УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ КАЗАНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

Том 153, кн. 1 Естественные науки *2011*

УДК 504.054:574.3

СТРУКТУРА СООБЩЕСТВА МИКРОМИЦЕТОВ ЧЕРНОЗЕМА ВЫЩЕЛОЧЕННОГО ПРИ ЗАГРЯЗНЕНИИ 2,4,6-ТРИНИТРОТОЛУОЛОМ

И.П. Кормильцева, Г.Ю. Яковлева, Н.Г. Захарова, Б.М. Куриненко

Аннотация

Исследован качественный состав и коэффициент сходства сообщества микромицетов почвы, загрязненной 2,4,6-тринитротолуолом (ТНТ). Показано, что разнообразие почвенных микромицетов и изменение коэффициента сходства зависят от концентрации 2,4,6-тринитротолуола. При концентрации ТНТ 20 мг/кг почвы для некоторых микромицетов обнаружено снижение частоты встречаемости. Внесение 50 мг ТНТ/кг почвы привело к исчезновению случайных и типично редких микромицетов. Загрязнение почвы ксенобиотиком в концентрации 100 мг/кг почвы сопровождалось усилением элиминации микромицетов, входящих в группу типично редких и случайных. Наиболее бедным был качественный состав сообщества микромицетов при загрязнении почвы ТНТ в концентрации 200 мг/кг. Отмечено также появление представителей родов, ранее не обнаруженных в контрольной почве и почвенных образцах, загрязненных меньшими концентрациями ТНТ. С повышением нагрузки на сообщество обнаружено закономерное снижение коэффициента сходства, наименьшие значения которого определены при концентрациях ТНТ 100 и 200 мг/кг почвы.

Ключевые слова: 2,4,6-тринитротолуол (ТНТ), почвенные микромицеты, структура микробного сообщества, индексы сходства.

Введение

Ароматические углеводороды ввиду их высокого канцерогенного, мутагенного и токсичного действия рассматриваются Европейским сообществом (ЕС) и Агентством по охране окружающей среды США (EPA) как одни из самых опасных загрязняющих веществ. В течение более чем векового интенсивного использования одного из таких соединений – 2,4,6-тринитротолуола (ТНТ) – произошло загрязнение почвы огромных территорий, на которых протекали военные действия, и даже значительно отдаленных от них местностей. Загрязнение почв тротилом происходит и в настоящее время ввиду его активного применения на местах современных боевых действий и при уничтожении больших партий боеприпасов. Отложения кристаллического тротила по мере растворения также становятся источником загрязнения грунтовых вод, а открытая детонация в зоне военных действий приводит к контаминации атмосферного воздуха, который впоследствии становится источником вторичного загрязнения почв. Мониторинг загрязненных ТНТ почв и водных экосистем показал долговременное отрицательное влияние на цикл углерода и азота через воздействие на основные эколого-трофические группы бактерий почвы и интегральные показатели – азотфиксацию и дыхание [1, 2].

При решении проблемы очистки почв и водных экосистем от ТНТ и его метаболитов в последние два десятилетия предпринимаются попытки реализации биологических методов ремедиации [3]. В основе возможностей их использования лежит оценка действия токсикантов на интенсивность протекания микробиологических процессов и структуру микробного сообщества почвы. Одним из важнейших компонентов сообщества являются почвенные микромицеты. Изменение качественного состава почвенных микромицетов в структуре микробного сообщества является одним из надежных показателей уровня загрязнения почв ксенобиотиками и их воздействия на живые организмы [4].

Целью настоящей работы было оценить изменения в структуре микромицетного сообщества чернозема выщелоченного при загрязнении его различными концентрациями 2,4,6-тринитротолуола.

1. Материалы и методы

Внесение 2,4,6-тринитротолуола проводили путем загрязнения 1/5 части от всего объема почвы и последующего смешения с оставшимися 4/5 частями интактной почвы.

Микромицеты учитывали на подкисленной среде Чапека, определение проводили по Литвинову [5]. Изменения в структуре комплекса микромицетов характеризовали, используя такой показатель, как частота встречаемости (ЧВ). ЧВ представляет собой отношение числа образцов, в которых вид обнаружен к общему числу образцов. Частота встречаемости позволяет выявить комплекс типичных видов, характерный для данных экологических условий, который состоит из типично доминирующих видов (частота встречаемости от 60% до 100%), типично частых (от 30% до 60%), типично редких (от 10% до 30%). Для случайных видов частота встречаемости составляет менее 10% [6]. Для определения сходства комплексов микромицетов в контрольном и загрязненных образцах почв рассчитывали коэффициент Серенсена.

2. Результаты и их обсуждение

Всего из исследованных образцов почвы выделено 47 штаммов микромицетов, относящихся к 46 родам (табл. 1). По сравнению с образцами почв, загрязненных тротилом, незагрязненная почва обладала наибольшим родовым разнообразием (41 род). Только в контрольной почве встречались представители родов *Stemphilium*, *Ostracoderma*, *Microascus*, *Fonseceae*, *Phialophora*, *Trichotecium*, *Ulocladium*, *Sclerotinia*, *Pullularia*. Большая часть микромицетов, составляющих основу сообщества в почве, не загрязненной ТНТ, относилась к группе типично редких и типично частых. Лидирующее положение в сообществе занимали представители рода *Penicillium* с ЧВ более 60%. Некоторые из микромицетов, которые составили в нативной почве группу случайных видов, не были обнаружены в образцах, загрязненных ТНТ.

Сравнение структуры сообщества микромицетов, заселяющих почву в контрольном образце и почву, в которую вносили различные концентрации ТНТ,

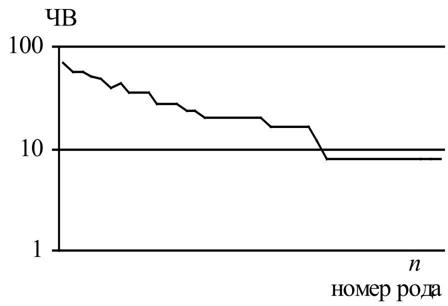

Рис. 1. Ранговое распределение частоты встречаемости микромицетов в незагрязненном образце

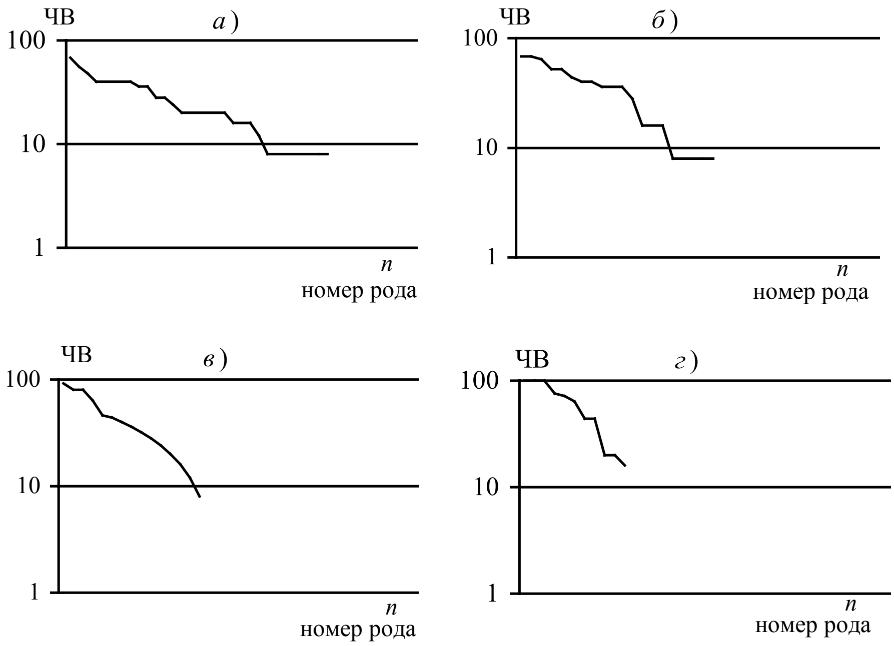

Рис. 2. Ранговые распределения частоты встречаемости микромицетов в образцах, содержащих различные концентрации 2,4,6-тринитротолуола: *а*) 20 мг/кг; *б*) 50 мг/кг; *в*) 100 мг/кг; *г*) 200 мг/кг. По оси абсцисс отложены номера родов микромицетов от наиболее часто встречающихся до самых немногочисленных

выявило различия между ними. Как видно из представленных данных (рис. 1, 2), внесение в почву тринитротолуола в концентрации 20 мг/кг способствовало сокращению разнообразия микромицетов за счет исчезновения представителей ряда родов, что отражают кривые рангового распределения. Для некоторых микромицетов – *Hormiscium*, *Mortierella*, *Monocillium* – обнаружено снижение ЧВ на 8%, 16% и 20% соответственно. Между тем из данных литературы известно, что снижение популяционной плотности микроорганизмов и потеря части сообщества, которая часто выполняет специфические функции, может иметь серьезные экологические последствия [7]. Изменения, произошедшие в структуре сообщества микромицетов, не затронули микромицеты *Scedosporium*, *Acremonium*, *Coniothyrium*, *Halobyssus*, *Scolecobasidium*, ЧВ которых не изменилась.

Тенденция исчезновения микромицетов с низкой частотой встречаемости получила развитие с увеличением концентрации ТНТ. При внесении 50 мг ТНТ/кг почвы не были обнаружены некоторые микромицеты из разряда случайных (*Wardomyces*, *Zygosporium*) и также исчезли те из них, которые относились к классу типично редких: *Halobyssus*, *Absidia*, *Nigrospora*, *Scolecobasidium*. Все это способствовало значительному сокращению родового разнообразия даже по сравнению с образцом, содержащим 20 мг ТНТ/кг почвы. Следует отметить, что увеличилась ЧВ возбудителей заболеваний *Cephalosporium* и *Fusarium* на 4% и 44% и микромицетов из родов *Aspergillus* и *Sporotrichum* на 16% и 24% соответственно. В данном случае распределение по ЧВ, несмотря на выявленные изменения, было близко к каноническому лог-нормальному типу (рис. 2).

При внесении ТНТ в концентрации 100 мг/кг почвы продолжалась элиминация микромицетов, входящих в группу типично редких и случайных. В исследованном образце почвы не были обнаружены *Scedosporium*, *Mucor*, *Monocillium*, *Doratomyces* (табл. 1).

Наиболее бедным был качественный состав сообщества микромицетов при внесении в почву ТНТ в концентрации 200 мг/кг. По сравнению с контрольным вариантом, количество родов уменьшилось на 25. Вместе с тем в сообществе появились представители родов *Rhinocladium*, *Ramichloridium*, *Gilmaniella*, *Fusidium*, *Culvularia*, ранее не обнаруженные в контрольной почве и почве, загрязненной ТНТ в концентрации 20, 50 и 100 мг/кг.

С повышением концентрации тринитротолуола возросла ЧВ родов *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geomyces*, *Sporotrichum,* а в образце, загрязненном максимальной концентрацией ксенобиотика, ЧВ некоторых из них достигла 100%. С одной стороны, это может быть связано с появлением устойчивых к ТНТ и продуктам его трансформации форм микромицетов. С другой стороны, возможно, что благодаря наличию обильного спороношения данные микромицеты начали активно колонизировать освободившуюся экологическую нишу. Подобное явление овладения экологической ниши меньшим числом видов получило название «концентрации доминирования». Наблюдается оно, как правило, при распределении по типу геометрического ряда, которое было характерно для образцов, загрязненных 100 и 200 мг ТНТ/кг почвы (рис. 2).

Таким образом, по мере возрастания концентрации ТНТ прослеживается проявление его селективного давления на микромицеты, толерантные по отношению к ксенобиотику. Микромицеты, которые были выделены из образцов почвы, загрязненной тринитротолуолом, по данным литературы, проявляют высокую устойчивость не только к тротилу, но и другим типам антропогенного воздействия (длительное внесение минеральных удобрений и продолжительное применение пестицидов, загрязнение тяжелыми металлами и т. п.) [8–10].

Глубина сдвигов, произошедших в структуре сообщества микромицетов при загрязнении почвы ксенобиотиком, отражена в рассчитанном коэффициенте сходства Серенсена (табл. 2). Высокий коэффициент сходства Серенсена – 84.9% – свидетельствует о близости комплексов микромицетов контрольной почвы и почвы, загрязненной минимальной концентрацией ТНТ (20 мг/кг).

Снижение коэффициента сходства с увеличением концентрации ксенобиотика указывает на то, что загрязнение порождает значительные различия в структурах

Табл. 1

Частота встречаемости микромицетов, %

Микромицеты	Контроль	Концентрация ТНТ, мг/кг			
		20	50	100	200
Penicillium	68	68	68	64	76
Hormiscium	56	48	52	32	20
Geomyces	56	56	52	80	100
Mortierella	52	36	40	20	20
Paecilomyces	48	40	36	28	
Monocillium	44	24	8		
Sporotrichum pr.	40	56	64	80	100
Sporotrichum sp.	36	40	36	44	44
Trichoderma	36	40	40	36	44
*Scopuloriopsi*s	36	40	44	24	
Absidia	28	28			
Humicola	28	20	16	12	16
Fusarium	24	36	68	92	100
Alternaria	12	12			
Aspergillus	20	28	36	48	72
Cephalosporium	24	20	28	40	64
Chaetomium	16	20	16	8	
Coniothyrium	20	20	8	16	
Scedosporium	20	20	8		
Scolecobasidium	20	20			
Cladosporium	20	8			
Halobyssus	16	16			
Microascus	28				
Nigrospora	16	16			
Sepidonium	20	16			
Sclerotinia	16	8			
Verticillium	8	12			
Wardomyces	8	8			
Zygosporium	8	8			
Aureobasidium	8	8			
Doratomyces	8	8			
Mucor	8	8	8		
Phialophora	16				
Pullularia	20				
Fonseceae	8				
Acremonium	8				
Stemphilium	8				
Trichotecium	8				
Ulocladium	8				
Tilocladium	8				
Ostracoderma	8				
Geotrichum		24	20		
Culvularia lunata				8	20
Gilmaniella					
Rhinocladium					28
Ramichloridium					24

Табл. 2

Сходство незагрязненной почвы (К) и образцов, содержащих различные концентрации ТНТ

	К – 20	К – 50	К – 100	К – 200
Коэффициент Серенсена, Cs	84.9	64.5	52.6	38.6

комплексов микромицетов. Коэффициент Серенсена, полученный для незагрязненного образца и варианта, содержащего поллютант в концентрации 200 мг/кг почвы, составил менее 40%.

Наблюдаемые нами нарушение структуры микромицетного сообщества почвы, сужение разнообразия, уменьшение числа редко встречающихся видов и обильный рост нескольких устойчивых видов в загрязненной почве подтверждаются работами и других авторов при оценке влияния загрязнения почвы тяжелыми металлами [11].

Заключение

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что даже низкие концентрации ТНТ (20 и 50 мг/кг почвы) оказывают токсическое действие на микромицеты почвы, заметно изменяя структуру их сообщества. В почве, загрязненной высокими концентрациями ксенобиотика (100 и 200 мг/кг), изменяется не только структура сообщества, но и наиболее сильно снижаются коэффициенты сходства с незагрязненной почвой. Зависимость степени изменений в сообществе микромицетов почвы от концентрации ксенобиотика дает основание использовать такие характеристики микромицетов почвы, загрязненной ТНТ, как структура сообщества, индексы сходства, ранговое распределение встречаемости для оценки уровня загрязненности почвы ксенобиотиком.

Summary

I.P. Kormiltseva, G.Yu. Yakovleva, N.G. Zakharova, B.M. Kurinenko. The Structure of Micromycete Community of Leached Chernozem under 2,4,6-Trinitrotoluene Pollution.

Qualitative composition and similarity index of micromycete community of 2,4,6-trinitrotoluene contaminated soil were investigated. It was found that diversity of soil fungi and similarity index variation depend on 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) concentration. At the TNT concentration of 20 mg/kg, the reduction of occurrence of some micromycetes was registered. The increase in the TNT concentration up to 50 mg/kg led to disappearance of occasional and rare species. The pollution of soil by the xenobiotic in a concentration of 100 mg/kg intensified elimination of occasional and typically rare micromycetes. At the pollution level of 200 mg/kg, micromycete community was characterized by the poorest qualitative composition. The emergence of the genera that were not earlier detected in the control soil and in the soil samples contaminated by the lesser TNT concentration was also observed. The increase in the load on soil community led to a consistent reduction of similarity index. The least value of the latter was recorded at the TNT concentrations of 100 and 200 mg/kg.

Key words: 2,4,6-trinitrotoluene (TNT), soil fungi, microbial community structure, similarity indices.

Литература

1. *Конева Н.Д., Круглов Ю.В.* Динамика численности и структуры бактериального комплекса почвы при внесении азобензола // Микробиол. – 2001. – Т. 70, № 4. – С. 552–557.
2. *Tobias F., Hoper H.* Soil microbial parameters and luminescent bacteria assays as indicators for in situ bioremediation of TNT-contaminated soils // Chemosphere. – V. 50, No 3. – 2003. – P. 415–427.
3. *Boopathy R.* Bioremediation of explosives contaminated soil // Int. Biodeterior. Biodegrad. – 2000. – V. 46, No 1. – P. 29–36.
4. *Полянская Л.М., Лукин С.М., Звягинцев Д.Г.* Изменение состава микробной биомассы в почве при окультуривании // Почвоведение. – 1997. – № 2. – С. 206–212.
5. *Литвинов М.А.* Определитель микроскопических почвенных грибов. – Л.: Наука, 1967. – 303 с.
6. *Кураков А.В.* Методы выделения и характеристики комплексов микроскопических грибов наземных экосистем. – М.: Макс Пресс, 2001. – 92 с.
7. *Travis E R., Bruce N.C., Rosser S.J.* Short term exposure to elevated trinitrotoluene concentrations induced structural and functional changes in the soil bacterial community // Environ. Pollut. – 2008. – V. 153, No 2. – P. 432–439.
8. *Марфенина О.Е., Мирчинк Т.Г.* Микроскопические грибы при антропогенном воздействии на почву // Почвоведение. – 1988. – № 9. – С. 107–112.
9. *Левин С.В., Гузев В.С.* Действие тяжелых металлов на микробную систему серозема обыкновенного // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Почвоведение. – 1987. – № 2. – С. 48–53.
10. *Weber R.W.S., Ridderbusch D.C., Anke H.* 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) tolerance and biotransformation potential of microfungi isolated from TNT-contaminated soil // Mycol. Res. – 2002. – V. 106, No 3. – P. 336–344.
11. *Маслова И.Я.* Воздействие содержащих серу аэротехногенных веществ на некоторые агрохимически значимые процессы и свойства почв // Агрохимия. – 2008. – № 6. – С. 80–94.

Поступила в редакцию
02.07.10

Кормильцева Инна Петровна – аспирант кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: *idemidova2006@yandex.ru*

Яковлева Галина Юрьевна – кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: *Yakovleva_Galina@mail.ru*

Захарова Наталия Георгиевна – кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

Куриненко Борис Михайлович – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета

E-mail: *Boris.Kurinenko@ksu.ru*