

## ОХОРОНА ТА КОНТРОЛЬ СТАНУ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

УДК: 631.445.4:579.852.11

### ВПЛИВ ТРИХОДЕРМІНУ НА ФУНКЦІОНАЛЬНО-СТРУКТУРНІ ОСОБЛИВОСТІ ТА БІОХІМІЧНУ АКТИВНІСТЬ МІКРОБНОГО ЦЕНОЗУ ЧОРНОЗЕМУ ТИПОВОГО ЗА УМОВ ЗАБРУДНЕННЯ ВАЖКИМИ МЕТАЛАМИ

Гринченко Т.О., Маклюк О.І.\*, Журавльова І.М.

*Харківський національний педагогічний університет імені Г.С. Сковороди  
ННЦ «Інститут агрохімії та ґрунтознавства  
імені О.Н.Соколовського» НААН України\**

Досліджено перебудову мікробних ценозів та рівень біохімічної активності чорнозему типового під дією важких металів і біологічного препарату Триходерміну. Виявлена специфічність впливу кожного металу та рівня його забруднення на мікробний ценоз ґрунту. Збагачення мікрофлори чорнозему типового грибною культурою триходерми значно посилює процес трансформації органічної речовини ґрунту як без забруднення, так і з післядією важких металів.

**Ключові слова:** чорнозем типовий, забруднення, важкі метали, біологічна активність, Триходермін, мікробний ценоз.

**The influence of trichoderminum on the functional & structural peculiarities and biochemical activity of microbiocenosis structure of typical chernozem soils in conditions of heavy metal contamination. Grinchenko T. O., Maklyuk O. I., Zhuravlyova I.M.** – Restructuring of microbiocenoses and levels of biochemical activity of chernozem in result of contamination with heavy metals and effect of biological preparation Trihodermin was investigated. Specific influence of every metal and dependence on contamination level is revealed. Soil enrichment with fungi culture Trihodermin greatly enhanced the transformation of soil organic matter both without pollution and in aftereffect of heavy metals.

**Key words:** typical chernozem soil, contamination, heavy metals, biological activity, Trihodermin, microbiocenosis.

## ВСТУП

Біологічна деградація техногенно забруднених ґрунтів визначається як процес стійких змін біологічних властивостей ґрунту і проявляється у зміні чисельності мікроорганізмів, зменшенні видового розмаїття і порушенні оптимального співвідношення різних видів ґрунтової мезо- і мікрофауни, розвитку патогенної мікрофлори та зміні інтенсивності протікання біохімічних процесів [2, 9]. Відповідно, оцінити рівень техногенного впливу на формування деградації можна за допомогою

біологічних показників. Характер змін біологічних показників залежить від типу антропогенного навантаження, його тривалості та інтенсивності впливу на ґрунт, взаємодії з іншими природними та антропогенними факторами. Разом з тим у чисельних наукових публікаціях зазначено здатність певних мікробних угруповань до саморегуляції та пристосування до змін навколишнього середовища [5]. Резистентність (толерантність) мікроорганізмів до важких металів проявляється у здатності рости при високих граничних концентраціях політантів. При певній концентрації важких металів може відбуватися адаптація мікроорганізмів. У бактеріальному угрупованні, яке піддається впливу будь-якого одного металу, збільшується резистентність саме до цього металу, при цьому слід враховувати природу самого металу.

Зі збільшенням толерантності мікроорганізмів до важких металів негативний вплив останніх на мікробні угруповання зменшується. Розвиток резистентності до металів дозволяє мікробним угрупованням зберегти їх функції. Таким чином, активізацію життєдіяльності ґрунтових мікроорганізмів можна здійснювати шляхом штучного збагачення ґрунту високоефективними селекціонованими культурами мікроорганізмів, які завдяки своїй резистентності до ВМ забезпечать надійне функціонування мікробної системи ґрунту та запобігатимуть зниженню продуктивності сільськогосподарських культур.

На цій основі можлива розробка мікробіологічного агрозаходу для зниження техногенного навантаження на ґрунт і підтримки його біологічної активності шляхом інтродукції активних мікробних культур, зокрема штаму гриба *Trichoderma viride*.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У зразках ґрунту визначалась чисельність основних груп мікрофлори у колонійутворювальних одиницях (КУО) методом мікробіологічного посіву ґрунтової суспензії відповідного розведення на тверді поживні середовища [4]: органотрофних бактерій – на м'ясо-пептонний агар (МПА), мікроорганізмів, що засвоюють азот мінеральних сполук і актиноміцетів – на крохмально-аміачний агар (КАА), мікроскопічних грибів на середовище Ріхтера, мікроорганізмів, що мобілізують мінеральні фосфати – на середовище Муромцева, органічні фосфати – на середовище Менкіної. Розрахункові показники, зокрема мінералізації та оліготрофності, які характеризують напругу мінералізаційних процесів і трофічний режим ґрунту, визначались за співвідношенням окремих груп мікроорганізмів, інтегровані показники біогенності (ІПБ), біологічної активності (ІПБА) та біологічного стану ґрунту (ІПБС) – за методикою на основі розрахунку сумарного біологічного показника за Дж. Ацці [1, 2].

Біохімічні властивості ґрунту визначались за показниками активності ферментів інвертази фотоколориметричним методом [15] і дегідрогенази за Галстяном [15]. Здатність ґрунту до накопичення аміачного та нітратного азоту визначалась за методом Ваксмана [3, 6, 10, 12].

Отримані у результаті досліджень дані статистично оброблено із застосуванням методу дисперсійного аналізу.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати досліджень показали тенденцію до зростання біогенності ґрунту за внесення грибної культури у ґрунт. За структурної та функціональної характеристики мікробіоценозів чорнозему типового встановлено, що під дією важких металів (післядії забруднення на рівні 8 кларків) проходить перебудова мікробних ценозів (табл.1, 2). При цьому вплив кожного важкого металу на мікробіоту специфічний відповідно до ступеня його агресивності. З одного боку, ми спостерігали стимулюючий вплив менш агресивного важкого металу, а з іншого боку – відповідну реакцію на зовнішній фактор, яка супроводжується значною зміною кількісного співвідношення мікробних популяцій. Так, на варіантах без інтродукції гриба *Trichoderma viride* під дією важких металів чисельність мікроорганізмів більшості еколого-трофічних угруповань зменшувалася; лише для мікроорганізмів, які засвоюють органічний азот, проявилася стимулююча післядія важких металів. В екотоксикології відомі випадки стимулюючої дії різних хімічних сполук, що надходять до живих організмів або у ґрунт. Вони отримали назву «ефекту малих доз» [11].

Інтродукція штаму гриба не призвела до покращення цих показників, але для відміченої групи мікроорганізмів, що засвоюють органічний азот, вплив триходерми був значно ефективнішим: на варіанті з Ni та грибом *Trichoderma viride* відмічено зростання показника у 4,8 рази порівняно до контролю та на 6% порівняно до варіанту з забрудненим ґрунтом, на варіанті з Pb та *Trichoderma viride* – у 3,2 рази порівняно до контролю та на 32% під дією триходерми, варіант з Cr та інтродукцією – у 4,5 рази (біогенність під впливом гриба зросла на 67% у забрудненому ґрунті, з Cd – у 3,9 рази і на 34% зросла біогенність. Найбільший ефект спостерігався на фоні менш агресивних металів (Ni та Cr), а дещо менший – на фоні металів Pb та Cd. Наведені результати свідчать про специфічність взаємодії мікробного ценозу та важкого металу, де важливим фактором виступають його природні особливості.

Стосовно представників мікроскопічних грибів відмічено зниження їх чисельності на всіх варіантах забрудненого чорнозему типового. Внесення Триходерміну позитивно вплинуло на цей показник: чисельність грибів дещо зросла на забрудненому важкими металами ґрунті, та на деяких варіантах несуттєво, що, можливо, пояснюється типовою боротьбою за поживні речовини представників однієї екологічної ніші.

За отриманими даними встановлено напругу мінералізаційних процесів, яка вказує на зниження цього процесу під впливом інтродукції штаму гриба *Trichoderma viride* майже на всіх варіантах забрудненого ґрунту. Стосовно показника трансформації органічної речовини ґрунту спостерігається протилежна тенденція: збагачення мікрофлори грибною культурою триходерми значно посилює процес у чорноземі

типовому і без забруднення, і з післядією важких металів.

Важливішим показником біологічної активності ґрунту є його ферментативна активність. Встановлений кореляційний зв'язок між активністю ферментів і родючістю ґрунту дозволяє використовувати рівень ферментативної активності для порівнювальної оцінки ефективності агротехнічних прийомів, а також діагностики змін ґрунту при різних антропогенних навантаженнях [13].

Аналогічну стимулюючу дію на активність ферментів, що відносяться до різних класів (дегідрогеназа – до класу оксидоредуктаз, які відіграють провідну роль у окислювально-відновлювальних процесах ґрунту та беруть участь у синтезі гумусних речовин у ґрунті, та інвертаза – до класу гідролаз, які беруть участь у збагаченні ґрунту рухомими і доступними для рослин і мікроорганізмів поживними речовинами, руйнуючи високомолекулярні органічні сполуки) спостерігаємо і під впливом фактору важких металів, і під впливом інтродукції на більшості варіантів.

Але відповідно до природних особливостей важких металів виявлено деякі відмінності у ферментативній активності, а саме: якщо на варіанті незабрудненого ґрунту внесення грибної культури сприяло підвищенню дегідрогеназної активності на 12%, то для забрудненого ґрунту цей прийом був ефективним лише на варіантах із свинцем та хромом, де показник зріс на 46% і 8% відповідно; показник інвертазної активності на незабрудненому ґрунті збільшився під впливом мікробної інтродукції на 34%, а на забрудненому – на 4% і 8% знову таки для варіантів із свинцем та хромом.

Важливим циклом мікробіологічних процесів у ґрунті є трансформація азоту, яка представляє собою послідовні реакції розкладання органічних азотовмісних сполук до аміаку, його окиснення до азотної кислоти та відновлення азоту. Увагу привертають саме амоніфікаційна та нітрифікаційна здатності ґрунту, показники якої характеризують стан азотного режиму і забезпечується активністю мікробного пулу.

Під впливом важких металів, як свідчать отримані дані (табл. 2), обидва показники суттєво були меншими порівняно до варіанту незабрудненого ґрунту. Штучне внесення гриба *Trichoderma viride* на 12% збільшив амоніфікаційну активність незабрудненого чорнозему типового, а також ґрунту, забрудненого нікелем на 7% та хромом – майже у 2,6 рази. За післядії свинцю такого ефекту від інтродукції не спостерігалось, а навпаки, відбулося зниження амоніфікаційної здатності на 24%. Для нітрифікаційної здатності ефект від внесення триходерми проявився на варіантах з нікелем та свинцем, де зростання відбулося на 23% і на 5% відповідно. Інші варіанти позитивного впливу не проявили.

Відмінності в біохімічних показниках між контрольними варіантами та варіантами з інтродукцією гриба, а також між варіантами забрудненого ґрунту, вказують на специфічність взаємодії інтродукованої мікробіоти з важкими металами, де суттєвий вплив має природа забруднювача, термін і концентрація його у ґрунті, що у свою чергу позначається на ефективності агрозаходу.

Тому для встановлення загальної тенденції впливу штучного внесення гриба *Trichoderma viride* з врахуванням всіх коливань зазначених показників використано методику розрахунку інтегрованого показника біологічного стану ґрунту (ІПБС). Дана методика дозволяє оцінити сукупність біологічних показників [2]. Для цього при діагностуванні різних антропогенних факторів за 100% приймається значення кожного з показників незабрудненого ґрунту (контроль) і по відношенню до нього у відсотках розраховується значення цього показника у забрудненому ґрунті. ІПБС розраховується за формулою:

$$\text{ІПБС} = (B_1 + B_2 + B_3 + \dots + B_n)/N,$$

де  $B_1, B_2, B_3, B_n$  – значення кожного показника у % по відношенню до цього ж показника у незабрудненому ґрунті;

$N$  – кількість показників. Зниження або зростання ІПБС на 10% більше вказує на суттєвий вплив досліджуваного фактору.

За антропогенного впливу на ґрунт середнє значення обраного показника у більшості випадків зменшується, у той же час деякі показники біологічної активності ґрунту можуть зростати. Зниження інтегрованого показника біологічного стану ґрунту знаходиться у прямій залежності від ступеня дії антропогенного фактора. При розрахунку ІПБС повинні використовуватися неабиякі показники біологічної активності ґрунту, а лише найбільш інформативні. Відомо, що для моніторингу та діагностики ґрунту, забрудненого важкими металами, у першу чергу необхідно визначати біохімічні показники та кількісні показники структури мікробіоценозів [7, 8].

Проведена оцінка змін структури та функціонування мікробного ценозу з інтродукцією триходерми у чорнозем типовий, забруднений важкими металами, за розрахованими інтегрованим показником біологічного стану ґрунту (ІПБС) (табл.2) дозволяють визначити найбільш сприятливі умови для прояву ефективності проведеного агрозаходу. За отриманими даними забруднення важкими металами ґрунту негативно вплинуло на біологічний стан чорнозему типового на всіх варіантах. Але слід відмітити особливості взаємодії інтродукованого гриба з кожним металом окремо. Найбільшого значення ІПБС (76) має варіант із штучним внесенням триходерми у чорнозем типовий, забруднений нікелем, навіть більше за контрольний варіант, де ІПБС становив 73. Враховуючи роль цього елемента у метаболізмі мікроорганізмів, можна зробити висновок щодо формування сприятливих умов, які надає нікель для пристосування інтродукованого гриба та його функціонування у ґрунті. В цілому відбулося покращення біологічного стану забрудненого ґрунту за інтродукції штаму гриба *Trichoderma viride*. Так, на фоні свинцю ІПБС чорнозему типового зріс з 50 до 55, на фоні хрому – з 58 до 60. Тільки за умов забруднення ґрунту кадмієм позитивний ефект інтродукції не проявився, де, можливо, на функціонування грибної культури вплинула природна особливість елемента та хімічної сполуки, у формі якої його внесено.

**Вплив Триходерміну на функціонально-структурні особливості мікробного ценозу ґрунту в умовах його забруднення важкими металами**

Варіанти	Гриби, тис. КУО/г	Мікроорганізми, що засвоюють азот, млн КУО/г	Мікроорганізми, що засвоюють мінеральний азот, млн КУО/г		Мікроорганізми, що засвоюють фосфор, млн КУО/г	Показники		
			затяжна чисельність	активності		органічний	мінеральні	мінеральні заці
Контроль	1,59	1,34	10,4	2,39	3,90	0,99	7,76	1,51
Триходермін	0,37	3,70	5,33	2,48	1,22	0,61	1,44	6,27
Ni <sub>8</sub>	0,36	6,05	7,05	1,13	2,85	0,28	1,16	11,60
Ni <sub>8</sub> + Триходермін	2,26	6,44	0,88	0,40	2,66	3,62	0,13	56,30
Pb <sub>8</sub>	0,88	3,23	6,33	1,33	1,92	0,33	1,95	4,90
Pb <sub>8</sub> + Триходермін	0,94	4,27	6,27	1,82	1,12	0,56	1,46	7,20
Cr <sub>8</sub>	1,15	3,58	4,22	1,42	1,12	0,60	1,17	6,60
Cr <sub>8</sub> + Триходермін	1,09	5,99	5,58	1,01	1,19	0,39	0,93	12,40
Cd <sub>8</sub>	0,45	3,88	7,99	3,15	1,29	0,32	2,05	5,79
Cd <sub>8</sub> + Триходермін	0,73	5,21	4,51	2,34	2,66	0,43	0,86	11,3
НІР <sub>95</sub>	0,76	0,87	3,30	1,87	1,63	0,41		

Таблиця 2

## Показники активності ферментів інвертази та дегідрогенази ґрунтів за Галстяном

Варіанти	Дегідрогеназа, мг *ТФФ в 100 г за 24 години	Інвертаза, мг глюкози в 1 г за 24 години	Нітрифікаційна здатність, мг N-NO <sub>3</sub> на 100г ґрунту	Амоніфікаційна здатність, мг N-NH <sub>3</sub> на 100 г ґрунту	Інтегрований показник біологічного стану (ІПБС)
Контроль	91,18	3,86	0,67	3,99	73
Триходермін	102,11	5,16	0,52	4,45	64
Ni <sub>8</sub>	115,93	5,25	0,46	1,73	60
Ni <sub>8</sub> + Триходермін	114,65	4,79	0,53	4,48	76
Pb <sub>8</sub>	95,86	3,78	0,40	1,70	50
Pb <sub>8</sub> + Триходермін	139,63	3,94	0,42	1,30	55
Cr <sub>8</sub>	104,90	5,40	0,47	2,92	58
Cr <sub>8</sub> + Триходермін	113,25	5,84	0,30	3,11	60
Cd <sub>8</sub>	122,47	5,81	0,51	2,87	66
Cd <sub>8</sub> + Триходермін	107,11	5,13	0,50	2,75	64
HP <sub>05</sub>	2,27	1,28	0,11	0,44	

## ВИСНОВКИ

Встановлено, що Триходермін здатний посилювати біохімічну активність чорнозему типового навіть за несприятливих для аборигенної мікрофлори умов забруднення важкими металами.

У практичному застосуванні для ефективності мікробіологічного агрозаходу слід враховувати специфічність негативного впливу на ґрунтову мікробіоту або інтродукований мікроорганізм кожного металу та фізіологічні особливості внесеної культури. В цілому, результати досліджень показали покращення екологічного стану чорнозему типового в умовах забруднення ВМ на рівні 8 кларків за рахунок штучного внесення у ґрунт штаму гриба *Trichoderma viride*: з чотирьох варіантів забрудненого чорнозему типового три виявили покращення біологічного стану за умов інтродукції мікробної культури – на фоні нікелю, хрому, свинцю.

## Література

1. Ацци Дж. Сельскохозяйственная экология / Дж. Ацци. – Москва – Ленинград, 1959. – 480 с.
2. Вальков В.Ф. Методология исследования биологической активности почв на примере Северного Кавказа / В.Ф. Вальков, К.Ш. Казеев, С.И. Колесников // Научная мысль Кавказа. – 1999. – С. 32–37.
3. ГОСТ 26951-86. Почвы. Определение нитратов ионометрическим методом.
4. Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Д. Г. Звягинцев, И. В. Асеева и др. – Москва : МГУ. – 1980. – 224 с.
5. Іутинська Г. О. Ґрунтова мікробіологія / Г. О. Іутинська. – К. : Арістей, 2003. – С. 238–250.
6. Карягина Л. А. Определение активности полифенолоксидазы и пероксидазы в почве / Л. А. Карягина, Н. А. Михайловская // Весці АН БССР, серія с/г наук. – Мінск. – 1986. – № 2. – С. 40–41.
7. Колесников С. И. Биоэкологические принципы мониторинга и нормирования загрязнения почв / С. И. Колесников, К. Ш. Казеев, В. Ф. Вальков. – Ростов-на-Дону : Изд-во ЦВВР, 2001. – 64 с.
8. Колесников С. И. Влияние загрязнения тяжелыми металлами на микробную систему чернозема / С. И. Колесников, К. Ш. Казеев, В. Ф. Вальков // Почвоведение. – 1999. – № 4. – С. 505–511.
9. Левин С. В. Тяжелые металлы как фактор антропогенного воздействия на почвенную микробиоту / С. В. Левин, В. С. Гузев, И. В. Асеева // Микроорганизмы и охрана почв. – Москва: МГУ, 1989. – С. 5–46.
10. Основные микробиологические и биохимические методы исследования почвы : методические рекомендации. – Л.: ВНИИСХМ. – 1987. – С. 108–114.
11. Пономарева С. В. Изменение эколого-биологических свойств чернозема обыкновенного при загрязнении тяжелыми металлами : автореф. дис. на соиск. учен. степени канд. биол. наук / С. В. Пономарева. – Ростов-на-Дону, 2008.
12. Сэги Й. Методы почвенной микробиологии. – М. : Колос, 1983. – 135 с.
13. Хазиев Ф. Х. Системно-экологический анализ ферментативной активности почв / Ф. Х. Хазиев. – М. : Наука, 1982. – 203 с.



14. Хазиев Ф. Х. Методы почвенной энзимологии / Ф. Х. Хазиев. – М. : Наука, 2005. – 252 с.

**Влияние триходермина на функционально-структурные особенности и биохимическую активность микробного ценоза чернозема типичного в условиях загрязнения тяжелыми металлами. Гринченко Т.А., Маклюк О.И., Журавлева И.М. –** Исследованы процессы перестройки микробных ценозов и уровня биохимической активности чернозема типичного под влиянием тяжелых металлов и биологического препарата Триходермина. Выявлено специфическое влияние каждого металла и уровня его загрязнения на микробный ценоз почвы. Обогащение микрофлоры чернозема типичного грибной культурой триходермы существенно усиливает процесс трансформации органического вещества почвы как без загрязнения, так и в условиях последствия тяжелых металлов.

**Ключевые слова:** чернозем типичный, тяжелые металлы, биологическая активность, Триходермин, микробный ценоз.