
ECOLOGICAL SOIL SCIENCE



V. L. Samokhvalova¹ ✉ Cand. Sci. (Agri.), Sen. Res. Sci.
T. O. Grinchenko² Dr. Sci. (Agri.), Professor
I. M. Zhuravleva²
O. V. Mandryka¹

UDK 504.53.054;
631.41:504.53.054; 631.427.2;
631.465; 631.41

¹National Scientific Centre «O. N. Sokolovsky Institute
for Soil Science and Agrochemistry»,
Chaikovska str., 4, Kharkiv, Ukraine, 61024

²Kharkiv national pedagogical University
named after G. S. Skovoroda,
Blucher str., 2, building B, Kharkov, Ukraine, 61168

BIOREMEDIATION OF SOIL – SOIL BIOTA – PLANTS SYSTEM UNDER HEAVY METAL POLLUTION AS A FACTOR OF CHEMICAL AND BIOLOGICAL DEGRADATION

Abstract. By carrying out long-term field studies of soil-soil biota-plants system in areas of technogenic impact emission of HM it was determined the taxonomic composition of mycological coenosis under the soil pollution by HM fungi genera *Mucor*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Aspergillus*. It was given the high levels of soil contamination by HM fungi of the genus *Trichoderma*, which is not phytopathogenic in mycological coenosis of soil, increased significantly under 13 %, indicating that the stability of operation in the presence of HM excess in soils. Among the genus *Trichoderma* fungi, it was found the most active in species *Trichoderma viride*. It was determined that fungi, bacteria compared to the soil, are more resistant to contamination concealed antagonism and inhibition effect of certain bacteria fungi that compete with native soil biota. On the basis of the soil-geochemical investigations the results in zones of sources of man-made emissions of pollutants influence Zmievs'koy TPP «Centrenerg» NAC «Energy Company of Ukraine» Kharkiv region and a series of laboratory experiments elaborated a methodical approach for bioremediation of contaminated with heavy metals (HM) of the soil – soil biota – plants system. Used established a new property of the active biochemical agent of mycological drug *Trihodermin BT* based on mycological drug culture type *Trichoderma viride* – the ability to intensify the process of bioremediation and restore the quality of technogenic contaminated soils by HM. Biological preparation of *Trichoderma BT* used as a new biological improver for the prevention of biological and chemical degradation of soils with the activation of the myco- and microbial system of soil, functioning, increase the immune status and productivity of *Hordeum sativum* plants and improving their quality. Provides bioremediation effect with a limited term of a biological product in the soil, lowering its standards with increased use of its biological effectiveness. The technical result of the method is the expansion of the mycological drugs bank as natural resources with the effect of fertilizers, while the spread of the effective action of the active agent in the other components of the biological product of the studied system to produce new biological effects with simultaneous stabilization of the ecological environment, natural activation of the biological potential of the soil and the economic use of resources. The method can be used in agroecology, soil ecological management, for environmental monitoring of technogenic contaminated soils for various purposes and their using; in research practice – to develop a system of measures for biological remediation of contaminated areas in the complex biological processing methods remediation of contaminated

✉ Tel.: +38057-704-16-69. E-mail: v.samokhvalova@mail.ru

DOI: 10.15421/031522

soil and restoration of their resources, and, consequently, lower intensity of chemical and biological degradation of soils under the influence of technogenic pollution by HM; to improve the soil quality.

Key words: soil pollution, heavy metals, biological and chemical degradation, bioremediation method, *Trichoderma viride*, mycological drug *Trihodermin BT*, *Hordeum sativum*.

УДК 504.53.054;
631.41:504.53.054;
631.427.2; 631.465;
631.41

В. Л. Самохвалова¹ канд. с.-х. наук, стар. науч. сотр.
Т. А. Гринченко² д-р с.-х. наук, проф.
И. М. Журавлева²
О. В. Мандрыка¹

¹Національний науковий центр «Інститут ґрунтознавства та агрохімії ім. О. Н. Соколовського», вул. Чайковська, 4, м. Харків, Україна, 61024, тел.: +38057-704-16-69, e-mail: v.samokhvalova@mail.ru

²Харківський національний педагогічний університет ім. Г. С. Сковороди, вул. Блюхера, 2, корпус Б, м. Харків, Україна, 61168

БИОРЕМЕДИАЦИЯ СИСТЕМЫ «ПОЧВА – ПОЧВЕННАЯ БИОТА – РАСТЕНИЕ» ПРИ ЗАГРЯЗНЕНИИ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ КАК ФАКТОРА ХИМИЧЕСКОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДЕГРАДАЦИИ

Аннотация. На базе результатов почвенно-геохимических исследований зон влияния источников техногенных эмиссий загрязнений и проведения серии лабораторных экспериментов разработан методический подход по биоремедиации загрязненной тяжелыми металлами (ТМ) системы «почва – почвенная биота – растение». Использовано установленное новое свойство активного биохимического агента микопрепарата *Триходермин БТ* на основе микокультуры вида *Trichoderma viride* – способность интенсифицировать процессы биоремедиации и восстановления качества техногенно загрязненных ТМ почв. Биопрепарат *Триходермин БТ* использован в новом качестве биологического мелиоранта для предупреждения биологической и химической деградации почв с активизацией функционирования мико- и микробной системы почвы, повышением иммунного статуса и продуктивности растений *Hordeum sativum* и улучшения их качества. Обеспечивается биоремедиационный эффект при ограниченном сроке нахождения биопрепарата в почве, снижение норм его использования с усилением его биологической эффективности. Техническим результатом способа является расширения банка микопрепаратов, как природных средств с эффектом удобрения, с одновременным распространением эффективного действия активного агента биопрепарата на другие компоненты исследуемой системы с получением новых биологических эффектов при одновременной экологической стабилизации среды, активизации природного биологического потенциала почвы и экономии в использовании ресурсов.

Ключевые слова: почвы, загрязнение, тяжелые металлы, биологическая и химическая деградация, биоремедиация, способ, *Trichoderma viride*, микопрепарат *Триходермин БТ*, *Hordeum sativum*.

УДК 504.53.054;
631.41:504.53.054;
631.427.2; 631.465;
631.41

В. Л. Самохвалова¹ канд. с.-г. наук, стар. науч. співр.
Т. О. Гринченко² д-р с.-г. наук, проф.
І. М. Журавльова²
О. В. Мандрыка¹

¹Національний науковий центр «Інститут ґрунтознавства та агрохімії ім. О. Н. Соколовського», вул. Чайковська, 4, м. Харків, Україна, 61024, тел.: +38057-704-16-69, e-mail: v.samokhvalova@mail.ru

²Харківський національний педагогічний університет ім. Г. С. Сковороди, вул. Блюхера, 2, корпус Б, м. Харків, Україна, 61168

БИОРЕМЕДИАЦИЯ СИСТЕМЫ «ҐРУНТ – ҐРУНТОВА БИОТА – РОСЛИНА» ПРИ ЗАБРУДНЕННІ ВАЖКИМИ МЕТАЛАМИ ЯК ФАКТОРУ ХІМІЧНОЇ ТА БІОЛОГІЧНОЇ ДЕГРАДАЦІЇ

Анотація. За результатами ґрунтово-геохімічних досліджень зон впливу джерел техногенних емісій забруднення та проведення серії лабораторних експериментів розроблено

методичний підхід щодо біоремедіації системи «грунт – ґрунтова біота – рослина» при забрудненні важкими металами (ВМ) як фактору хімічної та біологічної деградації. Встановлено нову властивість активного біохімічного агенту мікопрепарату *Триходермін БТ* на основі мікокультури виду *Trichoderma viride* – здатність інтенсифікувати процеси біоремедіації та відновлення якості техногенно забруднених ВМ ґрунтів. Біопрепарат *Триходермін БТ* було використано у новій якості біологічного меліоранту для попередження біологічної і хімічної деградації ґрунтів з активізацією функціонування міко- та мікробної системи ґрунту, підвищенням імунного статусу і продуктивності рослин *Hordeum sativum* та поліпшення їх якості, чим забезпечується отримання біоремедіаційного ефекту за обмеженого терміну зберігання біопрепарату у ґрунті, зниження норм його використання з одночасним посиленням його біологічної ефективності. Технічним результатом способу є удосконалення біоремедіації техногенно забруднених ВМ ґрунтів за рахунок розширення банку мікопрепаратів як природних засобів з ефектом добрива, з одночасним поширенням ефективної дії активного агенту біопрепарату на інші компоненти досліджуваної системи з отриманням нових біологічних ефектів за одночасної екологічної стабілізації середовища, активізації природного біологічного потенціалу ґрунту і економії у використанні ресурсів.

Ключові слова: ґрунти, забруднення, важкі метали, біологічна та хімічна деградація, біоремедіація, спосіб, *Trichoderma viride*, мікопрепарат *Триходермін БТ*, *Hordeum sativum*.

ВСТУП

Внаслідок зростання рівнів забруднення довкілля відбувається поширення забруднювачів у всіх складових навколишнього середовища та міграція за трофічними ланцюгами, що відображається у зниженні якості, насамперед, ґрунтів та їх біологічної (Samokhvalova et al., 2006) та біохімічної складової (Samokhvalova et al., 2008).

Розробка нових та удосконалення існуючих методів ремедіації хімічно деградованих ґрунтів, відновлення їх структури, функцій та властивостей є актуальною проблемою за умов зростаючих техногенних та технологічних навантажень на ґрунтовий покрив, погіршення екологічного стану ґрунтів різного генезису. Основою для вирішення цієї задачі є нові методичні підходи щодо хімічної, фізичної та біологічної ремедіації забруднених важкими металами (ВМ) ґрунтів. Розробка нових способів як результат інноваційної діяльності у сфері відновлення та охорони ґрунтів від забруднення має передбачати обов'язкове проведення патентно-інформаційних досліджень тенденцій розвитку за обраним напрямом.

Відновлення техногенно забруднених ВМ ґрунтів при використанні біологічних методів є напрямом, що нині динамічно розвивається. Найбільш поширеними та динамічно розвиненими напрямами детоксикації і деконтамінації хімічно забруднених ґрунтів є групи методів біодеградації забруднення і біонакопичення за ефективного використання наступних переваг: екологічна чистота й безпека використання біологічних методів ремедіації; мінімальне порушення фізичного й хімічного складу ґрунтів; їх застосування не потребує значних витрат матеріальних ресурсів, а широке їх впровадження знижує собівартість проведення таких робіт; висока ефективність за низьких концентрацій забруднювача. Отже, біологічні методи ремедіації забезпечують екологічно безпечне поліпшення стану ґрунтів без кардинального втручання у природні процеси (Samokhvalova, 2014).

Відповідно до запропонованої нами концептуальної моделі використання біологічних методів на забруднених ґрунтах (Samokhvalova, 2014), оптимізація ґрунтового середовища та поліпшення властивостей ґрунтової системи, біодетоксикація та біодеконтамінація через розширення популяцій ґрунтових мікроорганізмів, використання рослин фітомеліорантів різних ботанічних родин (Samokhvalova et al., 2014, 2015), розробка мікробних та ферментних і мікопрепаратів за одночасного впливу на біологічну та косну складову ґрунту є базовими положеннями.

Аналіз та ранжування відомих сучасних способів біоремедіації системи «грунт – рослина» моно- та поліелементно забрудненої ВМ свідчить про використання широкого спектру біопрепаратів. Так, відомо спосіб щодо ремедіації девастрованих земель (Taras et al., 2014), що включає використання мікопрепарату, створеного на основі суміші спор симбіотичних грибів: маслока звичайного, трюфеля чорного та вирощених штамів мікоризних грибів – індикаторів конкретного виду забруднення, виділених з ґрунту, який підлягає рекультивації та ремедіації, змішаних у рівних співвідношеннях, з розрахунку не менше 60 тис. спор в 1 л суспензії та іммобілізованих на желатиновому носії. Проте недоліком даного способу є не урахування ризику можливого проявлення антагонізму маслока звичайного чи трюфеля чорного з іншими, виділеними із забрудненого ґрунту, штамів грибів, що, в свою чергу, значно знижує ефективність способу та застосування даних грибів у цілях біоремедіації земель.

Інший відомий спосіб очищення ґрунтів від ВМ (Yudin, 2005), що передбачає застосування біопрепарату на основі гумінових речовин, що отримують шляхом змішування у певному співвідношенні у дезінтеграторі за подрібнення торфу, пташиного посліду та луку з додаванням води. Біопрепарат характеризується відновними функціями щодо оксидів ВМ і може використовуватися для поліпшення екології ґрунтів з підвищенням вмісту гумусу з відновленням біоти у ґрунтах. Проте безумовними недоліками способу є обмеженість його застосування на ґрунтах тільки профілактично і для зниження ступеня забруднення шляхом нейтралізації токсичності лише оксидів ВМ, які, як відомо, є водонерозчинними сполуками у ґрунтах.

Відомий мікробіологічний спосіб на забруднених ВМ ґрунтах (Kuznesova, Najrullin, 2009) передбачає застосування за новим призначенням біопрепарату зі штамом бактерій *Bacillus subtilis 11B* та концентрацією $1,0 \times 10^6 - 1 \times 10^8$ клітин у 1 мл, що має широкий спектр антагоністичної активності до фітопатогенних бактерій і грибів з підвищенням схожості насіння злакових рослин на забруднених ВМ ґрунтах. Проте за позитивного впливу на насіння рослин не зафіксовано позитивного впливу способу на інші показники функціонування рослин та характеристики властивостей ґрунту за невідомих наслідків інтродукції запропонованого у способі штаму бактерій у ґрунтовий біоценоз, що значно обмежує застосування способу в системі «грунт – мікроорганізми – рослина». До того ж відомо, що видовий склад, чисельність і структура спороутворюючих аеробних бактерій роду *Bacillus* відповідно до природно-кліматичних умов закономірно зонально змінюється та може ефективно застосовуватись тільки на тих ґрунтах, з яких було виділено цей штам бактерій, що значно обмежує їх використання на ґрунтах різного генезису та потребує додаткового отримання активних штамів-інактиваторів забруднювачів при відповідному збільшенні витрат на досягнення технічного результату.

Найбільш близьким за механізмом біологічної ремедіації ґрунту, забрудненого ВМ, технологічним виконанням і результатом, що досягається, є спосіб (Maklyuk, 2011), що включає передпосівну бактеризацію насіння за використання біопрепарату, що містить як біоагент активні штами бактерій *B531* роду *Bacillus*, адаптованих до тих ґрунтово-кліматичних умов, з яких їх було виділено. Спосіб підвищує біологічну активність ґрунту, покращує продуктивність рослинної продукції. Проте, недоліками способу слід вважати: 1) обмеженість способу на ґрунтах інших типів з можливістю його використання лише на чорноземі опідзоленому важкосуглинковому, де активні штами бактерій *B531* роду *Bacillus* ефективно діють за моноелементного забруднення ґрунту ВМ; 2) трудомісткість отримання, виділення та зберігання чистих бактеріальних культур роду *Bacillus* за необхідності отримання накопиченої культури і створення селективних умов, постійного мікроскопічного контролю чистоти культур бацил та їх фітотоксичності тощо, значно збільшують вартість робіт всіх етапів отримання і застосування штамів бактерій роду *Bacillus*; 3) за неоднозначності впливу бактеризації на систему «грунт – мікроорганізми – рослини» необхідним є

обов'язкове урахування специфічності штамів і різної біологічної активності спороутворюючих аеробних бактерій роду *Bacillus* на ґрунтах різних типів, рослинах різних видів та родин разом зі специфікою формування мікробіоти прикореневої зони рослин; 4) необхідним є обов'язкове урахування як токсичності окремих видів роду *Bacillus*, так і активності функціонування і змін родового, видового складу інших ґрунтових мікроорганізмів і грибів та їх конкурентної взаємодії у системі «ґрунт – мікроорганізми – рослина».

Обмеженість використання бактеріальних препаратів за умов забруднення ґрунту ВМ, у тому числі із залученням видів роду *Bacillus*, внаслідок багатофакторності впливу на їх ефективність у системі «ґрунт – мікроорганізми – рослина» актуалізує необхідність проведення більш поглиблених досліджень біоскладової ґрунту, що значно підвищує витратність ресурсів на досягнення технічного результату щодо біоремедіації техногенно забруднених ВМ ґрунтів. Таким чином, доцільним є залучення більш стійких або толерантних до забруднення ВМ груп ґрунтової біоти, наприклад, мікобіоти, що характеризуються значно більшою біохімічною активністю, достатньою чисельністю домінуючих родів і видів у ґрунтах, також антагоністичними властивостями широкого спектру дії відносно ґрунтових патогенів (наприклад, гриби роду *Aspergillus*, *Fusarium*, що активно розвиваються за умов забруднення ВМ), біостимуляційним ефектом відносно рослин та відсутністю фітотоксичності; схожими з рослинами фізіолого-біохімічними механізмами регуляції та стійкого функціонування у присутності надлишку ВМ у ґрунтах та біологічними механізмами їх ремедіації.

Мета дослідження – розробити спосіб біоремедіації системи «ґрунт – ґрунтова біота – рослина» при забрудненні ВМ як фактору хімічної та біологічної деградації за рахунок розширення банку мікопрепаратів як природних засобів з ефектом добрива, з одночасним поширенням ефективної дії активного агента біопрепарату на інші компоненти досліджуваної системи з отриманням нових біологічних ефектів за одночасної екологічної стабілізації середовища, активізації природного біологічного потенціалу ґрунту і економії у використанні ресурсів.

Розробку способу спрямовано: 1) на сприяння реалізації екологобезпечного шляху біоремедіації ґрунту за використання мікопрепарату, чим забезпечується екологічна стабілізація середовища системи забруднений ґрунт-мікробіоценоз-рослина за одночасної нейтралізації негативних процесів забруднення та поліпшення екологічного стану ґрунту шляхом активізації природного біологічного потенціалу ґрунту, продуктивності рослин; 2) на збереження природних біологічних властивостей ґрунту за створення оптимальних умов для формування мікро- та мікобіоти ґрунту з більш високим рівнем біологічної активності і утворення оптимальних умов функціонування компонент системи ґрунт-ґрунтова біота-рослина для проведення ефективної біоремедіації забруднених ВМ ґрунтів та відновлення їх якості, попередження біологічної та хімічної деградації ґрунтів; 3) на сприяння збільшенню біологічної активності біопрепарату, чим забезпечується економія його використання та застосування інших ресурсів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Розроблення способу включало:

1) Проведення патентного пошуку згідно з ДСТУ 3575; Об'єкти патентного пошуку – об'єкти авторського права, які запатентовано в Україні та країнах СНД, ЄС в площині поставленої мети. Предмет пошуку – спосіб в цілому; окремі операції (етапи) способу, що є самостійним патентоспроможним об'єктом; способи їх одержання і галузь застосування; обладнання, що використовують при здійсненні способу; методичні підходи щодо біоремедіації забруднених ґрунтів різного генезису. Методи досліджень – експертна оцінка, аналіз, співставлення.

2) Польовий етап – ґрунтово-геохімічні дослідження на локальному і регіональному рівнях, в тому числі за умов сталого впливу джерел атмотехногенних емісій забруднення неорганічної природи Зміївської ТЕС ПАТ «Центрэнерго» НАК «Енергетична компанія України» Харківської області та проведення серії лабораторних і вегетаційних дослідів. Об'єкти дослідження – чорноземні ґрунти Лісостепової природно-кліматичної зони України при впливі забруднення ВМ та при його відсутності; мікропрепарат *Триходермін БТ*, що містить спори ґрунтових сапротрофних мікроміцетів-антагоністів роду *Trichoderma Pers.*, виду *Trichoderma viride*, відділу *Ascomycota*, родини *Hypocreaceae* (Штам 16 ЦКМ F-59М, Державне свідоцтво №01406; ТОВ «Защита-Агро» НААН України); методи досліджень – універсальні загальнонаукові методи, методи теоретичного аналізу, системний та екосистемний підходи, ландшафтно-геохімічні методи.

3) Аналітичний етап з використанням лабораторно-аналітичних методів досліджень при визначенні рівнів вмісту рухомих форм МЕ і ВМ у чорноземних ґрунтах з використанням екстрагентів ацетатно-амонійного буферного розчину з рН 4,8 та 1н НСІ згідно з ДСТУ 4770.1 – ДСТУ 4770.9 та попереднього відбирання зразків з орного (0–20 см) шару ґрунту згідно з ДСТУ 4287:2004. Чисельність основних еколого-трофічних груп мікрофлори у зразках ґрунту визначалась методом мікробіологічного посіву ґрунтової суспензії на тверді поживні середовища (Zvyagintsev, 1985): середовище Ріхтера – мікроскопічні гриби, м'ясо-пептонний агар (МПА) – органотрофні бактерії; середовище Менкіної – мікроорганізми, що мобілізують органічні фосфати; середовище Муромцева – мікроорганізми, що мобілізують мінеральні фосфати; крохмально-аміачний агар (КАА) – мікроорганізми, що засвоюють азот мінеральних сполук і актиноміцети. Потенційну здатність ґрунту до накопичення аміачного та нітратного азоту визначалась за методом С. А. Вакмана (GOST 26951-86; Segi, 1983). Напруженість мінералізаційних процесів і трофічного режиму ґрунту визначено за розрахунковими показниками мінералізації та оліготрофності за співвідношенням окремих груп мікроорганізмів. На базі розрахунку сумарного біологічного показника за методиками Дж. Азці (Azzi, 1959) та В. Ф. Валькова (Valkov, 1999) розраховано інтегровані показники біогенності (ІПБ), біологічної активності (ІПБА) та біологічного стану ґрунту (ІПБС). Показники біохімічної активності ґрунту визначались за активністю ферментів різних класів (поліфенолоксидази, пероксидази, інвертази, дегідрогенази) згідно з методиками Л. А. Карягиної – Н. А. Михайловської (Karagiina, 1986) та А. Ш. Галстяном (Khaziev, 1982, 2005). Актуальну целюлозолітичну здатність ґрунтів визначено аплікаційним методом (Mishustin, 1963; Zvagintsev, 1980). Моніторинг продуктивності рослин проведено визначенням якісних та кількісних характеристик врожаю та визначенням транслокації забруднювачів у рослини за вмістом ВМ у солоній тест-культури ячмінь ярий (*Hordeum sativum*) за Б. А. Доспеховим (Dosphehov, 1985). Кількісний вміст хлорофілу в листках рослин визначали у спиртовій витяжці фотоколориметричним методом (Viktorov, 1969).

4) Камеральний етап – оцінювання мікроелементного статусу ґрунтів та вмісту ВМ проводили згідно з діючими нормативами і методичною базою за експертного оцінювання нормативно-довідкової документації, використовуючи встановлені фонові рівні вмісту МЕ (ВМ) для ґрунтів певної природно-кліматичної зони України (Fateev, Samokhvalova, 2012). Отриману аналітичну інформацію статистично обробляли із використанням модулів кореляційного, дисперсійного аналізів у рамках пакета *Statistica 10.0*.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За результатами інформаційно-аналітичних досліджень встановлено, що у ґрунті гриби роду *Trichoderma* пригнічують більш 60 видів патогенів (Senchakova, Svistova, 2008; Svistova, Senchakova, 2008, 2010) на широкому спектрі видів рослин, тому що у

процесі розвитку *Trichoderma* синтезує широкий спектр антибіотиків (Arnold, 1971), а також продукує інші біологічно активні речовини (ферменти), що також пригнічують розвиток патогенів і стимулюють ріст та розвиток рослин (Becker, 1988), посилення мобілізації елементів живлення рослин, що сприяє більш повному використанню рослинами захисних механізмів з підвищенням їх імунного статусу. Окрім того, за рахунок високої біологічної активності гриби роду *Trichoderma* активно розкладають органічні сполуки ґрунту з утворенням легкодоступних для рослин сполук, беруть участь у процесах амоніфікації та нітрифікації, посиленні мобілізації фосфору та калію, збагачуючи ґрунт рухомими сполуками елементів живлення. Тим самим позитивно впливаючи на функціонування мікроорганізмів та мікоценозу ґрунту, на взаємодію рослинно-мікробних систем (Marfenina, 2005).

Оскільки основними процесами мікробної трансформації ВМ є окисно-відновна біотрансформація і трансформація неорганічних сполук в органічні (Marfenina, 2005), то гриби мають властивості резистентності або толерантності до ВМ з біологічними механізмами, що включають внутрішньоклітинну акумуляцію, комплексоутворення, трансформацію металів шляхом окиснення, відновлення, метилування, біосорбцію клітинними стінками, пігментами або полісахаридами, зниження транспорту або проникності, внутрішньоклітинний розподіл, осадження і/або відчуження (Gadd, 1992, 2001). Таким чином забезпечується утворення оптимальних умов функціонування системи «ґрунт – мікроорганізми – рослина» для інтенсифікації процесів біоремедіації техногенно забруднених ВМ ґрунтів. До того ж, обмежений термін ефективної дії препарату *Триходермін БТ* на основі грибу роду *Trichoderma* (30 діб) може бути оптимальним і достатнім для вирішення завдання біоремедіації техногенно забрудненого ВМ ґрунту.

За результатами проведення польових досліджень системи «ґрунт – ґрунтова біота – рослина» в зонах техногенного впливу емісії ВМ нами було встановлено (Samokhvalova, Fateev, 2006), що таксономічний склад мікоценозу ґрунту за умов забруднення складають гриби родів *Mucor*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Aspergillus* (рис. 1). При високих рівнях забруднення ґрунту ВМ відсоток грибів роду *Trichoderma*, що не є фітопатогенними, у мікоценозі ґрунту суттєво збільшувався відповідно до 13 %, що свідчить про стійкість їх функціонування при надлишку ВМ у ґрунтах. Серед роду грибів *Trichoderma* було встановлено найбільшу активність у виду *Trichoderma viride*. Також було встановлено, що гриби, порівняно з бактеріями ґрунту, є більш стійкими до забруднення ВМ, антагонізм і ефект пригнічення розвитку окремих бактерій грибами, які складають конкуренцію аборигенній мікрофлорі.

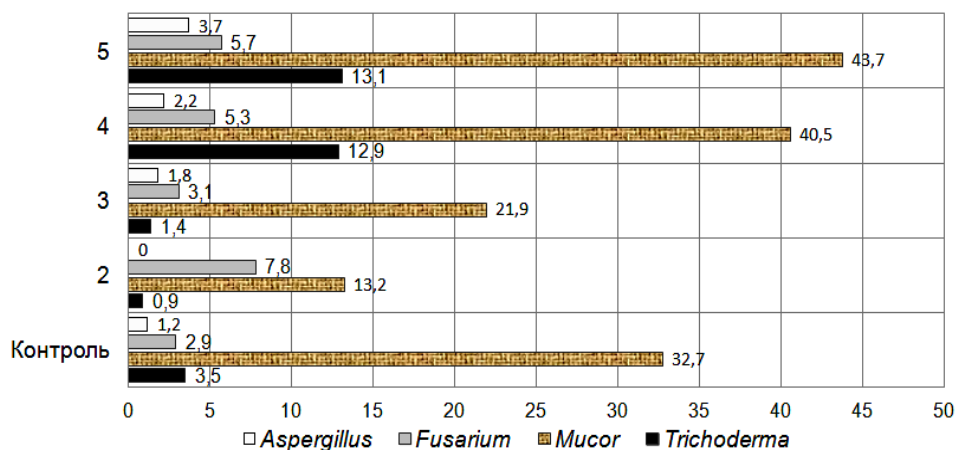
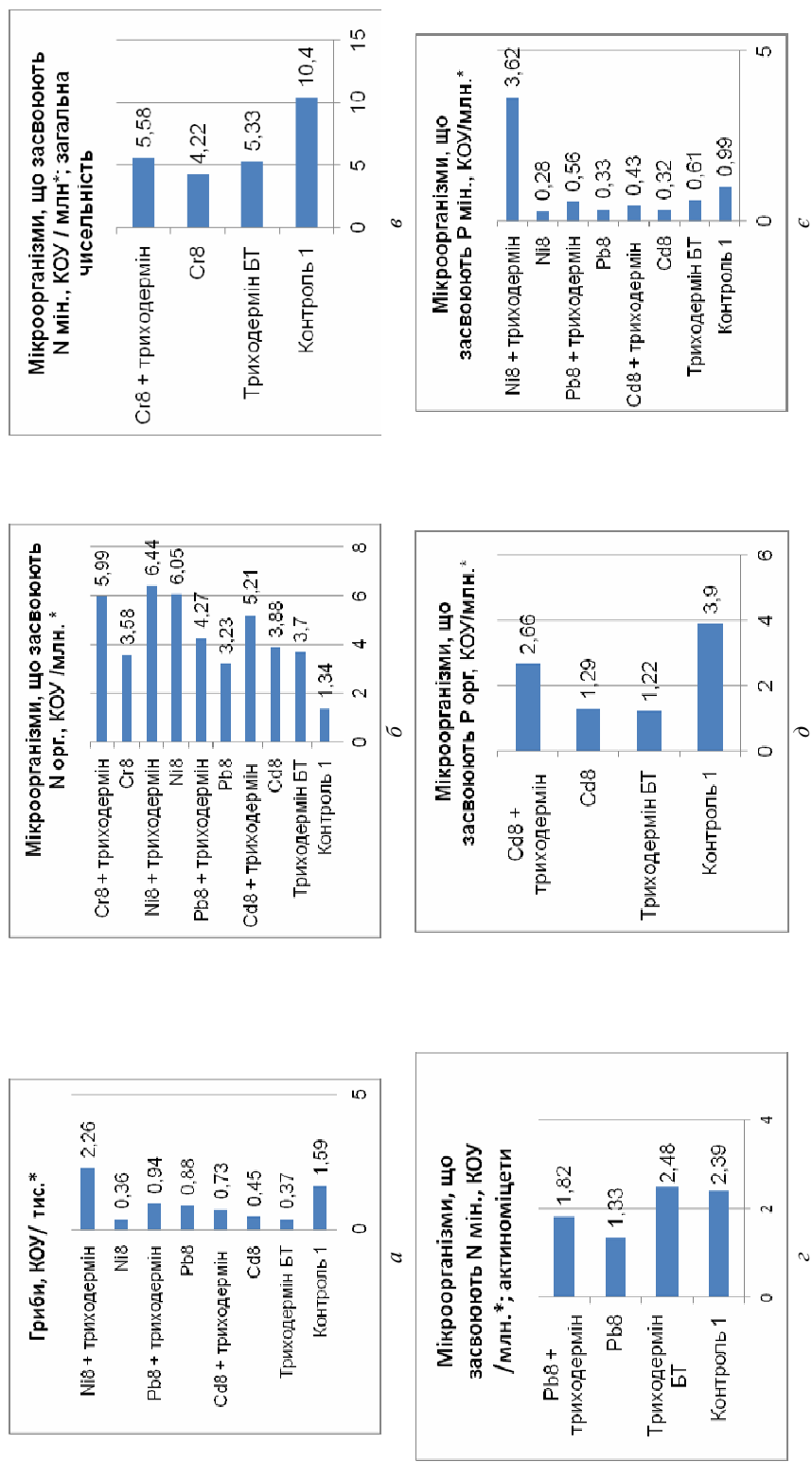


Рис. 1. Таксономічний склад мікоценозу ґрунту за умов забруднення ВМ, % від загальної кількості мікроскопічних грибів

За результатами проведення довгострокових модельних досліджень (мікропольового, лабораторного) з ефективності біопрепарату *Триходерміну БТ* на основі мікокультури виду *Trichoderma viride*, було встановлено нову властивість мікопрепарату, а саме: здатність інтенсифікувати процеси біоремедіації та відновлення якості техногенно забруднених ВМ ґрунту, що дозволило використати мікопрепарат у новій якості – як біологічного меліоранту для попередження біологічної та хімічної деградації ґрунту.

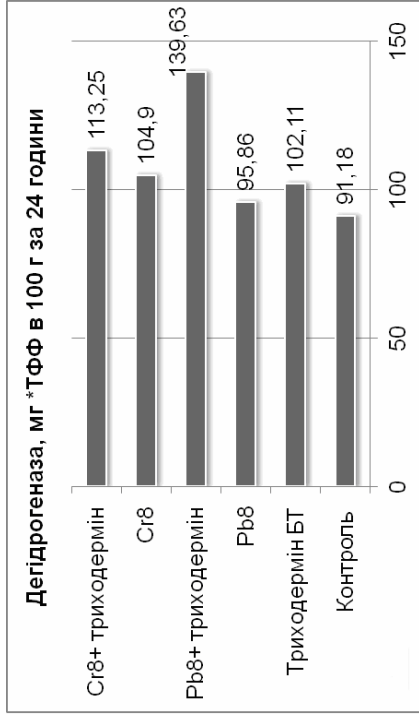
Запропонований спосіб полягає у визначенні на забруднених ґрунтах рівнів вмісту легкорухомих та обмінних рухомих форм МЕ і ВМ у ґрунтах методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії використовуючи ацетатно-амонійний буферний розчин з рН 4,8 та 1н НСІ (екстрагенти ВМ) та визначенні типу і рівня забруднення ґрунту за оцінювання екологічного стану ґрунту певного типу. Отримані дані зводять у таблицю та візуалізують на діаграмах, що характеризують найвищий досліджуваний рівень забруднення ґрунту рухомими формами ВМ у 8 кларків перевищення фонового рівня їх вмісту та експериментально встановлену ефективну концентрацію біоагенту у складі мікопрепарату *Триходермін БТ* (рис. 2–5). Далі на забрудненому ґрунті застосовують біопрепарат *Триходермін БТ*. Для отримання максимального біоремедіаційного ефекту грибний препарат вносять щорічно при оранці навесні безпосередньо у ґрунт у вигляді порошку згідно з ТУ У 24.2-00011050-254:2005 або робочого розчину (40–60 мл на 2 л теплої води) у день його виготовлення за 5–6 днів до посіву рослин і температури повітря вище 12 °С з метою стимуляції антагоністичної дії гриба-сапрофіта *Trichoderma viride*. Після внесення препарату проводять боронування ґрунту легкими боронами.

Ефективність застосування біопрепарату *Триходермін БТ* на забрудненому ВМ ґрунті, наприклад, Cd, Pb, Ni і Cr встановлено зростанням біогенності ґрунту за позитивного впливу на його біологічну компоненту, використовуючи відомі методи мікробіологічних та біохімічних досліджень ґрунту та показники його мікробіологічної і ферментативної активності. Результати, що сформовано у відповідні таблиці за блоками для зручності користування, також підтверджують зростання біологічної активності самого препарату. Таким чином, доведено ефективний вплив запропонованого мікопрепарату, насамперед, на функціональну структуру мікробного ценозу з урахуванням основних еколого-трофічних угруповань та, відповідно, показників мікробіологічного стану ґрунту (рис. 2); активності ферментів різних класів (рис. 3): дегідрогенази (клас оксидоредуктаз, рис. 3, а), що відіграє провідну роль у окислювально-відновлювальних процесах ґрунту, синтезі гумусових речовин у ґрунті; інвертази (клас гідролаз, рис. 3, в), що впливає на збагачення ґрунту доступними для рослин і мікроорганізмів поживними речовинами, руйнуючі високомолекулярні органічні сполуки; нітрифікаційної (рис. 3, б) і амоніфікаційної здатності (рис. 3, г); актуальної целюлозолітичної здатності за структурної перебудови мікробних ценозів і специфічного впливу ВМ (рис. 4) – Cd (рис. 4, в); Pb (рис. 4, г); Ni (рис. 4, д); Cr (рис. 4, е) у порівнянні з контролем (рис. 4, а) та використанням мікопрепарату (рис. 4, б). Так, позитивний вплив ефективної дози мікопрепарату встановлено аплікаційним методом в умовах оптимальної температури і вологості ґрунту результатами щодо показників загальної целюлозолітичної активності забрудненого ВМ чорнозему типового, досліджених у два терміни – 3 та 6 тижнів (рис. 4). Обробка ґрунту біопрепаратом *Триходермін БТ* стимулювала целюлозолітичну активність до 20,9 %. Застосування триходерміну на забрудненому Cd, Pb, Cr ґрунті підвищило інтенсивність целюлозолітичної активності ґрунту до 21 %, що також підтверджує ефективність біоремедіації. До того ж через 6 тижнів позитивний ефект підвищився (контроль – 46,5 %, середній рівень інтенсивності; триходермін – 65,6 %, сильний рівень розкладу; на варіантах з забрудненням ґрунту ВМ – суттєве гальмування целюлозолітичної активності ґрунту – до 21,1–27,9 %, НІР 3,94 % та P=0,95; вплив варіантів складав 98 %, критерій Фішера F_{факт.} = 121, F_{табл.} = 2,5).

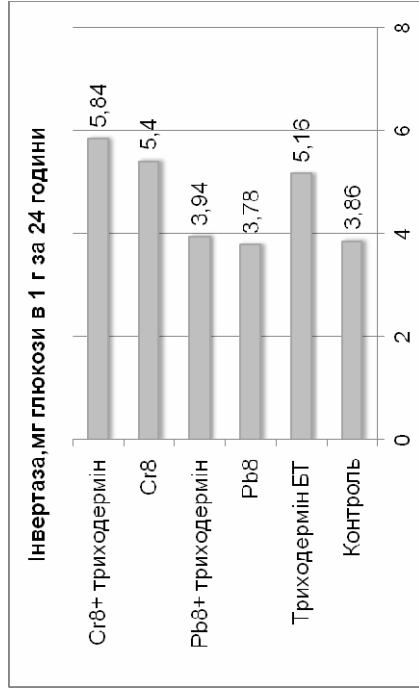


Примітка: *КОУ/тис. або млн. – чисельність основних груп мікроорганізмів у колонієутворюючих одиницях.

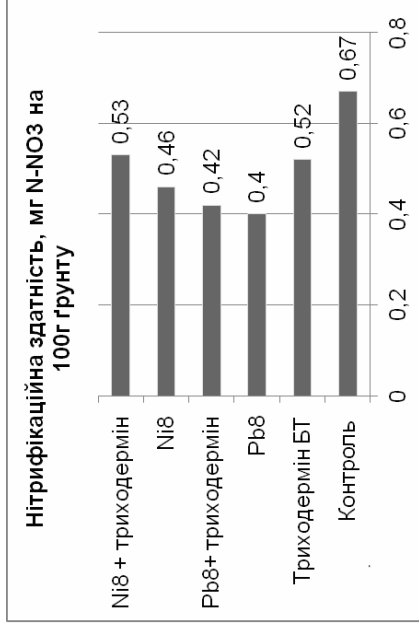
Рис. 2. Мікробіологічна активність забрудненого ґрунту за використання мікопрепарату *Триходермін БТ*



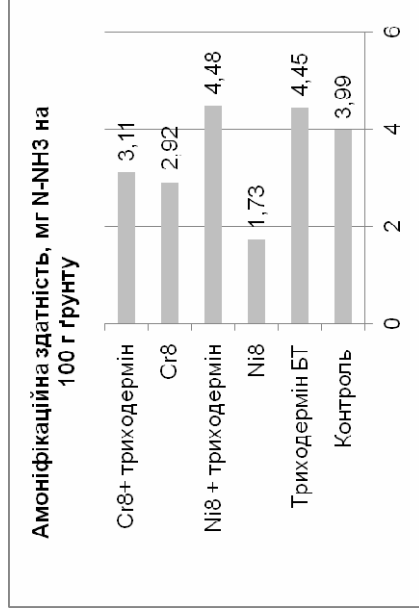
а



б



в



г

Примітка: *ТФФ – трифенілформазан.

Рис. 3. Біохімічна активність забрудненого ґрунту за використання мікопрепарату *Триходермін БТ*

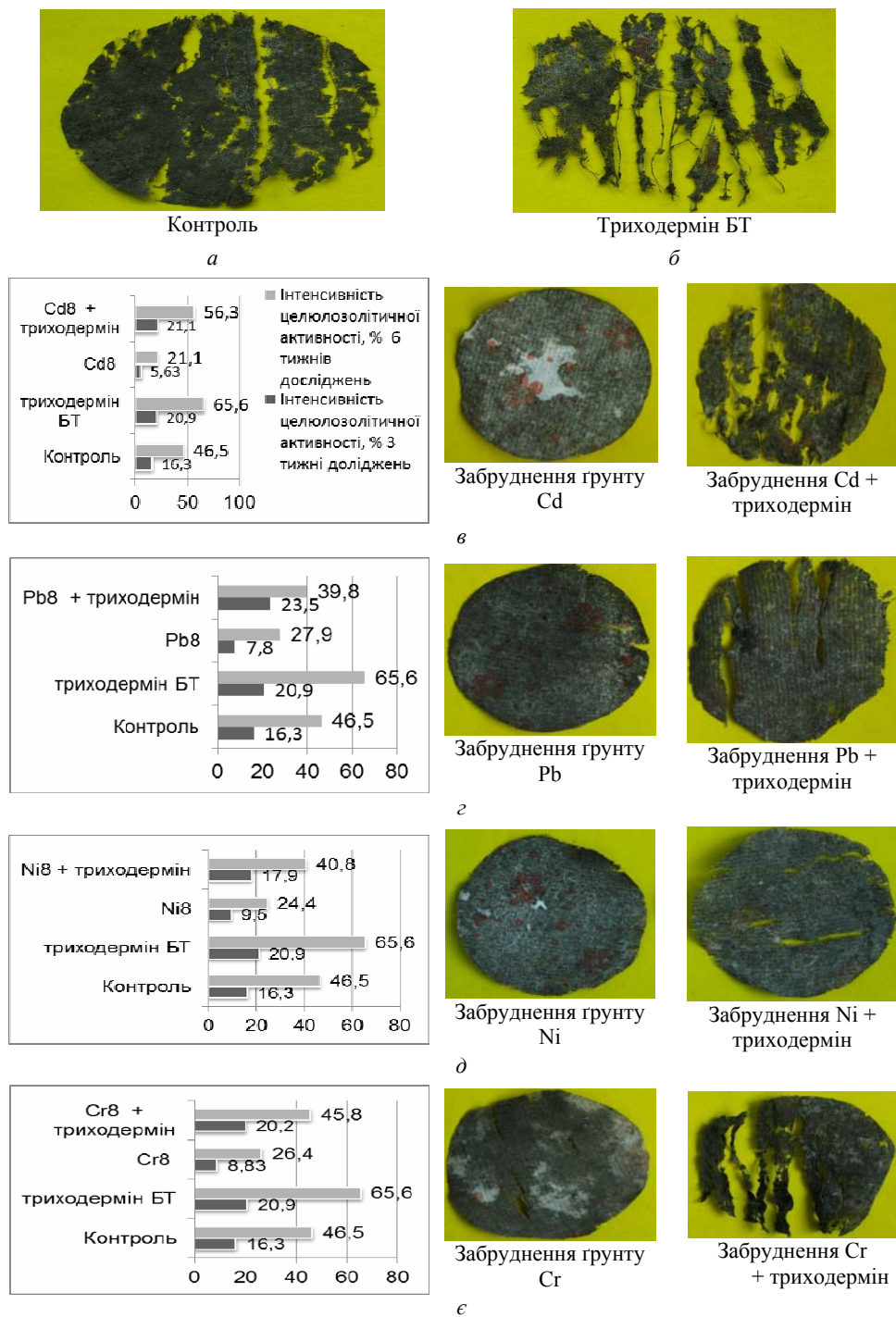


Рис. 4. Вплив застосування *Триходерміну БТ* на целюлозолітичну активність забрудненого ВМ ґрунту

Інтенсивність розкладу клітковини, що є індикатором швидкості трансформації органічної речовини в ґрунті та обумовлює рівень вивільнення поживних речовин з органічних решток, визначали за деградацією лляної або бавовняної тканини. А

оцінювання інтенсивності розкладу тканини проводили за шкалою (%): дуже слабка – < 10; слабка – 10–30; середня – 30–50; сильна – 50–80; дуже сильна – > 80 %.

Отже, внесення триходерміну при забрудненні ВМ забезпечило посилення інтенсивності целюлозолітичної активності на 35,2 % на фоні надлишку Cd, на 19,4 % – при забрудненні Cr, на 16,4 % – при забрудненні Ni і на 11,9 % – при впливі надлишку Pb. Такий результат підтверджує високу біологічну активність мікопрепарату *Триходермін БТ*, що забезпечує активне розкладання органічних сполук та зростання целюлозолітичної активності чорнозему типового.

Також позитивний вплив біопрепарату *Триходермін БТ* у системі ґрунт-ґрунтова біота підтверджено розрахунковими показниками трансформації органічних речовин та мінералізації, інтегральних показників біологічного стану і біогенності ґрунту (рис. 5).

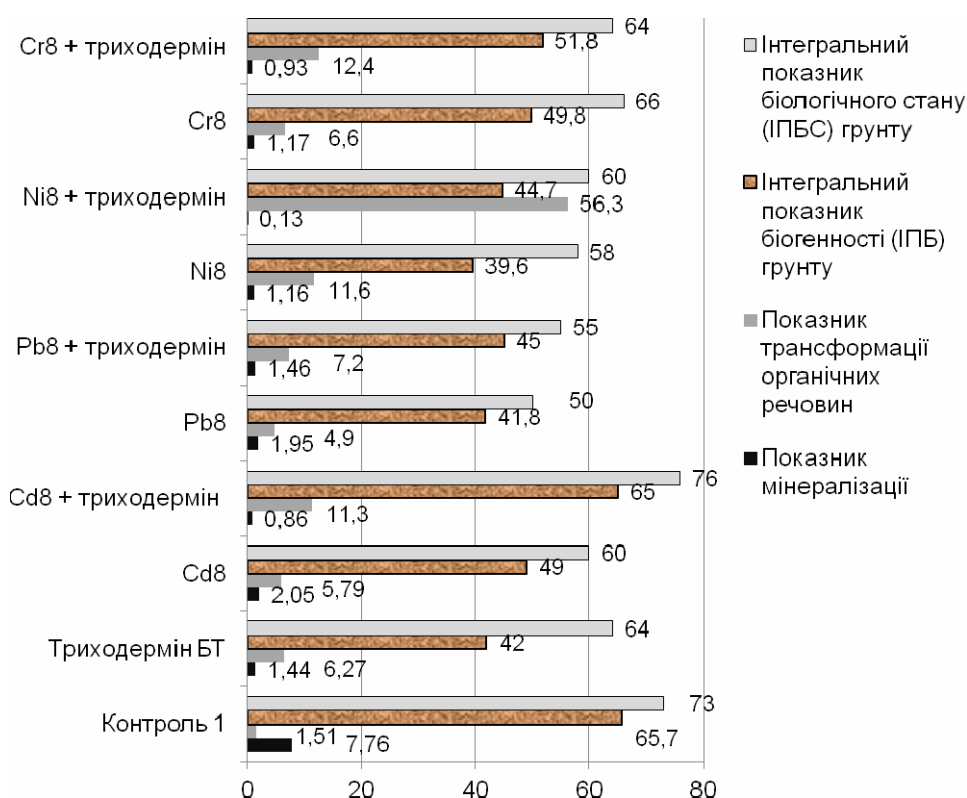


Рис. 5. Оцінювання ефективності біоремедіації забрудненого ґрунту при використанні мікопрепарату *Триходермін БТ* та інтегральних показників біологічного стану і біогенності ґрунту

Оскільки мікопрепарати, як і гриби ґрунту, часто проявляють фітотоксичність, тому досліджено вплив біопрепарату на посівну якість насіння (схожість, ріст, розвиток) кукурудзи (*Zea mays*) (Berestetskiy, 1971), продуктивність рослин та вміст хлорофілу в зеленій масі ячменю (*Hordeum vulgare*) при забрудненні ВМ. Отриманими результатами доведено, що *Триходермін БТ* не тільки гальмує негативний вплив ВМ, наприклад Cd (табл. 1), на розвиток головного кореня, але і стимулює появу додаткових коренів при впливі забруднення ґрунту ВМ.

Окрім того доведено ефективність запропонованого способу при збільшенні показників біомаси рослин ячменю та вмісту хлорофілу, знижено вміст ВМ у рослинах, що вирощено на забрудненому ґрунті (рис. 6), що свідчить про позитивний

вплив мікопрепарату *Триходермін БТ* з високо ефективним біоагентом *Trichoderma viride* на формування продуктивності тест-культури, що також підтверджує ефективність біоремедіації забрудненого ВМ ґрунту.

Таблиця 1

Вплив біопрепарату на посівну якість насіння (схожість, ріст, розвиток) кукурудзи (*Zea mays*)

Варіанти	Довжина, мм		
	головного кореня	додаткових коренів	пагонів
Забруднений Cd ґрунт	50,3	23,8	25,7
Забруднений Cd ґрунт + Триходермін БТ	60,4	53,6	64,7
НІР 0,95	8,05	6,10	5,86

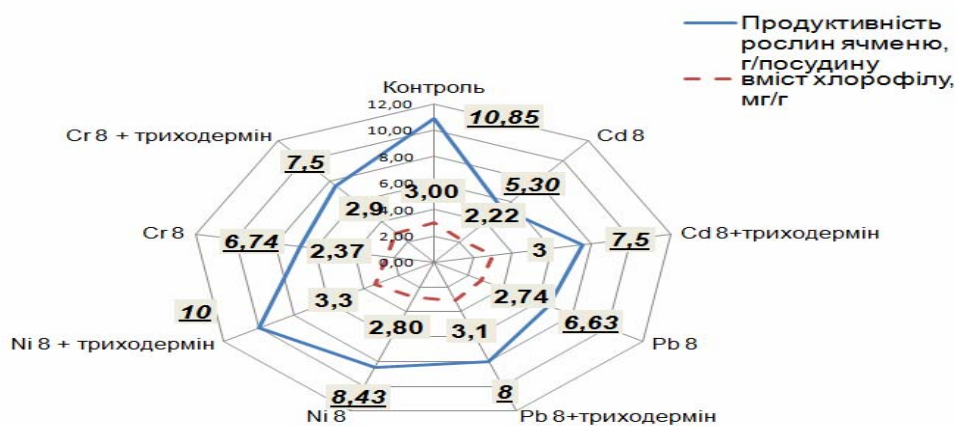
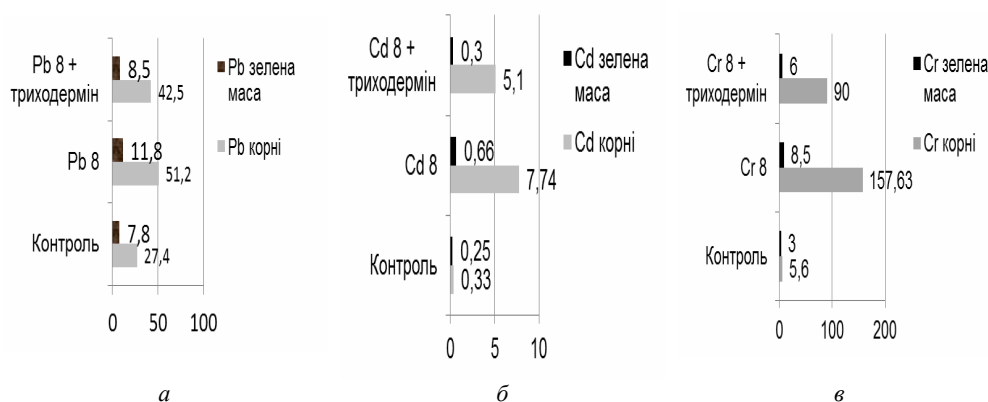


Рис. 6. Вплив біоремедіації забрудненого ґрунту на показники вмісту ВМ, біомаси рослин ячменю та вміст хлорофілу

Розроблений спосіб біоремедіації системи «ґрунт – ґрунтова біота – рослина» при забрудненні важкими металами як фактору хімічної та біологічної деградації доцільно використовувати в агроекології, екоменеджменті ґрунтів при екологічному контролі техногенно забруднених ґрунтів земельних ділянок різного призначення та їх використання; у науково-дослідній практиці – для розробки системи заходів щодо біологічної ремедіації забруднених територій у складі комплексу біологічних

технологічних прийомів відновлення забруднених ґрунтів та відтворення їх ресурсного потенціалу, і, як наслідок, зниження інтенсивності процесів хімічної і біологічної деградації ґрунтів при впливі техногенного забруднення ВМ; для поліпшення якості ґрунтів

Методичну розробку захищено охоронним документом (патент на корисну модель UA № 100982 від 25.08.2015).

ВИСНОВКИ

Відмінними рисами та перевагами запропонованого технічного рішення у порівнянні з відомими способами та підходами, є такі:

– сприяння реалізації екологобезпечного шляху біоремедіації ґрунту при використанні мікопрепарату, чим забезпечується екологічна стабілізація середовища системи «забруднений ґрунт – мікробіоценоз – рослина» при одночасній нейтралізації негативних процесів забруднення та поліпшення екологічного стану ґрунту шляхом активізації природного біологічного потенціалу ґрунту, продуктивності рослин;

– забезпечення збереження природних біологічних властивостей ґрунту при створенні оптимальних умов для формування мікро- та мікобіоти ґрунту з більш високим рівнем біологічної активності і утворення оптимальних умов функціонування компонент системи «ґрунт – ґрунтова біота – рослина» для проведення ефективної біоремедіації забруднених ВМ ґрунтів та відновлення їх якості, попередження біологічної та хімічної деградації ґрунтів;

– сприяння збільшенню біологічної активності біопрепарату, чим забезпечується економія його використання та застосування інших ресурсів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ / REFERENCES

Arnold, G. R. V., 1970. Predvaritelnyj obzor mikofilnyh gribov SSSR [A preliminary review mikofilik mushrooms USSR], News systems. Lower plants, 7, 108–120 (in Russian).

Azzi, J., 1959. Selskokhoziaistvennaia ekoloziya [Agricultural Ecology], Moscow, Leningrad (in Russian).

Becker, Z. E., 1988. Fiziologija i biohimija gribov [Physiology and biochemistry of fungi], Publishing House of Moscow University, Moscow (in Russian).

Berestetskiy, O. A., 1971. Metody opredelenija toksichnosti pochvy. Mikrobiologicheskie i biohimicheskie issledovanija [Methods for determining the toxicity of the soil], Microbiological and biochemical studies, Urozhaj, Kyiv (in Russian).

Dospheov, B. A., 1985. Metodika polevogo opyta (s osnovami statisticheskoy obrabotki rezul'tatov issledovanij [Methodology field experience (with the basics of statistical processing of research results)], Agropromizdat, Moscow (in Russian).

Fateev, A. I., Samokhvalova, V. L., 2012. Diahnostyka stanu khimichnykh elementiv systemy hrunt-roslyna. Metodyka [Diagnosis of the state of the chemical elements the soil-plant

systems. Methods], Kharkiv KP «Urban Typography», Kharkiv (in Ukrainian).

Fateev, A. I., Samokhvalova, V. L., Naidenova, O. E., 2006. Analiz stanu zabrudnenoho vazhkymy metalamy gruntu za mikrobiologichnymi pokaznykamy [Analysis of soil contaminated with heavy metals microbiological indicators], Bulletin of KNU. Karazin. Series: Biology, 3, 729, 158–168 (in Ukrainian).

Gadd, G. M., 1992. Interactions of fungi with toxic metals, New Phytol., 124, 25–60.

Gadd, G. M., 2001. Fungi in bioremediation. Metal transformations. Fungal metal biosorption, UK, Cambridge University Press., 359–445.

GOST 26951-86. Pochvy. Opredelenie nitratov ionometricheskim metodom. Osnovnye mikrobiologicheskie i biohimicheskie metody issledovanija pochvy: metodicheskie rekomendacii [GOST 26951-86. Soils. Determination of nitrate potentiometric method basic microbiological and biochemical research methods of soil: guidelines], ARRIAM, Leningrad, 108–114 (in Russian).

Karyagina, L. A., Mikhajlovskaya, N. A., 1986. Opredelenie aktivnosti polifenoloksidazy i peroksidazy v pochve [Determination of polyphenol oxidase and peroxidase activity in

- soil], News Byelorussian Academy of Sciences, a series of Agricultural Sciences, Minsk, 2, 40–41 (in Russian).
- Khaziev, F. H., 1982.** Sistemno-jekologicheskij analiz fermentativnoj aktivnosti pochv [System-ecological analysis of the enzymatic activity of soil], Nauka, Moscow (in Russian).
- Khaziev, F. H., 2005.** Metody pochvennoj jenzimologii [Methods of soil enzymology], Nauka, Moscow (in Russian).
- Kuznecova, T. N., Hajrullin, R. M., 2009.** Pat. na poleznuju model' 2354690 RU. Sredstvo dlja povyshenija vshozhesti semjan zlakovyh rastenij v pochvah, zagrijaznennyh tjazhelymi metallami [Pat. for useful model 2354690 RU, MPK (51) of the MPK (2006.01): C12N 1/20, A01C 1/02, C12R 1/125 means to improve seed germination of cereal plants in soils contaminated with heavy metals], № 2007110307/13; appl. 21.03.2007; publ. 10.05.2009, Bull. 13 (in Russian).
- Maklyuk, O. I., 2011.** Pat. na korysnu model 57758 UA. Mikrobiolohichni sposib bioremediatsii chornozemu opidzolenoho, zabrudnenoho vazhkymy metalamy [Pat. for useful model 57758 UA, MPK (2006.01): A01B 79/02, A01C 1/02, C05F 11/08, C12R 1/07; C12P 1/04 (2011.01). Microbiological method of bioremediation podzolic chernozem polluted with heavy metals], № u201010314; appl. 25.08.2010; publ. 10.03.2011, Bull. 5 (in Ukrainian).
- Marfenina, O. E., 2005.** Antropogennaja ekologija pochvennyh gribov [Anthropogenic ecology of soil fungi], Medicine for everyone, Moscow (in Russian).
- Mishustin, E. N., Petrova, A. N., 1963.** Opredilenie biologicheskoy aktivnosti pochv [Determination of biological activity of soils], Microbiology, 3, 479–483 (in Russian).
- Samokhvalova, V. L., Fateev, A. I., Zuza, S. H. et al., 2014.** Fitoremediatsiia tekhnohenno zabrudnenykh gruntiv [Technologically phytoremediation of polluted soils], Agroecology journal, 1, 90–98 (in Ukrainian).
- Samokhvalova, V. L., Grinchenko, T. O., Zhuravleva, I. M., 2015.** Pat. na korysnu model 100982 UA. Sposib bioremediatsii systemy grunt-gruntova biota-roslyna za zabrudnennia vazhkymy metalamy yak faktora khimichnoi ta biolohichnoi dehradatsii [Pat. for useful model 100982 UA, MPK: A01B 79/02 (2006.01), A01C 1/02 (2006.01). The method of bioremediation system soil-plant-soil biota by heavy metal pollution as a factor in chemical and biological degradation], U201412126; appl. 10/11/2014; publ. 08.25.2015, Bull. 16 (in Ukrainian).
- Samokhvalova, V. L., Zuza, S. H., Pohromska, Ya. A., et al., 2015.** Pat. na korysnu model 96936 UA. Sposib fitoremediatsii tekhnohenno zabrudnenykh vazhkymy metalamy gruntiv dlja efektyvnoho yikh vykorystannia [Pat. for useful model 96936 UA MPK (2015.01): A01B 79/02 (2006.01); A01G 7/00; B09C 1/00; G01N 33/24 (2006.01). Method technologically phytoremediation of soils contaminated with heavy metals to effective use], № u201409885; appl. 08/09/2014; publ. 02.25.2015, Bull. 4 (in Ukrainian).
- Samokhvalova, V. L., 2014.** Biolohichni metody remediatsii gruntiv, zabrudnenykh vazhkymy metalamy [Biological methods for remediation of soils contaminated by heavy metals], Biological studio. *Studia Biologica*, 8, 1, 217–236 (in Ukrainian).
- Samokhvalova, V. L., Fateev, A. I., 2006.** Tjazhjolje metally kak faktor tehnogennoho vozdeystvija na mikroorganizmy pochvy [Heavy metals as a factor of technogenic impact on soil microorganisms], *Gruntoznavstvo*, 7, 1–2, 88–95 (in Russian).
- Samokhvalova, V. L., Fateev, A. I., Naidenova, O. E., 2008.** Analiz stanu zabrudnenykh vazhkymy metalamy gruntiv za biokhimichnymi pokaznykamy [Analysis of heavy metals contaminated soil biochemical indicators], *Scientific Bulletin of the Uzhgorod National University. Series: Biology*, 22, 143–151 (in Ukrainian).
- Segi, J., 1983.** Metody pochvennoj mikrobiologii [Methods of Soil Microbiology], Kolos, Moscow (in Russian).
- Senchakova, T. Y., Svistova, I. D., 2008.** Perspektivnye preparaty dlja zashchity rastenij [Future plant protection products], Proceedings of the All-Russian conference «Fundamental advances in soil science, ecology, agriculture towards innovation», Publishing Center of Moscow State University, Moscow, 148–149 (in Russian).
- Svistova, I. D., Senchakova, T. Y., 2008.** Bioticheskie svjazi v sisteme pochva-mikroorganizmy-rastenija [Biotic communication to the soil-plant-microorganism], Proceedings of the International scientific conference «Modern state, problems and prospects of regional botanical studies», Publishing and printing centre of Voronezh State University, Voronezh, 283–285 (in Russian).
- Svistova, I. D., Senchakova, T. Y., 2010.** Ekologicheskaja plastichnost' gribov roda *Trichoderma* v chernozeme vyshhelochennom

[Ecological plasticity of fungi *Trichoderma* in leached chernozem], Eurasian Soil Science, 3, 342–348 (in Russian).

Taras, U. M., Oliferchuk, V. P., Paranyak, R. P., 2014. Pat. na korysnu model 92182 UA. Sposib pokrashchennia pryzhvyliuvanosti roslyn pry zalisnenni devastovanykh zemel [Pat. for useful model 92182 UA, MPK: (2014.01); C05F 11/08 (2006.01); C12N 1/14 (2006.01); A01N 63/00; A01B 79/02 (2006.01). A method to improve plant survival rate of afforestation in polluted lands], u2014 00012; appl. 01/08/2014; publ. 08.11.2014, Bull. 15 (in Ukrainian).

Valkov, V. F., 1999. Metodologija issledovanija biologicheskoy aktivnosti pochvy na primere Severnogo Kavkaza [The research methodology of soil biological activity on the

example of the North Caucasus], Scientific Thought Caucasus., 32–37 (in Russian).

Victorov, D. P., 1965. Malyj praktikum po fiziologii rastenij: uchebnoe posobie dlja vuzov [Small workshop on plant physiology: a textbook for high schools], Vysshaja shkola, Moscow (in Russian).

Yudin, V. N., Yudin, A. V., 2005. Pat. na poleznuju model' 2258687 RU. Biopreparat na osnove guminovyh veshhestv [Pat. for useful model 2258687 RU, MPK: C 05 F 11/02, 3/00. The biological product based on humic substances], № 2003119628/12; appl. 30.06.2003; publ. 20.08.2005, Bull. 23 (in Russian).

Zvyagintsev, D. G., 1980. Metody pochvennoj mikrobiologii i biohimii [Methods of Soil Microbiology and Biochemistry], MGU, Moscow (in Russian).

Стаття надійшла в редакцію: 10.09.2015

Рекомендує до друку: д-р біол. наук, проф. В. М. Зверковський