

УДК 631.466.1

© М. А. Каниськин, Т. А. Семенова, В. А. Терехова

ИЗМЕНЕНИЯ МИКОБИОТЫ ПОЧВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ФОСФОГИПСА

KANIS'KIN M. A., SEMENOVA T. A., TEREKHOVA V. A. CHANGES OF SOIL MYCOBIOTA UNDER THE EFFECT OF PHOSPHOGYPSUM

В качестве химических мелиорантов почв, в частности солонцов, предлагается использовать отход производства фосфорных удобрений — фосфогипс (Рекомендации..., 2006). Однако его широкое применение сдерживается тем, что, наряду с основным действующим веществом — гипсом, он содержит большое количество примесей — соединений стабильного стронция, фтора, кадмия и других элементов, действие которых в условиях достаточного питания на биологические характеристики почв не исследовано (Любимова, Борисочкина, 2007). Стандартная система показателей для оценки влияния фосфогипса и других мелиоративных средств на качество почв не разработана. В ходе экологического контроля целесообразно отслеживать не только изменения химического состава растений, но и трансформацию комплексов почвенных микроорганизмов.

Ключевая биоценотическая роль грибов в функционировании природных экосистем и их реакция на воздействие природных и техногенных факторов характеризуют их как биоиндикатор экологического состояния среды обитания, и в первую очередь почвенной (Бабьева, Зенова, 1983; Мирчинк, 1988; Марфенина, 1994; Терехова, 2007; Environmental..., 2007, и др.). Какое воздействие фосфогипс может оказывать на микобиоту почв? Какие показатели микромицетов наиболее чувствительны к данному виду химического воздействия? Ответы на эти вопросы мы попытались найти в ходе выполнения данного экспериментального исследования.

Цель работы заключалась в оценке влияния фосфогипса на почвенную микобиоту.

Микологический анализ был проведен в районе размещения отвалов фосфогипса — крупнотоннажных отходов химического предприятия. Фоновые почвы — дерново-подзолистые. Фосфогипс, полученный в производственных условиях разложением хибинского апатита Кировского месторождения серной кислотой, включал следующие элементы (%): CaO — 29.36, SO₂ — 43.55, P₂O₅общ. — 0.36, P₂O₅водораств. — 0.01, SrO_{общ.} — 2.34, SrO_{водораств.} — 0.064, Al₂O₃ — 0.12, Fe₂O₃ — 0.16, Na₂O_{водораств.} — 0.007, Na₂O_{общ.} — 0.02, K₂O_{общ.} — 0.02, K₂O_{водораств.} — 0.003, SiO₂ — 0.37, F_{общ.} — 0.11, F_{водораств.} — 0.005 (Фосфогипс..., 1990).

Эмпирические данные о состоянии микобиоты были получены с пробных площадок по градиенту удаленности от отвалов фосфогипса. Исследуемые участки почв расположены: а) в условно чистой зоне — фоновая; б) на удалении примерно 500 м от обводного канала, опоясывающего сравнительно новый отвал отходов, — буферная (наиболее вероятный путь поступления фосфогипса на эту территорию — распыление отхода с отвала); в) непосредственно вблизи отвала фосфогипса — загрязненная отходами импактная зона (массовая доля фосфогипса в почвах этой зоны — 30 %). На

площадках этих зон был заложен многомесячный натурный эксперимент с целью сравнения динамики микобиотических параметров и скорости минерализации растительного опада — листьев липы. Осенью в каждой зоне на площади квадрата 2×2 м было заложено по 24 пластиковых сетчатых мешочка с опадом, которые вынимали через 1, 6 и 11 месяцев экспозиции. Анализ микобиоты проводили одновременно в пробах почв и на экспонирующемся в почве модельном растительном опаде.

При оценке биоразнообразия и структурно-функциональных особенностей микобиоты учитывали общую численность колониеобразующих единиц (КОЕ), число и обилие видов, долю устойчивых к неблагоприятным факторам темнопигментированных видов грибов, долю быстрорастущих видов, потребляющих легкодоступный органический субстрат, общую биомассу микромицетов, морфобиологическую структуру грибной биомассы (соотношение спор и мицелия).

Для подавления роста бактерий и дрожжей посев почвенной суспензии из серийного разведения или смыва с листового опада проводили на подкисленный агар Чапека (Методы..., 1982). Подсчет числа колониеобразующих единиц (КОЕ) и измерение радиальной скорости роста грибных колоний (Kr , мм/ч) осуществляли на 5-е и 7-е сутки роста. Определение видов микромицетов проводили с использованием наиболее распространенных определителей, при этом по возможности были учтены таксономические изменения, отраженные в имеющихся руководствах (Raper, Thom, 1984; Domsch, Gams, 1993; Ainsworth and Bisby..., 2001, и др.). В некоторых случаях были использованы электронные интерактивные «ключи» и информационные сайты интернет-ресурсов (<http://www.indexfungorum.org>; <http://biodiversity.bio.uno.edu/~fungi/>; www.cbs.knaw.nl и др.).

Прямой учет биомассы грибов, численности спор и фрагментов мицелия проводили методом люминесцентной микроскопии при окрашивании препаратов суспензии почв и субстратов на предметных стеклах флуорохромом Fluorescent Brightener 28 (фирмы SIGMA, аналог Calcofluor White ST). Использовали следующие методические параметры: разведение — 1 : 100, аликвота — 0.02 мл, площадь квадрата — 4 см², площадь поля зрения — 5.024×10^{-3} см. Биомассу рассчитывали, допуская, что 1 м мицелия весит 3.9×10^{-6} г и содержит 80 % воды, а масса одной споры — 10^{-11} г (Методы..., 1991) при цене деления окуляра микроскопа 4 мкм.

До закладки субстратов было проведено изучение исходной эпифитной микобиоты листьев. Повторность при отборе проб почв — 5-кратная, при микологических исследованиях каждой пробы — 3-кратная.

Результаты анализа грибных сообществ в почвах разных зон показали значительную вариабельность как интегральных, так и частных показателей видового разнообразия, при этом различия между зонами были сопоставимы с сезонной изменчивостью. Рассчитанная средняя численность колониеобразующих единиц (КОЕ/г почвы) свидетельствует об умеренной заселенности исследуемых почв грибами.

В начале наблюдений численность КОЕ микромицетов в пробах почв на площадках фоновой и импактной зон была существенно (на 1—2 порядка) ниже, чем в пробах буферной зоны (табл. 1).

Высокая численность КОЕ в буферной зоне была обеспечена обилием колоний *Penicillium janczewskii* K. M. Zalesky (их доля составляла 44 % от всех выросших грибов на чашках Петри). В посевах почв импактной зоны доминировали колонии *P. aurantiogriseum* Dierckx (35 %). В почвах фоновой зоны численность всех микромицетов была невысокой, явные доминанты не выявлены.

В последующие периоды наблюдений (через 6 и 11 месяцев) максимальная численность КОЕ в буферной зоне сохранилась также благодаря доминированию *P. janczewskii*. Хотя этот вид встречался во всех пробах с пространственной частотой встречаемости 100 %, в фоновой и импактной почвах его колоний было меньше.

Очевидно, следствием выраженного доминирования отдельных видов в буферной зоне видовое разнообразие микромицетов оказалось наименьшим (29 видов) по сравнению с другими. В почвах буферной зоны обильно развивались *P. janczewskii* и *Trichoderma harzianum* Rifai, затрудняющие развитие других микромицетов. Видовое раз-

Общая численность микромицетов в почвах разных зон, тыс. КОЕ/г

Срок экспозиции, месяцы	Показатель	Зона		
		фоновая	буферная	импактная
1	Среднее	9.28	118	37.31
	Коэффициент вариации	0.92	0.71	1.67
6	Среднее	36.7	170.7	40.7
	Коэффициент вариации	0.60	0.44	0.65
11	Среднее	51.3	478.6	30.6
	Коэффициент вариации	0.46	0.22	0.61

нообразии в фоновой и импактной почвах было примерно одинаковым — 38 и 37 видов соответственно. При этом по набору видов грибные комплексы этих почв значительно отличались (коэффициенты сходства Сёрнсена—Чекановского были в разные сроки в пределах 0.16—0.38). Возможно, это объясняется влиянием фосфогипса на почвенную микробиоту в импактной зоне.

Индексы разнообразия микромицетов (по Шеннону) и выровненности видов (по Пиелу) в почве фоновой и импактной зон отличались незначительно (табл. 2).

Одновременно с описанием структурно-функциональной организации грибных сообществ в почвах разных зон исследовали микробиоту на модельном растительном субстрате, заложенном в эти почвы. Следует отметить, что численность КОЕ микромицетов при посеве смывов с модельных субстратов в процессе экспозиции возрастала, но очень неравномерно на разных площадках. Не обнаружено выраженных закономерностей динамики общей численности КОЕ в связи с загрязнением проб фосфогипсом. Оценка вариабельности значений численности микромицетов, ассоциированных с исследуемым субстратом, показала максимальное значение данного показателя в буферной зоне (табл. 3). Здесь также отмечались наибольшие значения дисперсии и стандартного отклонения. Очевидно, что такой интегральный показатель, как общая численность КОЕ грибов, мало информативен при данном уровне техногенной нагрузки.

По ходу экспозиции отмечены значительные перестройки в комплексах микромицетов на исследуемых субстратах. Во всех вариантах наблюдалось их заселение аборигенными почвенными микромицетами и элиминация ряда эпифитных грибов (например, *Aureobasidium pullulans* (de Vary) G. Arnaud), отмеченных на исходном субстрате до закладки в почву. В целом видовое разнообразие во всех случаях возросло в 2—3 раза (с 5 видов на исходном субстрате до 9—18 в разных вариантах). Видовое разнообразие микромицетов, ассоциированных с погруженным в почву растительным субстратом, было несколько ниже, чем в окружающих почвах (индекс Шеннона колебался от 0.98 до 2.16). Общее количество видов, отмеченных в почве, — 65, на листьях — 44. При этом сходство микробиоты на пробах опада разных зон было несколько выше, чем в окружающих почвах (коэффициент Сёрнсена—Чекановского составлял 0.33—0.64).

Таблица 2

Показатели видового разнообразия микробиоты в почвах разных зон

Срок экспозиции, месяцы	Индекс Шеннона			Индекс Пиелу		
	фоновая	буферная	импактная	фоновая	буферная	импактная
1	3.30	2.70	3.39	0.95	0.68	0.81
6	3.27	1.99	3.69	0.78	0.58	0.9
11	3.44	1.08	3.91	0.81	0.28	0.94

Общая численность микромицетов, ассоциированных с листовым опадом, тыс. КОЕ/г

Срок экспозиции, месяцы	Показатель	Зона		
		фоновая	буферная	импактная
1	Среднее	95.6	167.8	248.7
	Коэффициент вариации	0.33	0.45	0.03
6	Среднее	539.9	1045.5	366.6
	Коэффициент вариации	0.77	0.93	0.18
11	Среднее	515.6	773.3	807.8
	Коэффициент вариации	0.72	1.02	0.41

Характеризуя динамику видового состава по ходу экспозиции растительного опада, следует отметить, что общее количество видов, отмеченных на субстратах за весь срок наблюдения, несколько уменьшалось в ряду фоновые—буферные—импактные почвы (на 27, 26 и 21 вид соответственно). Во всех пробах отмечено снижение доли быстрорастущих грибов по ходу экспозиции растительного опада в почвах. Наименьшее снижение (с 6 до 2.85 %) отмечено в фоновой зоне; в буферной и импактной зонах доля быстрорастущих грибов составила 0.2 и 0.8 % соответственно. Для темнопигментированных микромицетов, ассоциированных с субстратами, значимых изменений в зависимости от уровня загрязнений и срока экспозиции не выявлено: содержание этих видов грибов было невелико и сильно варьировало.

Прямой метод исследования содержания грибов в анализируемых пробах, по сравнению с методом посева, позволил получить более определенную и интересную для оценки степени воздействия фосфогипса информацию. Результаты анализа грибной биомассы в почвах исследуемых зон методом люминесцентной микроскопии приведены в табл. 4 и 5.

Количество и биомасса грибных спор в почвах разных зон (метод люминесцентной микроскопии)

Зона	Площадка	Количество спор в поле зрения		Количество спор в 1 г почвы, 10^6 ед.	Биомасса спор, мг/г почвы
		среднее для площадки	среднее для зоны		
Импактная	И-1	1.97	} 2.07 ± 0.23	0.823	8.230
	И-2	1.80			
	И-3	2.12			
	И-4	2.16			
	И-5	2.29			
Буферная	Б-1	2.55	} 2.74 ± 0.52	1.090	10.900
	Б-2	2.48			
	Б-3	2.52			
	Б-4	2.79			
	Б-5	3.35			
Фоновая	Ф-1	3.47	} 3.65 ± 1.37	1.454	14.540
	Ф-2	3.03			
	Ф-3	2.91			
	Ф-4	5.59			
	Ф-5	3.26			

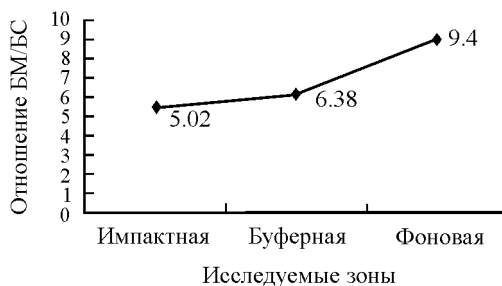
**Морфобиологическая характеристика грибной биомассы в почвах разных зон
(метод люминесцентной микроскопии)**

Зона	Площадки	Длина мицелия в поле зрения, мкм		Длина мицелия, 10^6 мкм/г почвы	Биомасса мицелия (сухой вес), мг/г почвы	Обогащенность (по: Методы..., 1987)	Отношение биомассы мицелия к биомассе спор
		среднее для площадки	среднее для зоны				
Импактная	И-1	13.8	} 14.89 ± 6.35	59.27	46.23	Бедная	5.62
	И-2	9.12					
	И-3	22.72					
	И-4	12.32					
	И-5	16.4					
Буферная	Б-1	18.96	} 22.38 ± 6.93	89.11	69.5	»	6.38
	Б-2	26.8					
	Б-3	14.24					
	Б-4	26.56					
	Б-5	25.36					
Фоновая	Ф-1	39.76	} 44.00 ± 10.52	17.52	136.62	Средняя	9.40
	Ф-2	46.56					
	Ф-3	57.44					
	Ф-4	40.64					
	Ф-5	35.6					

Расчеты показывают, что исследованные образцы не слишком обогащены грибами (табл. 5). Согласно оценочной шкале Д. Г. Звягинцева (Методы..., 1987), лишь почва фоновой зоны характеризуется средней степенью обогащенности, в то время как в буферной и импактной зонах почвы бедны микроорганизмами.

Особый интерес представляют данные о соотношении споровой и мицелиальной биомассы. Достоверно показано, что в неблагоприятных условиях (импактная зона) доля споровой биомассы значительно выше (см. рисунок). Поэтому повышался и индекс отношения мицелиальной биомассы грибов к споровой.

В условиях обогащенности среды биогенными элементами отходы фосфогипса, поступающие на полигон, в первое время характеризуются токсичностью, соответствующей 4-му классу опасности. Однако довольно скоро (примерно в течение месяца) токсичность фосфогипса в отвалах, измеренная в стандартных биотест-системах, нейтрализуется (Каниськин и др., 2007). Несмотря на это, влияние фосфогипса сказывается на развитии грибов в форме подавления вегетативного мицелия и увеличения спорообразования микромицетов. Подобное явление отмечалось нами ранее в модельном опыте в условиях лабораторного эксперимента (Terexhova et al., 2004). Натурные исследования подтвердили, что этот показатель свидетельствует об изменении усло-



Динамика соотношения биомассы мицелия (БМ) и спор (БС) грибов на площадках трех зон по мере удаления от отвалов фосфогипса.

вий обитания грибов и может быть рекомендован как информативный параметр для оценки воздействия фосфогипса на почвы.

Таким образом, результаты проведенных исследований почвенной микробиоты на участках, расположенных по градиенту удаления от отвалов фосфогипса, показали, что под влиянием этого вида химических отходов происходят изменения в грибных сообществах. Судя по полученным данным, большое количество биогенных элементов, присутствующих в фосфогипсе, не нейтрализует его токсических свойств и неблагоприятное воздействие на микромицеты.

Сравнивая эффективность разных методов, можно констатировать, что биоиндикационная ценность результатов прямого метода (люминесцентная микроскопия) в данном случае выше по сравнению с результатами, полученными методом посева. Влияние фосфогипса на общую численность и структуру микромицетных комплексов, представленных главным образом пенициллами, проявляется нечетко: в основном оно выражается в стимулировании развития одних видов рода *Penicillium*, в подавлении других и в отсутствии выраженного влияния на третьи. Напротив, различия в морфобиологической структуре микробиоты на разном удалении от отвалов фосфогипса выражены вполне определенно. По мере приближения к отвалам фосфогипса доля споровой биомассы под влиянием фосфогипса значительно увеличивалась. В связи с этим следует заключить, что из набора микробиотических показателей, проанализированных в данной работе, наиболее информативным индикационным показателем, отражающим влияние фосфогипса на грибные сообщества микромицетов, является соотношение споровой и мицелиальной биомассы.

Мы полагаем, что выявленные в условиях влияния фосфогипса изменения микробиоты целесообразно принимать во внимание при создании системы экологического контроля за мелиорируемыми с помощью этого химиката почвами.

Авторы выражают признательность д. б. н. А. С. Яковлеву и к. б. н. А. С. Горленко за помощь в организации исследования.

Исследования выполнены при поддержке программы президиума РАН «Биоразнообразии».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бабьева И. П., Зенова Г. М. Биология почв. М.: МГУ, 1983. 248 с.
- Звягинцев Д. Г. Почва и микроорганизмы. М.: МГУ, 1987. 256 с.
- Каниськин М. А., Терехова В. А., Яковлев А. С. Контроль гуматной детоксикации отходов фосфогипса методами биотестирования // Экология и промышленность России. 2007. № 8. С. 48—51.
- Любимова И. Н., Борисочкина Т. И. Влияние потенциально опасных химических элементов, содержащихся в фосфогипсе, на окружающую среду. М.: Почвенный ин-т им. В. В. Докучаева, 2007. 48 с.
- Марфенина О. Е. Микологический почвенный мониторинг: возможности и перспективы // Почвоведение. 1994. № 1. С. 75—80.
- Методы экспериментальной микологии. Справочник / Под ред. И. А. Дудка и др. Киев: Наук. думка, 1982. 550 с.
- Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д. Г. Звягинцева. М.: МГУ, 1991. 304 с.
- Мирчинк Т. Г. Почвенная микология. М.: МГУ, 1988. 220 с.
- Рекомендации по использованию фосфогипса для мелиорации солонцов. М.: Почвенный ин-т им. В. В. Докучаева, 2006. 46 с.
- Терехова В. А. Микромицеты в экологической оценке водных и наземных экосистем. М.: Наука, 2007. 215 с.
- Фосфогипс и его использование / Под ред. С. Д. Эвенчика, А. А. Новикова. М.: Химия, 1990. 222 с.

Ainsworth and Bisby's Dictionary of the fungi / Eds P. M. Kirk et al. 9th ed. CABI Bios., 2001. 655 p.

Domsch K. H., Gams W. Compendium of soil fungi. Vol. 1. IHW-Verlag, 1993. P. 859—860.

Environmental and Microbial Relationships. IV. The Mycota. 2nd ed. / Eds C. P. Kubicek, I. S. Druzhinina. Springer, 2007. 374 p.

Raper K. B., Thom C. A. Manual of the Penicillia. New Delhi: Today and Tomorrow's Printers and Publishers, 1984. 875 p.

Terekhova V., Yatsynenko T., Dolbneyva E. Ecotoxicological and mycobiotic investigations on the phosphogypsum forming soils / Int. Congress: Eurosoil-2004. September 4—9. München, 2004.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Институт проблем экологии и эволюции
им. А. Н. Северцова РАН
ka-nis-kin@rambler.ru

Поступила 5 XII 2008

РЕЗЮМЕ

Изучено влияние фосфогипса на структурные (таксономические), функциональные (доля темноокрашенных и быстрорастущих микромицетов) и интегральные (общая биомасса, число видов) характеристики почвенных микромицетов. Показано значительное возрастание коэффициента отношения биомассы спор к биомассе мицелия под влиянием фосфогипса. Прямой метод исследования (люминесцентная микроскопия) позволил получить более информативные микобиотические параметры в сравнении с чашечным методом.

Ключевые слова: фосфогипс, сообщества почвенных микромицетов, люминесцентная микроскопия, микобиотические параметры.

SUMMARY

Influence of phosphogypsum on structural (taxonomical), functional (shares of dark-colored and fast growing micromycetes) and integral (total biomass, number of species) features of soil micromycetes was investigated. The remarkable increase of the ratio of spore biomass to mycelium biomass under the influence of phosphogypsum was demonstrated. Direct method of investigation (luminescence microscopy) allowed to receive more informative mycobiotic parameters in comparison with Petri dishes method.

Key words: phosphogypsum, soil micromycetes communities, luminescence microscopy, mycobiotic parameters.