), происходит последовательная пространственно-временная биологическая рекультивация (окультуривание) пахотных земель, которая с агроэкологической точки зрения особенно важна для нечерноземной зоны.

**4.2. Влияние вермикомпоста на биологическую активность почвы и развитие сельскохозяйственных культур в условиях вегетационных опытов.** Одной из основных целей производства и применения в растениеводстве вермикомпоста является повышение плодородия почвы и улучшение качества выращиваемой сельскохозяйственной продукции. Однако применение вермикомпоста, как и любого другого биологически активного органического удобрения требует специальных исследований для определения оптимальных доз его внесения под конкретные культуры и при возделывании их на тех или иных почвах. В этих целях в теплице научно-экспериментальной базы СибНИИСХиТ СО Россельхозакадемии были проведены вегетационные опыты с культурой огурца и томата. Рассаду огурца выращивали на верхнем (пахотном) слое дерново-подзолистой почвы с добавлением различных доз вермикомпоста Красного калифорнийского гибрида: 10, 25, 50 и 70% от общей массы почвы, а также на чистом непросеянном компостном субстрате после культивирования червей. В качестве контроля



использовали почву с NPK (контроль-1) и почву с добавлением 50% низинного торфа и NPK (контроль-2).

Результаты фенологических наблюдений показали, что максимальная статистически достоверная прибавка массы корней и зеленой массы растений была получена в варианте с 25% вермикомпоста и составила, соответственно, 31 и 41% в сравнении с контролем-2. Положительный эффект на биомассу огурца обеспечило и 10%-ное внесение вермикомпоста в почву. Этим двум дозам соответствуют и достоверно лучшие показатели количества листьев и цветков (15 и 54% соответственно к контролю-2). Внесение вермикомпоста в дозах свыше 25% привело не только к замедлению роста растений, но и резкому подавлению формирования цветков. Еще большее угнетение роста и развития огурца произошло при его выращивании на чистом непросеянном компосте. Проявление ингибирующего эффекта в вариантах с высокими дозами вермикомпоста, согласно U. Tomati (1988) и N. Aranson (2006) могут быть обусловлены гормоноподобным влиянием экскрементов червей.

Для оценки влияния вермикомпоста на рост и развитие культуры томата в вегетационном эксперименте изучали эффективность нескольких разновидностей органических и торфо-минеральных грунтов («Селигер», «Фарт», «Чародей»), в том числе содержащего вермикомпост грунта «Гарант» и составного торфяного грунта с 25% (по объему) содержанием вермикомпоста. Начиная с четвертой недели наблюдений, максимальными значениями веса сухой зеленой массы растений, площади листовой пластинки, ширины и длины стебля характеризовались растения, выращиваемые на обоих вермикомпост содержащих грунтах. Сопоставление интенсивности прироста биомассы растений и изменения содержания в грунте минерального азота показало, что во всех грунтах, за исключением содержащего 25% вермикомпоста, прирост биомассы растений с течением времени сопровождался уменьшением содержания в грунте подвижных форм азота, т.е. имела место классическая схема выноса питательных элементов из грунта при активно формирующейся биомассе растений. Расчет коэффициентов корреляции содержания в грунте минерального азота и прироста биомассы растений в вариантах опыта показал довольно высокую степень обратной зависимости между данными показателями («Селигер»:  $r_{xy} = -0,69$ ; «Чародей»:  $r_{xy} = -0,63$ ; «Фарт»:  $r_{xy} = -0,81$ ; «Гарант»:  $r_{xy} = -0,49$ ). В грунте с 25%-м содержанием вермикомпоста при длительных экспозициях (1,5-2 месяца) наблюдалось заметное накопление минерального азота, несмотря на активный прирост биомассы а, следовательно, и вынос элементов, что подтверждается довольно высоким значением коэффициента корреляции биомассы и содержания азота в грунте ( $r_{xy} = 0,51$ ). Причиной столь необычного явления может быть очень высокий уровень актуальной (по Виноградскому) активности азотобактера в данном варианте, варьирующего в диапазоне 92 – 99% от максимально возможного для данного грунта, что и обусловило интенсивный приток атмосферного азота в грунт.

**4.3. Эффективность применения вермикомпоста в агроценозах.** Результаты пяти лет полевых испытаний вермикомпоста на дерново-подзолистой легкосуглинистой и серой лесной тяжелосуглинистой почве показали, что наиболее эффективной и экономически оправданной дозой является 6 т/га, по эффективности соответствующая 20 т/га навоза и 40 т/га ТНС. На серой лесной почве прибавка урожая картофеля от внесения 6 т/га вермикомпоста оказалась даже менее затратной (52,7-53,6 руб./ц), чем от 20 т/га навоза (139,3-160,7 руб./ц). Среди исследованных способов применения наиболее эффективным является локальное ленточное внесение, способствующее почти двукратному увеличению урожая картофеля, а также росту содержания в клубнях сухого вещества и крахмала. Вопреки существующим представлениям низкие дозы вермикомпоста оказали слабое последствие на яровую пшеницу.

**4.5. Эффективность почвозащитной технологии Полевого круглогодичного вермикультивирования (ПКВК) в зернопропашном севообороте на дерново-подзолистой легкосуглинистой почве.** Решение проблем биологической рекультивации земель, увеличения количества и улучшения качества сельскохозяйственной продукции при использовании технологии вермикультивирования традиционно предполагает использование конечного продукта вермикультивирования – вермикомпоста, а не самого этого процесса. Между тем, в природе деятельность дождевых червей осуществляется непосредственно в зоне роста корневых систем растений и не существует разделения на процесс и продукт. Чтобы исследовать влияние процесса вермикультивирования, инициированного непосредственно в почве на ее биологические и агрохимические свойства, был предпринят эксперимент, согласно которому в поле, где внедряется технология ПКВК, были нарезаны увеличенные до 70 см почвенные гряды. По центру одних гряд закладывали ленты из вермикомпоста, по центру других – из свежей ТНС, содержащей Калифорнийский гибрид. Поверхность гряд мульчировали смесью соломенной резки и торфяной крошки. ТНС и мульча одновременно служили приманкой для аборигенных навозных и почвенных червей и способствовали инициации процесса вермикомпостирования непосредственно в корнеобитаемой зоне картофеля.

Результаты исследования свидетельствуют, что по всем параметрам наиболее эффективным является вариант с инициированным вермикультивированием (ИВК). Урожай картофеля здесь в 1,5-2 раза выше, чем в варианте с простым внесением вермикомпоста и составляет для сорта Невский – 475 ц/га, для сорта Адретта – 456 ц/га. Максимальное количество микроорганизмов и наибольшее значение их биомассы, а также активности азотфиксации и выделения  $\text{CO}_2$  обнаружено в варианте с ИВК, что свидетельствует о высокой скорости процессов трансформации вносимой в почву ТНС и усилении биологической активности почвы. Большая эффективность приема ИВК по сравнению с простым внесением вермикомпоста обусловлена тем, что свежее органическое вещество ТНС привлекает в почвенную гряду также почвенных червей, в результате чего задействуется весь сложный комплекс мезофауны и микрофлоры почвы. Это приводит к накоплению непосредственно в корнеобитаемой зоне картофеля не только элементов питания, но и разнообразных стимуляторов роста, в значительном количестве образующихся на ранних стадиях вермикультивирования. Кроме того, интенсивная трансформация органического вещества ТНС при сбалансированности микробиологических процессов преобразования органического азота (аммонификация, нитрификация, денитрификация и азотфиксация) в результате совместного воздействия экологически различных групп дождевых червей (почвенных и навозных) способствует положительному балансу гумуса в почве, сводит к минимуму потери азота из агроценоза, обеспечивая экологическую чистоту технологии выращивания картофеля в системе полевого круглогодичного вермикультивирования.

## **5. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ И МЕХАНИЗМЫ РЕМЕДИАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ**

**5.1. Особенности комплексной технологии биоремедиации нефтезагрязненных почв.** Нефтяное загрязнение почв по масштабам проявления и глубине последствий занимает одно из ведущих мест в «рейтинге» экологических проблем современности. Сумма накопленных экологической наукой теоретических и эмпирических данных убедительно доказывает невозможность решения задачи восстановления загрязненных территорий без привлечения всего биологического ресурса почвы и в первую очередь потенциала ее микробного сообщества. Установленные автором основные закономерности микробиологических процессов в нефтезагрязненных почвах, а также факторы и



механизмы, обуславливающие оптимальное течение данных процессов, легли в основу разработанной совместно с НТО «Приборсервис» (Патент РФ № 2245748) технологии биоремедиации почв, загрязненных нефтью. Применяемый в рамках технологии комплекс агромелиоративных мероприятий направлен на максимальное стимулирование активности аборигенной углеводородокисляющей микрофлоры (УОМ) почвы, в том числе и в неблагоприятных почвенно-климатических условиях северных регионов. Особенность технологии состоит в том, что стимулирование активности микрофлоры обеспечивается за счет внесения природных алюмосиликатных минералов – цеолитов, обогащенных необходимым для почвенных микроорганизмов комплексом микроэлементов. Цеолиты, обладающие, благодаря своей высокопористой структуре, большой площадью активной поверхности, обеспечивают одновременно сорбцию УВ нефти и адгезию клеток нефтеусваивающих микроорганизмов. Такое совмещение в одном объеме углеводородного субстрата и агентов его утилизации при наличии в почве достаточного количества азота, фосфора и микроэлементов способствует формированию в загрязненном грунте центров активной деструкции веществ-загрязнителей. Кроме того, используемая в рамках технологии схема внесения минеральных удобрений, разработанная с учетом характера и динамики естественных микробиологических процессов в очищаемой почве, способствует поддержанию этих процессов на максимально высоком уровне, тем самым значительно сокращая сроки очистки почвы и позволяя существенно (более чем в 3 – 4 раза) уменьшить расход дорогостоящих азотных удобрений.

**5.2. Эффективность применения природных цеолитов для ускорения очистки нефтезагрязненных почв.** Применение цеолитов различных месторождений (Шивыртуйского (Красноярский край), Пегасского (Кемерово) и Чанканайского (Казахстан)) для рекультивации дерново-подзолистой легкосуглинистой почвы с 10-15%-й исходной степенью загрязнения нефтью в лабораторных и полевых опытах обеспечило 15–24%-е увеличение степени деструкции нефти по сравнению с контролем без цеолита за 2 месяца рекультивации. Сравнительный анализ эффективности цеолитов данных месторождений показал отсутствие достоверных отличий между ними. Испытания эффективности разных фракций цеолита Шивыртуйского и Пегасского месторождений показали, что наибольшее стимулирующее воздействие на скорость деструкции нефтепродуктов (НП) в почве оказывает фракция цеолита, соответствующая 0,8–2,0 мм.

**5.3. Экологические преимущества системного применения азотных удобрений в микробиологической деструкции нефтяных углеводородов в почве.** Исследование микробиологических процессов в нефтезагрязненной почве показало, что активность УОМ находится в прямой зависимости от интенсивности притока в почву атмосферного азота, осуществляемого азотфиксирующими микроорганизмами (Терещенко и др., 2002). Известно, что внесение даже небольших и средних доз минеральных азотных удобрений приводит к резкому ингибированию процессов биологической азотфиксации.

В модельном опыте 1 исследовали влияние различных *доз и сроков внесения* азотных минеральных удобрений на активность азотфиксирующей микрофлоры и скорость процессов биодеструкции нефти. Вопреки существующим представлениям о стимулирующем влиянии азотных удобрений на углеводородокисляющую микрофлору (УОМ) данные микробиологического анализа почвы выявили обратную зависимость между численностью УОМ в почве и количеством внесенных минеральных удобрений по вариантам опыта. Так, например, наименьшая численность УОМ была зафиксирована в варианте с максимальной стартовой дозой внесения удобрений (1т/га), а наибольшая – в варианте с минимальной стартовой дозой удобрений (150 кг/га) (рис.15 а). Ана-

лиз динамики численности активных клеток азотобактера также свидетельствует об обратной зависимости между данным показателем и стартовой дозой азотных удобрений. При этом максимальная численность на протяжении всего периода наблюдений отмечалась в варианте с минимальной стартовой дозой удобрений. В варианте с максимально высокой дозой азотобактера вовсе не был обнаружен (рис. 15 б).

Применение высокой стартовой дозы удобрений способствует созданию в нефтезагрязненной почве условий активного протекания диссимиляционной нитратредукции и, как следствие, интенсивному выбросу молекулярного азота в атмосферу (рис. 16 а). Если принять во внимание низкий уровень азотфиксации в данном варианте, то можно предположить, что применение больших стартовых доз минеральных удобрений не только не способствует устранению лимитирования почвы по азоту, но и приводит к значительным непроизводительным потерям азота минеральных удобрений вследствие усиленно протекающей денитрификации. При этом одним из основных продуктов денитрификации является закись азота, которая, как известно, входит в состав парниковых газов.

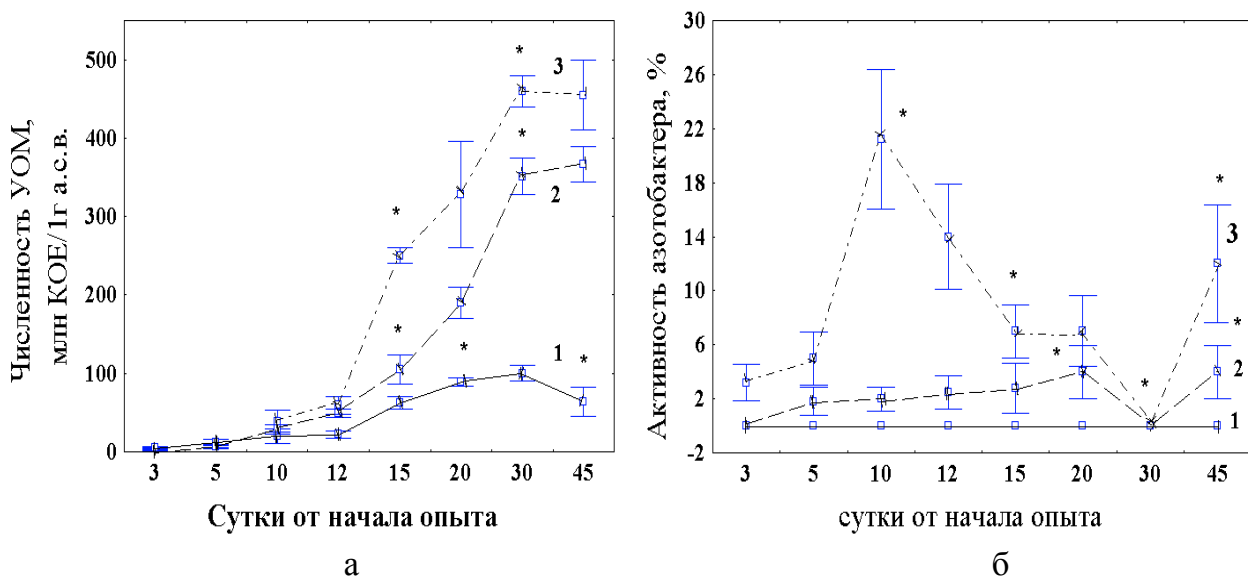


Рисунок 15 – Динамика общей численности УОМ (а) и активности азотобактера (б) в почве вариантов опыта

*Примечание.* 1 – 1-й вариант (1 т/га); 2 – 2-й вариант (250 кг/га + 250 кг/га через 1 месяц); 3 – 3-й вариант (150 кг/га + 150 кг/га через 1 месяц)

Анализ содержания остаточной нефти в почве показал, что уже в начальный период наблюдений в варианте с максимально высокой стартовой дозой удобрений отмечалось довольно резкое снижение содержания НП в почве (рис. 16 б). В вариантах с минимальными стартовыми дозами удобрений снижение содержания НП в начальный период было менее заметным. Однако, начиная примерно с 10-15-х суток опыта, в данных вариантах наблюдалось ускорение темпов биодеструкции нефти, что привело в конечном итоге к довольно существенному снижению содержания НП, в то время как в варианте с максимальной стартовой дозой внесения минеральных удобрений содержание НП оставалось на прежнем уровне. Наибольшая степень деструкции нефти при этом была достигнута в варианте с наименьшей дозой удобрений (рис. 16 б).

Анализ корреляции между степенью деструкции НП и активностью азотобактера в одном случае и между степенью деструкции НП и численностью УОМ в другом показал наличие высокой прямой зависимости между данными показателями с коэффициентами корреляции соответственно 0,99 и 0,94. Корреляция между степенью деструкции НП в почве вариантов опыта, активностью азотобактера и численностью УОМ – с од-

ной стороны и дозой использованных азотных удобрений – с другой, напротив, была отрицательной (–0,95; –0,93 и –0,99 соответственно).

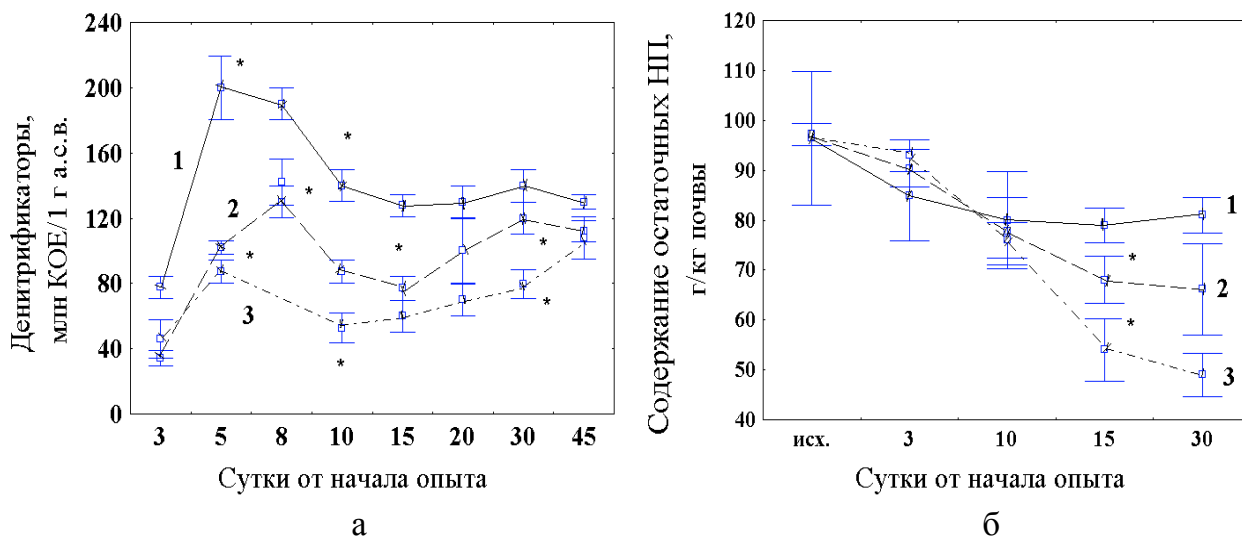


Рисунок 16 – Динамика численности денитрификаторов (а) и содержание остаточных нефтепродуктов (б) в почве вариантов опыта

Примечание. – 1,2,3 – см. рис. 15

Несмотря на то, что азотные минеральные удобрения широко применяются в практике рекультивационных работ, сведений об эффективности той или иной формы удобрений в специальной литературе крайне недостаточно. Тем не менее, еще в ранних работах Ф.Х. Хазиева (1977, 1981) упоминается о различном влиянии аммонийной и нитратной форм азота на активность ряда почвенных ферментов, участвующих в деструкции нефтяных углеводородов.

Для выбора наиболее эффективной **формы азотных удобрений** (нитратной или аммонийной) был предпринят модельный эксперимент 2 с внесением в дерново-подзолистую среднесуглинистую почву с 10%-й степенью загрязнения кальциевой селитры и традиционно применяемых азофоски и аммиачной селитры. Все удобрения применяли в невысоких для практики рекультивации дозах – 300 кг/га д.в., обеспечивших максимальный положительный эффект в предыдущих экспериментах.

Анализ содержания остаточных НП в почве исследуемых вариантов показал, что варианты, где исходно применяли кальциевую селитру, уже с первых суток опыта отличались более высокой скоростью биодеструкции нефти. Спустя 2-е недели от начала опыта в данных вариантах содержание остаточной нефти было в 1,5 раза ниже, чем в вариантах с применением азофоски и аммиачной селитры (64-66% и 32-40% соответственно). Активность азотобактера в вариантах с кальциевой селитрой и численность УОМ также были в 5–6 раз выше, чем в вариантах с применением азофоски и аммиачной селитры. Анализ и обобщение результатов эксперимента позволяет сделать заключение о том, что применение минеральных удобрений, содержащих азот в нитратной форме, таких как кальциевая или калийная селитры, более эффективно, поскольку не оказывает заметного ингибирования активности азотобактера, способствует ускорению темпов биодеструкции веществ-поллютантов и, как следствие, сокращению сроков рекультивационных работ.

Для изучения влияния **быстро и медленно действующих форм азотных удобрений**, а именно: органической (карбамида) и минеральной (аммиачной селитры) на характер микробиологических процессов и скорость очистки дерново-подзолистой среднесуглинистой почвы с 10%-м уровнем загрязнения нефтью был заложен **3-й модельный эксперимент**. Все азотные удобрения вносили исходя из дозы 300 кг

д.в. на 1 га почвы. Для оптимизации фосфорного питания вносили двойной суперфосфат в дозе 150 кг д.в. /га. Цеолит (Пегассин) вносили в дозе 2 т/га. Кроме того, для выяснения возможного механизма стимулирующего воздействия цеолита на ускорение процессов микробиологической деструкции нефти в каждой паре вариантов с селитрой и мочевиной в один из вариантов вносили комплекс солей микроэлементов, который по составу и в количественном отношении приблизительно соответствовал микроэлементному комплексу использованного объема цеолита.

Результаты анализа на содержание остаточных НП в почве вариантов опыта через 2 месяца после его закладки показали, что максимальная степень деструкции была достигнута в вариантах с карбамидом (42,5 и 48,5%). Максимальная численность углеводородоокисляющих микроорганизмов, начиная с 20-х суток опыта, также отмечалась в данных вариантах (рис. 17 а).

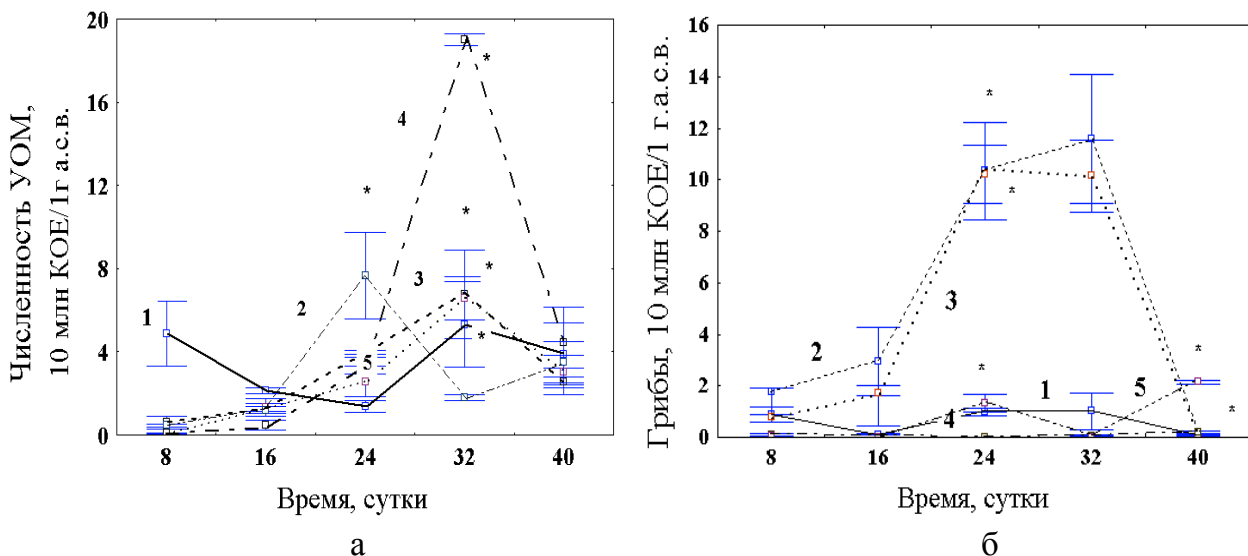


Рисунок 17 – Динамика численности УОМ (а) и низших грибов (б) в почве вариантов опыта

*Примечание.* 1 – Контроль; 2 – Селитра+цеолит; 3 – Селитра+микроэлементы; 4 – Карбамид+цеолит; 5 – Карбамид+микроэлементы

На начальных этапах опыта наибольшим количеством УОМ характеризовался контрольный вариант (без применения удобрений). Максимальная численность УОМ в контрольном варианте может быть обусловлена тем, что в первые сутки опыта здесь отмечалась минимальная степень токсичности почвы. Известно, что внесение высоких доз азотных минеральных удобрений способствует интенсивному разрушению нефти с образованием высокотоксичных продуктов деструкции и подкислению почвы. Данные условия способствуют изменению состава микробного сообщества почвы в сторону увеличения численности микроскопических грибов, большинство из которых также является активными токсинообразователями (Иларионов и др., 2003).

Анализ численности грибов в вариантах опыта показал, что уже в первые 7-10 суток опыта в вариантах с аммиачной селитрой численность грибов в несколько раз превышала их количество в вариантах с карбамидом (рис. 17 б). Высокая численность грибов в вариантах с селитрой обусловлена поступлением в почву больших количеств легкодоступного для грибов аммонийного азота, в результате чего они начинают активно размножаться, продуцируя в больших количествах токсины. При этом органический азот карбамида в чистом виде микроскопическим грибам почти недоступен (Беккер, 1980), а процессы его минерализации под действием протеолитического фермента уреазы в нефтезагрязненной почве протекают крайне медленно по причине затрудненной

аэрации почвы. Данное утверждение подтверждается резким уменьшением в почве, загрязненной нефтью, численности уробактерий, участвующих в разложении карбамида до аммония (рис. 18).

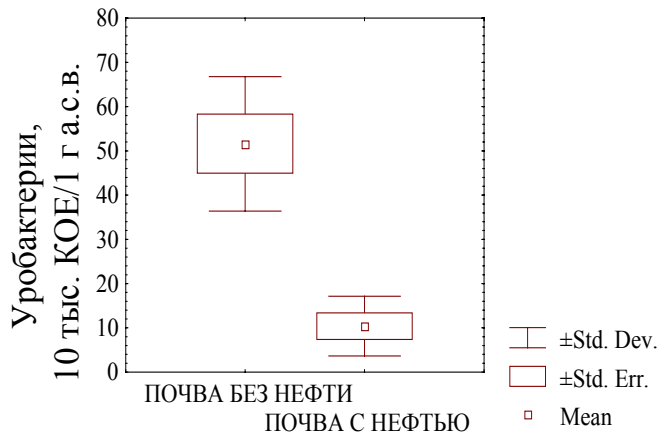


Рисунок 18 - Влияние нефти на численность уробактерий в почве

мида, наилучшие результаты были получены в вариантах с цеолитом (35 и 31; 49 и 43 % деструкции НП соответственно). Особенно заметными различия были в вариантах с карбамидом. Следовательно, высокая биологическая активность цеолита по отношению к УОМ не может быть обусловлена только его микроэлементным составом, а связана со свойствами его кристаллической решетки: высокой удельной поверхностью, хорошо выраженной адгезионной способностью цеолита по отношению к почвенной микрофлоре и значительной емкостью катионного обмена.

Высокая численность грибов в вариантах с селитрой, по-видимому, обусловила и крайне высокий уровень фитотоксичности почвы в данных вариантах. Семена пшеницы, высаженные в почву на 7-10 сутки от начала опыта едва проклюнулись (рис. 19).

Сопоставление данных по степени деструкции нефти в вариантах с цеолитом и комплексом микроэлементов, внесенных в почву в количествах, соответствующих их содержанию в цеолите, показало, что, как и при использовании аммиачной селитры, так и при использовании карба-

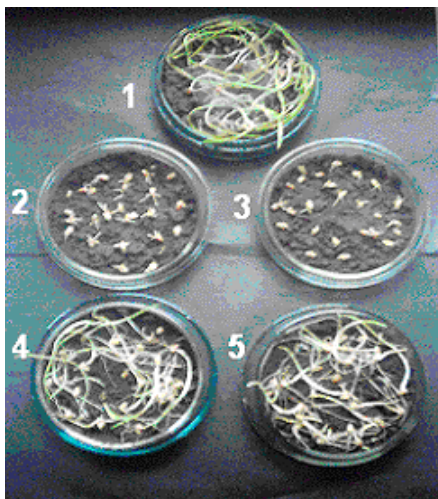


Рисунок 19 – Состояние проростков пшеницы в биотесте на 7-е сутки от начала опыта

*Примечание.* 1 – почва с нефтью без удобрений;  
2 – 3 – варианты с внесением аммиачной селитры;  
4 – 5 – варианты с внесением карбамида

Поскольку предварительные исследования выявили экономическую нецелесообразность и экологическую опасность применения в рекультивационных целях высоких (500 кг/га д.в. и выше) доз азотных удобрений, а также значительно более высокую эффективность медленно действующих органических удобрений по сравнению с минеральными, необходимо было определить наиболее **эффективную форму азотного удобрения при его применении в низких, экологически обоснованных дозах**. Поэтому целью 4-го модельного эксперимента стало изучение эффективности нитратной, аммонийной и органической форм азотных удобрений при биоремедиации дерново-подзолистой легкосуглинистой почвы со средней степенью загрязнения нефтью (80 г

НП/кг почвы). Азотные удобрения вносили в дозе 100 кг д.в. азота на 1 га. Во все варианты кроме контроля внесли цеолит фракции 0,8-2,0 мм в дозе 2 т/га.

Результаты исследований показали, что максимальная степень деструкции нефти была достигнута в вариантах с применением калийной селитры и мочевины и составила соответственно 57,7 и 54,0 %. Уровень очистки почвы от нефти в варианте с внесением аммонийной формы азота (сульфата аммония) оказался не на много выше (31%), чем в контрольном варианте (27%). Высокая эффективность нитратной формы удобрений может быть обусловлена двумя возможными путями утилизации нитрата в микробиологических процессах деструкции углеводородов нефти. В первом случае нитрат используется углеводородокисляющими микроорганизмами в качестве наиболее легко доступного источника азота, во втором – в качестве акцептора электронов, поступающих с органических молекул углеводородов, окисляемых в анаэробных условиях денитрифицирующими микроорганизмами. Присутствие нефти, как известно, создает в почве дефицит свободного кислорода, что делает нитрат энергетически выгодным альтернативным субстратом для денитрификаторов. При этом нужно особо заметить, что большинство денитрификаторов способны усваивать углеводороды в качестве энергетического субстрата (Елинов, 1989; Рахимова и др., 2004). Аммонийную форму азота денитрификаторы могут использовать только после ее окисления в нитрат нитрифицирующими микроорганизмами. Однако, согласно многочисленным экспериментальным данным, приведенным в литературных источниках, процессы нитрификации в нефтезагрязненных почвах протекают крайне медленно или не протекают вовсе из-за частичного анаэробнозиса и высокой токсичности почвы (Odu, 1978; Киреева, 1995; Кураков и др., 2000; Артамонова, 2002).

Выше приведенные объяснения высокой эффективности нитратной формы азотных удобрений подтверждаются данными о численности денитрификаторов в исследованных вариантах опыта, согласно которым максимальная численность этих микроорганизмов, начиная с 18 суток эксперимента, отмечалась именно в варианте с внесением калийной селитры ( $369,4 \pm 98,7$  тыс. кл./1г по сравнению с  $47,2 \pm 8,4$  и  $154,7 \pm 28,7$  тыс. кл. в контроле и варианте с  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  соответственно).

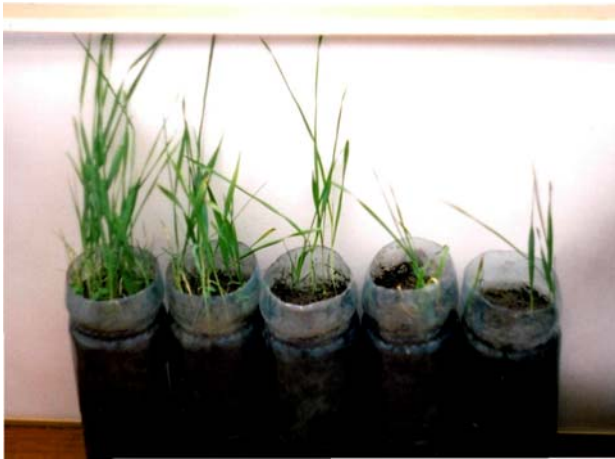
Результаты биотестов с водными вытяжками из почвы свидетельствуют об отсутствии выраженного токсического эффекта от применения всех исследованных форм азотных удобрений. По-видимому, при низких дозах (не более 100 кг/га д.в) внесения минеральных удобрений, форма, в которой находится азот в удобрении, не оказывает столь заметного влияния на уровень фитотоксичности почвы, как это имело место при средних и высоких дозах удобрений (300-500 кг/га д.в. и более). Лишь на завершающих этапах опыта наблюдалось незначительное угнетение корневой системы растений под воздействием аммонийной формы. Менее выраженный токсический эффект в варианте с нитратной формой азота может быть обусловлен тем, что большинство низших грибов предпочитают аммонийные формы азота, тогда как нитрат, по мнению P. Widden (1986) и N.J. Dix, J.Webster (1995), для некоторых микромицетов (например, муконовых) вовсе недоступен.

**5.4. Особенности биологической рекультивации нефтезагрязненных почв с признаками техногенного засоления.** Основными природными факторами, лимитирующими биоремедиацию нефтезагрязненных почв средней полосы России, Поволжья, а также Прикаспийской низменности Казахстана являются острый недостаток почвенной влаги и засоленность большинства степных почв. В случаях, когда к естественному солонцеватому фону добавляется вторичное засоление пластовыми водами, это может значительно снизить эффективность даже самых передовых технологий биологической рекультивации нефтезагрязненных почв.



В основу новой технологической модификации, разработанной автором совместно с НТО «Приборсервис» для засоленных почв, были положены биологические методы: фитомелиорация и стимулирование микробиологической активности очищаемой почвы. Поскольку основной проблемой при проведении фитомелиоративных мероприятий на засоленных почвах является низкая всхожесть семян растений из-за высокого осмотического давления почвенного раствора, были проведены исследования по изучению возможности повышения устойчивости растений путем предпосевной обработки семян (ячменя, люцерны и костреца) бактериальными культурами (*Pseudomonas sp.* и *Azotobacter chroococcum*) и оксигуматом торфа. Техногенное засоление в опыте моделировали внесением в почву комплекса минеральных солей вместе с поливной водой, имитируя состав пластовых вод, используемых на месторождениях Самарской области. Для улучшения физико-химического состава почвы высев семян предваряли традиционным внесением гипса в два приема. Одновременно со вторым внесением гипса в почву внесли навоз КРС и азофоску.

Все исследованные фитомелиоранты по эффективности можно расположить в следующий убывающий ряд: ячмень > кострец > люцерна. Наилучшие показатели общей биомассы трав были получены в вариантах с предпосевной обработкой семян бактериальными культурами (БК) (рис. 21).



Вар-ты:	3	4	5	1	2
Сухая масса, г	1,29	0,95	0,63	0,60	0,57

Рисунок 21 – Показатели роста зеленой массы трав

Применение бактериальных культур путем внесения их в адсорбированном состоянии на цеолите, в отличие от непосредственной предпосевной обработки семян, не обеспечило достоверного увеличения зеленой массы растений. Вероятно, в условиях повышенного засоления бактерии могут оказывать протекторное воздействие только при непосредственном контакте с прорастающим семенем, создавая своеобразный защитный экран и облегчая транспорт ионов в клетки корня в условиях повышенного осмотического давления почвенного раствора.

Анализ характера распределения солей в слое почвы после 2 месяцев наблюдений выявил признаки вертикальной миграции солей во всех вариантах опыта за исключением контроля. В целом применение трав способствовало заметному ускорению процессов рассоления почвы. Наибольшие показатели промывания сульфатов и натрия были установлены для вариантов, где применяли предпосевную обработку семян бактериальными культурами (табл. 3).

Математическая обработка экспериментальных данных показала высокую степень корреляции ( $r_{xy} = 0,89$ ) между показателями биомассы растений и интенсивностью промывания сульфатов по вариантам опыта. Поскольку основным источником сульфат-ионов в модельном опыте был внесенный гипс, высокое содержание в почве сульфатов и их активная миграция в нижние слои почвы свидетельствует об эффективном замещении ионов натрия в ППК на кальций гипса и связывании натрия сульфатом. Расчет коэффициента корреляции также показал довольно сильную зависимость ( $r_{xy} = 0,74$ ) между интенсивностью промывания натрия и биомассой трав по вариантам опыта, что

подтверждает высказанное выше предположение об эффективности приема внесения гипса совместно с высевом бактеризованных семян при интенсивном поливе.

Таблица 3 – Показатели интенсивности промывания минеральных солей (отношение содержания солей в нижнем и верхнем слоях почвы)

№ п/п	Вариант	CL <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Na <sup>+</sup>
0	Контроль (фон)	0,74	0,92	0,91
1	Фон + необработанные семена	1,13	0,94	1,03
2	Фон + семена, обработанные оксигуматом	1,21	1,05	0,96
3	Фон + семена, обработанные БК	1,11	1,16	1,11
4	Фон + семена, обработанные БК и оксигуматом	1,00	1,13	1,24
5	Фон + необработанные семена + БК на цеолите	1,10	0,98	1,12

Таким образом, результаты лабораторных и полевых испытаний свидетельствуют о том, что внедрение в практику рекультивационных работ схемы агротехнических мероприятий, учитывающей основные факторы и механизмы микробиологической деструкции нефтяных углеводородов, способно обеспечить эффективную биоремедиацию нефтезагрязненных почв в короткие сроки и без дополнительных затрат на дорогостоящие минеральные удобрения и препараты нефтеокисляющих бактерий.

## **6. ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ АНТРОПОГЕННО НАРУШЕННЫХ ПОЧВ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОЧВОЗАЩИТНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ**

**6.1. Критерии разнообразия микробного сообщества почвы.** Одним из основных вопросов современной экологической науки становится возможность оценки и прогнозирования изменений, происходящих в целинных почвах после их вовлечения в промышленное и сельскохозяйственное освоение. Для этого необходимо разработать систему критериев, позволяющую судить о степени деградации почвы как основного элемента любой наземной экосистемы под влиянием антропогенного воздействия. Кроме того, весьма актуальным является вопрос поиска критериев, позволяющих оценить эффективность конкретных почвозащитных агротехнологий и технологий биоремедиации антропогенно-нарушенных почв. Данные критерии также могут быть применимы и для оценки качества используемых для улучшения экологических характеристик почвы различных биологически активных органических субстратов, таких, например, как вермикомпост.

Для соблюдения принципа универсальности поиск и проверку критериев проводили на 2-х типах почвы (дерново-подзолистой и черноземе южном), подвергнутым таким видам антропогенной нагрузки, как интенсивное сельскохозяйственное использование и нефтяное загрязнение. Для оценки влияния на почву различных агротехнических приемов и эффективности почвозащитных технологий исследовали микробиологические свойства малогумусной дерново-подзолистой почвы, которая в рамках 10-ти летнего полевого эксперимента находилась под воздействием систем обработки, обуславливающих противоположные стратегии ее трансформации – от деградации до гумусонакопления. При этом деградацию гумусового слоя почвы вызвала отвальная вспашка с внесением полного минерального удобрения N<sub>60</sub>P<sub>60</sub>K<sub>60</sub> без использования ОУ, которая за 10 лет привела к снижению содержания гумуса с 1,5% до 1,19%. Достоверное увеличение запасов гумуса с 1,5% до 2,04% и увеличение соотношения С<sub>гк</sub>/С<sub>фк</sub> с 0,8 до 1,1 обеспечила безотвальная вспашка почвы с применением почвозащитной технологии ПКВК, одним из элементов которой является интродукция в почвенную



гряду дождевых червей одновременно с внесением 50 т/га ТНС. В качестве эталона сравнения исследовали свойства целинной ненарушенной дерново-подзолистой почвы под лесом.

В настоящее время разработан достаточно широкий перечень различных показателей состояния микробного сообщества почвы, большинство из которых является критериями уровня биоразнообразия. Изучение микробных сообществ агро- и техногенно-трансформированных почв позволило автору выявить ряд наиболее значимых критериев видового разнообразия микробоценоза: 1. **Индекс разнообразия Симпсона**, рассчитываемый для микроорганизмов ризосферы в целом, а также отдельно для таких экологически важных физиологических групп как азотфиксаторы и фосфатмобилизующие микроорганизмы; 2. Хорошо выраженный ***K-тип экологической стратегии*** микробного сообщества ризосферы – для целинных, ненарушенных почв; 3. Высокие значения **коэффициента *RS/RP*** (численность микрофлоры в ризосфере/ в ризоплане) – для почв, вовлеченных в сельскохозяйственное использование.

**6.2. Микробиологические критерии уровня взаимосвязи в системе «почва-растение».** Микробиологическое исследование ризосферы многолетних трав, возделываемых в системе ПКВК, позволило установить ряд микробиологических критериев уровня взаимосвязей в системе «почва-растение»: 1. Соотношение численности микроорганизмов в ризосфере и почве, непосредственно прилегающей к ризосфере; 2. Соотношение индексов разнообразия Симпсона, рассчитываемых для микробных сообществ ризосферы и прилегающей к ризосфере почвы; 3. Соотношение суммарных показателей ростостимулирующей активности бактериальных изолятов рода *Pseudomonas*, выделяемых из зоны ризосферы и прилегающей к ризосфере почвы; 4. Частота встречаемости микориз и степень микотрофности корней многолетних трав.

**6.3. Микробиологические критерии степени уравновешенности процессов в почве и степени замкнутости круговорота элементов.** Поиск наиболее значимых критериев экологической устойчивости почвы показал, что наиболее информативными являются не структурные параметры микробного сообщества почвы, а некоторые его динамические характеристики. Поскольку известно, что для микробоценоза почвы одним из самых агрессивных элементов является азот, было выдвинуто предположение о том, что о степени устойчивости микробоценоза конкретной почвы можно судить по динамическим показателям реакции микробоценоза на избыток минерального азота. При этом микробоценоз почвы рассматривается как единая система, устойчивость которой обусловлена наличием прямых и обратных связей. Среди наиболее значимых были выделены следующие критерии:

1. **Степень реактивности** микробного сообщества почвы, которая определяется скоростью микробиологических процессов, регулирующих содержание азота в почве, в ответ на внесение в почву избытка минерального азота. В соответствии с данным критерием наибольшей устойчивостью будет обладать почва, характеризующаяся максимальным ускорением микробиологических процессов, направленных на выброс азота из системы, т.е. нитрификацию и денитрификацию и, напротив, минимальной интенсивностью процессов, обуславливающих приток азота в систему извне, например, азотфиксации. Другими словами микробоценоз такой почвы будет более сбалансирован по ключевым функциональным группам, обеспечивающим экологическую устойчивость почвы как равновесной системы.

2. **Характер изменения трофической стратегии** микробоценоза почвы по отношению к таким источникам углерода как гумус и свежие растительные остатки спустя 1-2 месяца после внесения в почву избытка минерального азота.

Для проверки работы критериев в рамках модельного лабораторного эксперимента исследовали характер и скорость реакции почвенного микробоценоза на внесение в почву высоких доз азотосодержащего удобрения (100, 200 и 300 кг/га д.в.). Образцы почвы отбирали из вариантов вышеописанного 10-ти летнего полевого опыта с применением технологии ПКВК, а также из чернозема южного (Самарская обл.), более 10 лет находящегося под воздействием нефтяного загрязнения и вовлеченного в сельскохозяйственное использование. Характер реакции микробного сообщества почвы определяли путем анализа изменения численности микроорганизмов основных физиологических групп, участвующих в цикле превращения азота (азотфиксаторов, нитрификаторов, денитрификаторов), а также деструкторов основных источников углерода в почве, т.е. целлюлозы и гумуса.

Результаты исследований показали, что наибольшей скоростью реакции на внесение избытка азота отличаются целинные почвы, независимо от типовой принадлежности, в которых было зафиксировано наиболее резкое снижение численности активных клеток азотобактера. Наименьшей скоростью реакции характеризуются: в случае с дерново-подзолистой почвой – вариант с отвальной вспашкой без применения ОУ (Отв. обр-ка без ОУ); в случае с черноземом южным – нефтезагрязненная почва. Анализ активности нитрификации показал, что максимальное увеличение (более чем в 50 раз) содержания нитратного азота была отмечено в варианте целинной дерново-подзолистой почвы, а минимальное (в 21 раз) – в варианте без применения органических удобрений при отвальной обработке почвы. Микробиологический анализ показал, что максимальным ростом численности денитрификаторов также отличались целинные почвы.

Для проверки 2-го микробиологического критерия, а именно – *изменения трофической стратегии* микробоценоза почвы в отношении двух основных источников углерода исследовали изменение численности целлюлозолитической и гумусразрушающей микрофлоры в почве вариантов модельного опыта до внесения избытка азота и спустя 1,5 месяца после внесения.

Анализ реакции микробного сообщества агрогенно-трансформированной дерново-подзолистой почвы показал, что избыток минерального азота приводит к заметному увеличению количества деструкторов гумуса в вариантах с отвальной обработкой, как в случае применения удобрений, так и без них. Целинная почва отличалась наименьшими показателями численности данной группы микроорганизмов, возможно из-за хорошо работающего механизма выброса излишков минерального азота с нитрификацией. В варианте с инициированным вермикультивированием (Лок. обр-ка + ИВК) численность деструкторов гумуса после внесения азота увеличилась незначительно. Возможно, это обусловлено тем, что дождевые черви в целом способствует процессам гумификации и в особенности увеличению фракции нерастворимых гуматов кальция, которые в значительно меньшей степени доступны деструктивной активности микроорганизмов (рис. 22 б).

В черноземе южном наиболее заметно (более чем в 25 раз) количество деструкторов гумуса увеличилось в почве, загрязненной нефтью. В почве, занятой под пашню, численность данной группы микроорганизмов возросла в 14 раз. В целинной почве численность деструкторов гумуса увеличилась в среднем всего в 2 раза (рис. 22 а). Резкое увеличение количества гумусразрушающей микрофлоры в нефтезагрязненной почве, вероятнее всего, связано с тем, что присутствие нефтепродуктов и избыток внесенного азота обусловили вспышку численности углеводородокисляющих микроорганизмов, большинство из которых способно продуцировать ферменты (пероксидазы, полифенолоксидазы и т.п.), субстратом для которых могут служить, в том числе и вещества гумусовой природы. Возможно, многие нефтеокисляющие микроорганизмы способны использовать в качестве энергетического субстрата также и гумус почвы.

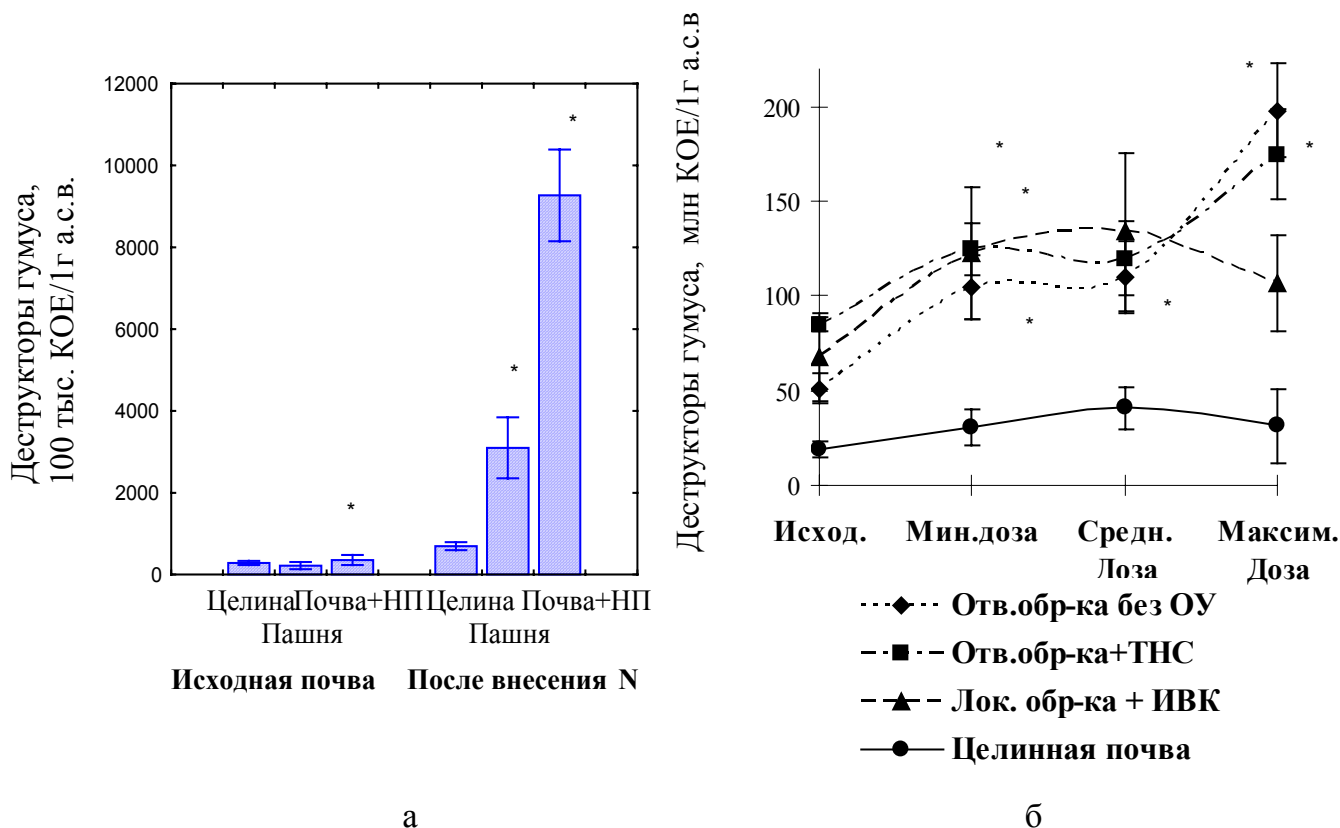


Рисунок 22 – Изменение численности деструкторов гумуса в черноземе южном (а) и в дерново-подзолистой почве (б) после внесения азота в различных дозах

Внесение минерального азота в той или иной степени привело к увеличению численности разрушителей целлюлозы во всех вариантах дерново-подзолистой почвы за исключением варианта с отвальной обработкой без применения органических удобрений (рис. 23 б). Максимальное увеличение численности целлюлозолитической микрофлоры было отмечено в вариантах с внесением ТНС, независимо от способа обработки. Следовательно, отвальная обработка почвы без применения органических удобрений приводит к увеличению в составе микробного сообщества почвы микроорганизмов, использующих в качестве источников углерода преимущественно гумус, а не свежие растительные остатки. Это полностью соответствует сведениям о значительном сокращении запасов гумуса в почве данного варианта.

Внесение избытка азота в исследуемые почвенные пробы чернозема южного привело к заметному (более чем в 2 раза) увеличению численности разрушителей целлюлозы в целинной почве, и, напротив, к резкому сокращению этой группы микроорганизмов в нефтезагрязненной почве (рис. 23 а). Вероятно, длительное присутствие в почве углеводов обусловило глубокую перестройку состава микробиоценоза почвы, которое выразилось в увеличении доли углеводородокисляющих микроорганизмов и деструкторов гумуса и вытеснении целлюлозоразрушающей микрофлоры.

С экологической точки зрения подобная трансформация почвенного микробиоценоза может привести к быстрой деградации почвы и резкому снижению ее не только актуального, но и потенциального плодородия. Высокие дозы азота, вопреки ожиданиям, привели к почти двукратному сокращению численности разрушителей целлюлозы и в пахотной почве, что также свидетельствует о нарушениях в структуре микробного сообщества.

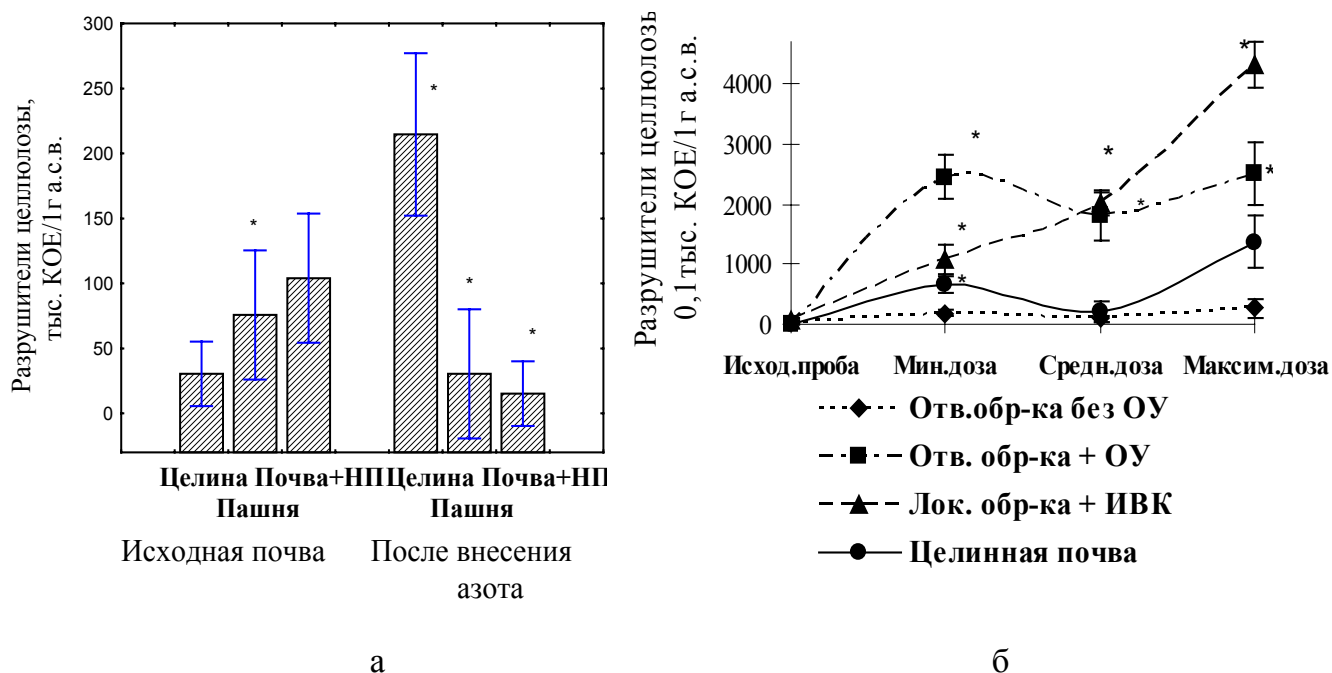


Рисунок 23 – Изменение численности разрушителей целлюлозы в черноземе южном (а) в дерново-подзолистой почве (б) после внесения азота в различных дозах

3. В качестве 3-го наиболее значимого критерия был предложен динамический критерий *скорости круговорота азота и степени его замкнутости* в почвенной экосистеме. Данный критерий можно использовать также в качестве показателя уровня биологической активности конкретных органических удобрений. При этом, как показали исследования, биологическую активность можно рассматривать как результирующую динамических характеристик микробного сообщества почвы. Биологически активные удобрения способствуют резкому ускорению круговорота азота (и углерода) в системе «почва-растение-атмосфера» и, соответственно, повышению степени замкнутости круговорота элементов.

Для проверки данного микробиологического критерия проводили сравнительное исследование скоростей противоположно направленных микробиологических процессов, обеспечивающих, с одной стороны, приток азота в почву за счет азотфиксации, с другой – его выброс в атмосферу в ряду сопряженных процессов нитрификации-денитрификации. Для запуска микробной сукцессии использовали прием внесения в почву расчетных количеств (выровненных по азоту) двух видов органических удобрений, сходных по составу химических компонентов, но отличающихся по структуре и реактивности микробных сообществ, а именно: свиного навоза и полученного после его переработки вермикомпоста.

Как известно при оценке актуальной активности азотобактера (по Н.С. Виноградскому, 1952) основной методической проблемой является отсутствие четкой зависимости между показателями роста бактерий на безазотистой питательной среде и реальным уровнем азотфиксации. Хроматографический метод для данных исследований также не подходит, поскольку отличается нестабильностью и требует не менее получаса для одной точки определения, в то время как скорость реакции микробного сообщества может измеряться в минутах. Для преодоления вышеуказанных трудностей был использован методический прием изучения не статических показателей актуальной активности азотобактера, получаемых при однократном анализе, а динамических свойств популяции азотобактера, определяемых в серии измерений с очень коротким интервалом времени (15 мин), в целом, не превышающим среднего времени генерации азотобактера – 1,5-2 часа. В подобных условиях быстрое возрастание актуальной активности азотобактера

на среде без азота будет обусловлено не ростом общего количества клеток, а увеличением доли бактерий, перешедших к активной азотфиксации.

Расчет скорости реакции азотобактера в дерново-подзолистой почве в ответ на внесение вермикомпоста и навоза, проводимый после линейной аппроксимации кривой роста, показал, что в первом случае скорость составила 1,1%/мин, а во втором – 0,15%/мин. Следовательно, внесение вермикомпоста обеспечивает более чем 7-кратное ускорение процессов азотфиксации по сравнению с внесением навоза. Различия в линейной скорости прироста активных клеток азотобактера в вариантах с вермикомпостом (3,05%/мин) и навозом (0,48%/мин) на черноземе южном были менее существенны, вероятно, из-за высокой численности азотобактера в самой почве.

Внесение в дерново-подзолистую почву вермикомпоста обусловило также значительно более быстрый рост численности денитрификаторов, чем внесение навоза. Скорость прироста популяции денитрификаторов в почве после внесения вермикомпоста была почти в 4 раза выше, чем после внесения навоза и составила соответственно 0,16 клеток/мин и 0,04 клеток/мин. Различия в реакции микробного сообщества чернозема южного на внесение вермикомпоста и навоза оказались еще более существенными: 0,27 клеток/мин в первом случае и 0,02 клеток/мин – во втором.

Таким образом, результаты исследований динамических свойств микробных сообществ почвы после внесения вермикомпоста и навоза свидетельствуют о том, что использование вермикомпоста в качестве органического удобрения способствует ускорению как процессов притока азота в почву, так и процессов его выброса в атмосферу. Вероятнее всего этому способствуют динамические свойства микробного сообщества самого вермикомпоста. Ускоряя противоположно направленные процессы поступления азота в почву и его удаления, микробное сообщество вермикомпоста тем самым ускоряет биологический круговорот азота в системе «почва-атмосфера». В связи с этим закономерно возникает вопрос о том, каким образом подобное ускорение микробиологических процессов, задействованных в цикле азота, влияет на рост и развитие растений.

Анализ показателей вегетативного роста пшеницы в опыте свидетельствует о том, что внесение навоза обуславливает более высокие показатели всхожести растений (табл. 4).

Таблица 4 – Показатели всхожести, зеленой массы и содержания общего азота в зеленой массе растений в модельном опыте

Определяемый показатель	Чернозем южный		Дерново-подзолистая почва	
	вермикомпост	навоз	вермикомпост	навоз
Всхожесть, %	89,2±1,5	100,0±3,6	86,4±2,8	95,0±5,1
Зеленая масса 1-го проростка, мг	16,2±1,2	16,0±0,7	12,9±0,9	12,8±1,3
Общий азот в зеленой массе, % от а.с.в.	4,8±0,2	4,6±0,1	4,7±0,1	4,4±0,1
Содержание мин. азота в почве (NO <sub>3</sub> +NH <sub>4</sub> ), мг/кг а.с.в.	—	—	17,3±3,1	28,2±4,4

Однако, несмотря на это, в вариантах с вермикомпостом как на дерново-подзолистой почве, так и на черноземе южном средняя масса 1-го проростка и содержание общего азота в биомассе были несколько выше, чем в вариантах с навозом. При этом максимальное увеличение содержания минерального азота в самой почве было

отмечено в варианте с навозом (табл. 4). Следовательно, применение вермикомпоста в качестве органического удобрения способствует преимущественному депонированию азота в биомассе растений, а не в почве.

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о том, что внесение вермикомпоста в почву способствует ускорению круговорота азота, осуществляемого микроорганизмами, задействованными в циклах превращения этого элемента. Преимущественное накопление азота в биомассе растений, а не в виде легкодоступных форм в почве, имеет важное экологическое значение, поскольку способствует аккумуляции азота в составе органического вещества, а значит в дальнейшем и в составе гумуса. С другой стороны, преимущественное депонирование азота удобрений в растительной биомассе существенно снижает риск развития сукцессии гумусразрушающих микроорганизмов из-за сокращения количеств доступных для данной микрофлоры источников азота в почве.

## ВЫВОДЫ

1. Дождевой червь посредством своеобразного «селективного отбора» микроорганизмов-симбионтов оказывает значительное влияние на формирование структуры микробного сообщества копролитов. При этом в готовом вермикомпосте заметно увеличивается доля флюоресцирующих бактерий рода *Pseudomonas*, актиномицетов, микроорганизмов, участвующих в трансформации органических и минеральных фосфатов, нитрификаторов, целлюлозолитической микрофлоры, а также азотобактера. Супрессивное воздействие дождевого червя на патогенную микрофлору значительно улучшает санитарное состояние вермикомпоста.

2. Навозные черви (*epigeic*) в целом отличаются от почвенных червей (*endogeic*) стимулированием процессов аммонификации, минерализации азотсодержащих органических веществ, а также нитрификации. В копролитах почвенных червей активнее протекает микробиологическая деструкция лигноцеллюлозного комплекса органического субстрата. Кроме того, почвенные черви являются активными стимуляторами несимбиотической азотфиксации, в десятки раз превосходя по этому показателю навозных червей.

3. В контролируемых условиях вермикультивирования колебания численности в органическом субстрате бактерий и низших грибов носят выраженный гармоничный характер с периодом колебаний, составляющим 13-15 суток. Поскольку основу микробной сукцессии на легкодоступных источниках углерода в созревающем вермикомпосте составляют представители г-стратегии (как среди бактерий, так и среди микромицетов), ведущую роль в возникновении автоколебаний начинают играть внутри- и межпопуляционные взаимодействия конкурирующих за субстрат быстрорастущих форм микроорганизмов.

4. Высокая биологическая активность вермикомпоста обусловлена присутствием в его составе стимуляторов роста как аминной-аминокислотной, так и гумусовой природы, в первую очередь фульвокислот. Динамика ростостимулирующей активности вермикомпоста имеет хорошо выраженный колебательный характер и в большей степени определяется метаболической активностью микрофлоры самого субстрата, а не червя. Влияние червей выражается в стимулировании жизнедеятельности бактерий за счет продуцирования протеолитических экзоферментов и, соответственно, в увеличении абсолютных показателей биологической активности вермикомпоста по сравнению с исходным органическим субстратом.

5. Фунгистатическая активность вермикомпоста обусловлена структурно-функциональной организацией его микробного сообщества, в частности высокой численностью в нем бактерий рода *Pseudomonas*, отличающихся повышенной супрессив-

ной активностью, а также наличием ослабленных форм фитопатогенных грибов, в частности рода *Fusarium*, стимулирующих формирование у растений системной неспецифической устойчивости к агрессивным штаммам грибов. Основным механизмом, определяющим высокую супрессивную активность *Pseudomonas* в вермикомпосте, является индукция активности бактерий динамическими характеристиками их популяции и сообщества низших грибов, а именно: цикличностью численности бактерий и грибов, обуславливающей периодические всплески плотности популяций, и, как следствие, обострение внутри- и межпопуляционной конкуренции за субстрат. При этом уровень фунгистатической активности *Pseudomonas* не зависит от типа питания гриба.

6. Эффективность приема интродукции в почву технологичных навозных червей обусловлена сбалансированностью микробиологических процессов трансформацией органического вещества ТНС благодаря совместному взаимодополняющему воздействию навозных и почвенных червей. Почвозащитная технология ПКВК способствует повышению как эффективного, так и потенциального плодородия почвы, а также улучшает ее экологические параметры, предотвращая загрязнение окружающей среды нитратами и снижая газообразные потери азота из агроценоза.

7. Биологическая активность природных цеолитов по отношению к нефтеекисляющим и азотфиксирующим микроорганизмам определяется как микроэлементным составом минералов, так и свойствами их кристаллической решетки: высокой удельной поверхностью, хорошо выраженной адгезионной способностью по отношению к почвенной микрофлоре и значительной емкостью катионного обмена. Цеолиты, обладающие большой площадью активной поверхности, обеспечивают одновременно сорбцию углеводородов нефти и адгезию клеток микроорганизмов. Такое совмещение в одном объеме углеводородного субстрата и агентов его утилизации при достаточном количестве биогенных элементов способствует формированию в загрязненной почве центров активной деструкции веществ-загрязнителей.

8. В условиях техногенного загрязнения почв нефтью ведущим фактором биологической деструкции углеводородов в почве являются микробиологические процессы, связанные с циклом превращения азота – азотфиксация и денитрификация. При этом наиболее эффективной формой азота является нитратная, обеспечивающая двойной путь использования азота микроорганизмами, участвующими в деструкции углеводородов нефти: в качестве источника азота и в качестве акцептора электронов в процессах денитрификации. Традиционно широко используемые в рекультивационной практике аммонийные формы азотных удобрений наименее эффективны, так как способствуют массовому развитию в почве микроскопических грибов и повышению фитотоксичности почвы. Высокая эффективность органических форм азота при биоремедиации обусловлена медленным течением процессов аммонификации в условиях нефтяного загрязнения и дозированным высвобождением аммония, исключая массовое размножение грибов и подавление процессов азотфиксации.

9. Среди установленных критериев экологической устойчивости почвы и эффективности почвозащитных технологий наиболее значимыми являются критерии, основанные не на структурных, а на динамических характеристиках микробного сообщества почвы: характер изменения трофической стратегии микробиоценоза почвы в отношении таких источников углерода как гумус и свежие растительные остатки в ответ на внесение в почву избытка минерального азота; динамический критерий скорости круговорота азота в системе «почва-растение-атмосфера», определяемый как скорость противоположно направленных микробиологических процессов цикла азота, таких как азотфиксация и денитрификация, (данный критерий также применим для оценки уровня биологической активности почвы и органических удобрений).

## *Основные работы, опубликованные по теме диссертации*

### *Монографии:*

1. **Терещенко Н.Н.** Эколого-микробиологические аспекты вермикюльтивирования. – Новосибирск: Изд-во Россельхозакадемии. Сиб. отд-ние, 2003. – 166с.
2. Середина В.П., Андреева Т.А., Алексеева Т.П., Бурмистрова Т.И., **Терещенко Н.Н.** Нефтезагрязненные почвы: свойства и рекультивация. – Томск: Изд-во Томского Политехнического ун-та, 2006. – 269с.

### *Учебные пособия:*

1. **Терещенко Н.Н.** Биоудобрения на основе микроорганизмов. – Томск: Изд-во Томского ун-та, 2003. – 60с.

### *Патенты:*

1. Патент РФ 2137559. МПК 6B09C 1/10 Способ очистки почвы от загрязнения нефтью и нефтепродуктами / Т.П. Алексеева, **Н.Н. Терещенко**, В.Д. Перфильева, Т.И. Бурмистрова, Л.Д. Стахина, Ю.В. Савиных. опубл. 20.09.1999. – 4 с.
2. Патент РФ 2204900. МПК 7A01K67/033 Способ полевого круглогодичного вермикюльтивирования / Г.М. Чичерин, **Н.Н. Терещенко**. опубл. 27.05.2003. – 4 с.
3. Патент РФ 2238807. МПК 7B09C 1/10 Состав для очистки почвы от нефтяных загрязнений (варианты) / Т.П.Алексеева, Т.И. Бурмистрова, В.Д. Перфильева, А.И. Григорьев, **Н.Н. Терещенко**. опубл. 27.10.2004. – 5 с.
4. Патент РФ 2245748 МПК 7B09C 1/10 Способ рекультивации почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами /**Н.Н. Терещенко**, С.В. Лушников. опубл. 10.02.2005г. –4с.

### *Научные статьи:*

1. **Терещенко Н.Н.**, Наплекова Н.Н. Взаимоотношения между микрофлорой пищеварительного тракта дождевого червя и сапрофитными микроорганизмами перерабатываемого им торфонавозного субстрата // Торф и сельское хозяйство. Сборник научных трудов СибНИИТ. – Томск, 1994. – С. 134-141.
2. **Терещенко Н.Н.**, Коурова С.В. Использование отработанных соломенных субстратов после грибов в тепличном хозяйстве // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 1997. – № 4. – С. 22-24.
3. **Tereshchenko N.N.** Peat - containing vermicompost is the ecologically pure hothouse soil. Peat in Horticulture: Proceeding of the international Peat conference. – Amsterdam, 1997. – P.23-26.
4. Alexeeva T.P., **Tereshchenko N.N.**, Perfilieva V.D., Savinikh Y.V., Stakhina L.D. Peat as the perspective material for ameliorant obtaining for oil-polluted soils // First Russian Setae symposium on risk assessment for environmental contamination. – St. Petersburg, 1998. – С.21.
5. Alexeeva T.P., **Tereshchenko N.N.**, Perfilieva V.D. Activity of peat hydrocarbon oxidizing microflora // First Russian Setae symposium on risk assessment for environmental contamination. – St. Petersburg, 1998. – С. 19.
6. Алексеева Т.П., **Терещенко Н.Н.**, Бурмистрова Т.И., Савиных Ю.В., Стахина Л.Д. Использование торфа для ускорения деструкции нефти в почве // Контроль и реабилитация окружающей среды: Материалы V Междунар. симпозиума. – Томск, 1999. – С. 168.
7. Алексеева Т.П., Бурмистрова Т.И., **Терещенко Н.Н.**, Панова И.И. Перспективы использования торфа для очистки нефтезагрязненных почв // Биотехнология. – 2000. – №1. – С. 58-65.



8. **Tereshchenko N.N.** The advantage of peat-containing vermicompost application as a component of hothouse soil in comparison with native peat // Sustaining Our Peatlands: Proceeding of the 11<sup>th</sup> International Peat congress. – Finland, 2000. – С.112-113.
9. Кравец А.В., Перченко Н.А., **Терещенко Н.Н.**, Касимова Л.В., Порываева О.В. Изменение физиологической и микробиологической активности дерново-подзолистой почвы под влиянием нового биоудобрения из торфа // Энерго- и ресурсосберегающие технологии в земледелии аридных территорий: Материалы Междунар. научн.-практич. конф. – Барнаул, 2000. – С. 111-115.
10. **Стахина Л.Д., Савиных Ю.В., Панова И.И., Алексеева Т.П., Бурмистрова Т.И., Терещенко Н.Н.** Биодеструкция нефтяных загрязнений под действием микроорганизмов торфа // **Нефтепереработка и нефтехимия.** – 2001. – № 5. – С. 57-61.
11. **Терещенко Н.Н.,** Кравец А.В., Чичерин Г.М. Влияние интродукции дождевых червей совместно с внесением органических удобрений на биологическую активность дерново- подзолистой почвы // Современные проблемы почвоведения в Сибири: Материалы Междунар. научн. конф., посвященной 70-летию образования кафедры почвоведения ТГУ. – Томск, 2001. – С. 450-453.
12. **Терещенко Н.Н., Лушников С.В., Пышьева Е.В.** Рекультивация нефтезагрязненных почв // **Экология и промышленность России.** – 2002. – №10. – С. 17-20.
13. **Терещенко Н.Н.,** Тучак В.Н. Характер и интенсивность микробиологических процессов в профиле вермигряд // Торф в сельском хозяйстве: Сборник научных трудов СибНИИТ. – Томск, 2002. – С. 104-107.
14. **Терещенко Н.Н., Чичерин Г.М.** Влияние полевого вермикультивирования на свойства и биологическую активность почвы // **Почвоведение.** – 2002. – № 8. – С. 1010-1015.
15. Алексеева Т.П., Бурмистрова Т.И., **Терещенко Н.Н.,** Перфильева В.Д. Перспективы использования торфа для ускорения деструкции нефти в почве // Торф в сельском хозяйстве: Сборник научных трудов СибНИИТ. – Томск, 2002. – С. 113-121.
16. Бурмистрова Т.И., Алексеева Т.П., **Терещенко Н.Н.,** Перфильева В.Д. Использование торфяных мелиорантов для реабилитации почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: Доклады Всероссийского семинара. – Барнаул, 2002. – С. 303-304.
17. **Терещенко Н.Н., Наплекова Н.Н.** Влияние различных экологических групп дождевых червей на интенсивность азотфиксации // **Известия РАН сер. Биологическая.** – 2002. – № 6. – С. 763–768.
18. **Терещенко Н.Н., Лушников С.В.** Биологическая азотфиксация как фактор ускорения микробиологической деструкции нефтяных углеводородов в почве и способы ее стимулирования // Биотехнология: состояние и перспективы развития: Материалы 2-го Московского Междунар. Конгресса. – Москва, 2003. – ч.1. – С. 289.
19. Алексеева Т.П., Бурмистрова Т.И., **Терещенко Н.Н., Перфильева В.Д., Стахина Л.Д.** Биодеградация нефти и нефтепродуктов в почве с использованием мелиорантов на основе активированного торфа // **Химия растительного сырья.** – 2003. – № 3. – С. 69-72.
20. **Терещенко Н.Н.,** Бубина А.Б. Влияние интродукции штамма *Pseudomonas sp.* В-6798 на микробиологические и ростостимулирующие свойства вермикомпоста // Высокие технологии добычи, глубокой переработки и использования озерно-болотных отложений: Материалы Междунар. научн.-практ. конф. – Томск, 2003. – С. 121-122.
21. **Терещенко Н.Н., Лушников С.В., Пышьева Е.В.** Биологическая азотфиксация как фактор ускорения микробной деструкции нефтяных углеводородов в почве и способы ее стимулирования // **Биотехнология.** – 2004. – № 5. –С. 41–44.

22. **Терещенко Н.Н.**, Бубина А.Б. К вопросу о природе ростостимулирующих и фунгистатических свойств вермикомпоста // Дождевые черви и плодородие почв: Материалы 2-й Междунар. научно.-практич. конф. – Владимир, 2004. – С. 181-182.
23. **Терещенко Н.Н.**, Бубина А.Б., Чичерин Г.М. Влияние агроэкологической системы полевого вермикультивирования на микробиологические и агрохимические свойства почвы // Почвы – национальное достояние России: Материалы IV съезда Общества почвоведов им. В.В. Докучаева. – Новосибирск, 2004. – С. 686-687.
24. **Терещенко Н.Н.**, Лушников С.В. К вопросу о рациональном применении минеральных удобрений для ускорения микробиологической деструкции нефтяных углеводородов в почве // Контроль и реабилитация окружающей среды: Материалы IV Междунар. симпозиума. – Томск, 2004. – С. 117–118.
25. **Терещенко Н.Н.**, Лушников С.В. Актуальность рационального применения минеральных удобрений для стимулирования процессов самовосстановления нефтезагрязненных почв // Повышение плодородия почв и продуктивности сельскохозяйственных культур в зонах рискованного земледелия: Материалы Межрегион. научн.-практ. конф. – Барнаул, 2004. – С.18-27.
26. **Терещенко Н.Н.**, Бубина А.Б., Писаренко С.В. Научные основы создания комплексной тест-системы микробиологических показателей для оценки экологической устойчивости почвы и эффективности почвозащитных технологий // Биотехнология: состояние и перспективы развития: Материалы 3-го Московского Междунар. Конгресса. – Москва, 2005. – С. 17-18.
27. **Терещенко Н.Н.**, Бубина А.Б. **Эффективность технологического приема интродукции в органический субстрат бактерий рода *Pseudomonas* для получения вермикомпоста с усиленными ростостимулирующими и фунгистатическими свойствами** // Вестник Томского государственного университета. – 2007. – № 300 (II) . – С. 237-242.
28. **Терещенко Н.Н.** Бактериальные удобрения: проблемы и перспективы применения // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2007. – №7. – С. 14-20.
29. **Терещенко Н.Н.**, Лушников С.В., Бубина А.Б. Цеолиты и нефтяные загрязнения почвы // Энергия: экономика, техника, экология. – 2007. – №1. – С. 27-30.
30. **Терещенко Н.Н.**, Бубина А.Б. Микробиологические критерии оценки устойчивости основных экологических функций почвы и эффективность почвозащитных технологий // Биотехнология: состояние и перспективы развития: Материалы 4-го Московского Междунар. Конгресса. – Москва, 2007. – ч.2. – С. 116.