

Бухарина И.Л., Исупова А.А.

Пределы устойчивости микроскопических грибов к нефтяному загрязнению

Электронный научно-производственный журнал

«АгроЭкоИнфо»

УДК 574.23

Пределы устойчивости микроскопических грибов к нефтяному загрязнению

Бухарина И.Л., Исупова А.А.

Удмуртский государственный университет

Аннотация

*В статье приводятся результаты лабораторных экспериментов по исследованию динамики роста мицелия эндотрофных грибов при различных концентрациях нефти в субстрате. Результаты показали, что эндотрофные микроскопические грибы *Fusarium equiseti* и *Cylindrocarpum magnusianum* способны выживать при высоких концентрациях нефти в субстрате, при этом они используют разные механизмы адаптации. *F. equiseti* проявлял активный рост уже в первую неделю контакта с нефтезагрязненным субстратом, далее наблюдалось уменьшение скорости роста мицелия в 3-5 раз. *C. magnusianum* в течение первой недели эксперимента не проявлял активного роста, а затем скорость роста мицелия увеличилась в 2-3 раза. Таким образом, мы наблюдали видоспецифические реакции исследуемых грибов на условия нефтяного загрязнения. Оба вида грибов можно использовать в технологиях нефтеструкции, рекультивации нефтезагрязненных земель, но при разных уровнях загрязнения субстрата нефтью: *F. equiseti* может быть более эффективен при низких концентрациях нефти в субстрате (1-2,5%) и при необходимости быстрого восстановления земель, а *C. magnusianum* - при длительном нефтезагрязнении и высоких концентрациях нефти (5-10%)*

Ключевые слова: НЕФТЯНОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ, БИОРЕМЕДИАЦИЯ, ЭНДОТРОФНЫЕ ГРИБЫ, БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЭТАП РЕКУЛЬТИВАЦИИ

Обзор литературы

По добыче нефти Россия занимает второе место в мире. Среднегодовая добыча нефти составляет 554,3 млн т., и с каждым годом этот показатель неизменно возрастает [1]. В Удмуртии ежегодно добывается свыше 8 млн т. нефти.

Бухарина И.Л., Исупова А.А.

Пределы устойчивости микроскопических грибов к нефтяному загрязнению

Электронный научно-производственный журнал

«АгроЭкоИнфо»

Проблема загрязнения земель нефтью признана на государственном уровне. В отчете Министерства природных ресурсов и экологии за 2017 г. указано, что число аварий на объектах нефтедобычи и при транспортировке нефти ежегодно достигает 25 тысяч инцидентов, в результате чего около 1,5 млн т. нефти поступает в окружающую среду [11]. Определенное количество нефти изливается при её транспортировке по трубопроводам в результате их изношенности или механических повреждений [10].

Существует разные способы очистки нефтезагрязненных земель, но ни один не является универсальным. Наиболее безопасным методом утилизации нефтезагрязнений считается биотехнологический с использованием микробиологических препаратов нефтедеструкторов. Но существующие в настоящее время биопрепараты в экстремальных почвенно-климатических условиях различных регионов России оказываются недостаточно эффективными, т.к. микроорганизмы разрушающие нефтепродукты, проявляют свою максимальную эффективность лишь в определенном довольно узком диапазоне почвенных условий (кислотность, температура, влажность, аэрация, содержание минеральных веществ) [9].

Решением этой проблемы может быть совместное применение бактериальных биопрепаратов нефтедеструкторов и микроскопических грибов, в частности эндотрофных микроскопических грибов. Эндотрофные грибы обладают более широким диапазоном устойчивости к эдафическим факторам, по сравнению с бактериями, поэтому их использование в качестве членов консорциумов бактерий, грибов и высших растений для более эффективной очистки почвы при нефтезагрязнениях, является научно обоснованным. В связи с чем весьма актуален поиск наиболее эффективных для данных целей видов эндотрофных грибов. К таким грибам, по литературным данным, относятся *Fusarium equiseti* и *Cylindrocarpon magnusianum* [2].

F. equiseti является космополитом, считается умеренным патогенным грибом для некоторых сельскохозяйственных культур, но также может становиться долгосрочным корневым эндотрофом, благотворно влияющим на растения-хозяева в защите от других фитопатогенных грибов и вирусной инфекции [8]. В настоящее время идет разработка методов практического использования *F. equiseti* в качестве агента биологического контроля устойчивости растений [6]. Серия экспериментов, проведенных с *F. equiseti*, выявила возможность его использования в качестве агента повышения солеустойчивости

Бухарина И.Л., Исупова А.А.

Пределы устойчивости микроскопических грибов к нефтяному загрязнению

Электронный научно-производственный журнал

«АгроЭкоИнфо»

растений [2] и даже на средах предварительно доведенных до высоких показателей осмотического потенциала с KCl и NaCl (от 1,50 до 144,54 бара) при 15°, 25° и 35°C. Ряд исследований направлен на использование этого гриба в качестве микогербицида [7].

Также не менее перспективным видом микромицетов является эндофит *Cylindrocarpon magnusianum*. Исследователи относят его к группе нефтегазоносных (могут существовать в условиях загрязнения нефтью) грибов, что может быть востребовано в восстановлении нефтезагрязненных земель. Кроме того, этот гриб обладает высокой металлрезистентностью [3,4].

Целью исследования стало выявление пределов выносливости двух видов эндотрофных грибов *Fusarium equiseti* и *Cylindrocarpon magnusianum* к различным концентрациям нефти в субстрате.

Методика

Культуры *F. equiseti* и *C. magnusianum* выделены из корневой системы древесных растений (*Acer negundo* L. хорошего жизненного состояния), длительно произрастающих в условиях городских почв с высоким содержанием солей тяжелых металлов (примагистральные посадки, санитарно-защитная зона ОАО "Ижсталь", г. Ижевск, Удмуртия). Гриб культивируется на питательной среде вне корневой системы растений. Видовая принадлежность гриба установлена методами микроскопирования и молекулярного анализа ДНК в лаборатории Лейбницкого института овощных и декоративных культур (г. Берлин) [5].

В соответствии с целью исследований была разработана следующая схема лабораторного эксперимента. Фактор А – вид гриба: А1 – *F. equiseti*; А2 – *C. magnusianum*. Фактор В – концентрация нефти: В0 – 0% контроль– без внесения нефти; В1 – 1% нефти; В2 – 2,5%; В3 – 5%; В4 – 7,5 %; В5 – 10%.

В качестве питательной среды использовали пентозо-декстрозную агаризированную среду (PDA medium). Нефть вносили в питательную среду согласно схеме эксперимента и разливали в стерильные чашки Петри. Затем проводили посев мицелиальных дисков культуры гриба (d = 9 мм). Повторность вариантов опыта пятикратная. Грибы инкубировались в течение четырех недель в климатической камере

Бухарина И.Л., Исупова А.А.

Пределы устойчивости микроскопических грибов к нефтяному загрязнению

Электронный научно-производственный журнал

«АгроЭкоИнфо»

«BinderKBWF720» (Германия) при температуре +23-25°C. Наблюдения включали измерения диаметра мицелия (в двух направлениях диаметра чашки Петри) через каждые 7 дней в течение одного месяца после посева. Точность измерений составляет 1,0 мм. Результаты обрабатывали с использованием программы «Statistica 5.5» методом описательной статистики определяли среднее значение показателя, стандартное отклонение и доверительный интервал для среднего значения признака. Достоверность различий устанавливали при $p < 0.05$.

Результаты

Для изучения влияния концентрации нефти на рост мицелия были проведены измерения диаметра мицелия через 1, 2 и 3 недели после посева и построены графики роста мицелия (рис. 1-2, табл. 1).

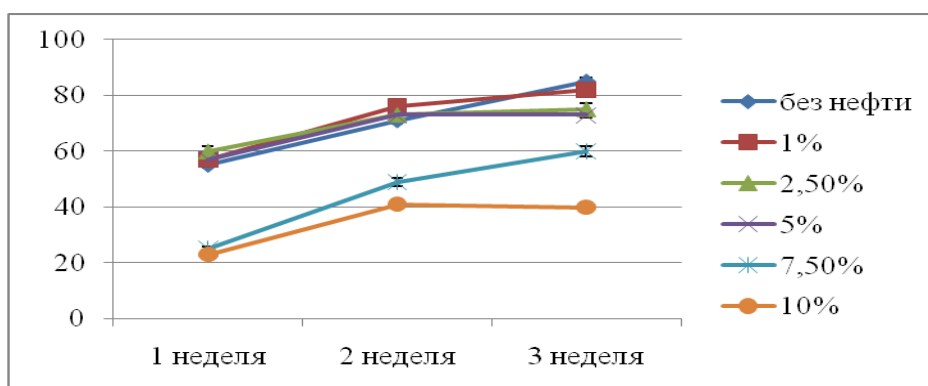


Рис. 1. Влияние различных концентраций нефти на размеры мицелия *Fusarium equiseti* (диаметр, мм)

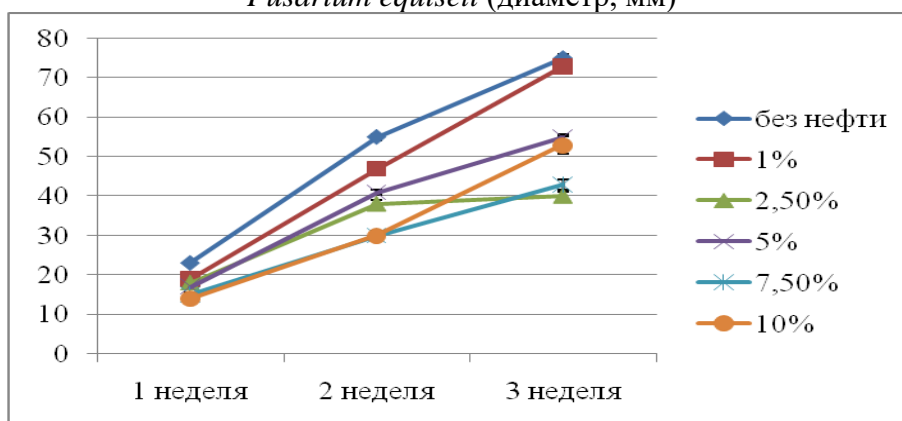


Рис. 2. Влияние различных концентраций нефти на размеры мицелия *Cyllindrocarpon magnusianum* (диаметр, мм)

Бухарина И.Л., Исупова А.А.

Пределы устойчивости микроскопических грибов к нефтяному загрязнению

Электронный научно-производственный журнал

«АгроЭкоИнфо»

Таблица 1. Диаметр (мм) и скорость роста (мм/сут.) мицелия микромицетов в условиях содержания различных концентраций нефти в субстрате

Период наблюдения	Концентрация нефти					
	0%	1%	2,5%	5%	7,5%	10%
<i>Fusarium equiseti</i>						
1 неделя (диаметр мицелия)	55±1,3* 50...61**	57±0,9 54...61	60±0,9 56...64	57±0,6 55...60	25±2,2 16...35	23±1,2 18...28
1 неделя (скорость роста)	6,5	6,8	7,2	6,8	2,5	2
2 неделя (диаметр мицелия)	71±0,3 70...73	76±0,9 72...80	73±2,8 62...87	73±1,0 69...77	49±4 32...66	41±3,8 25...57
2 неделя (скорость роста)	2,3	2,7	1,9	2,3	3,4	2,5
3 неделя (диаметр мицелия)	85±0,0 85...85	82±1,5 76...89	75±3,3 59...88	73±1,5 66...79	60±1,7 52...67	40±5,8 15...64
3 неделя (скорость роста)	2	0,9	0,3	0	1,6	0
<i>Cylindrocarpon magnusianum</i>						
1 неделя (диаметр мицелия)	23±0,6 21...26	19±0,7 17...22	18±0,3 16...19	17±0,3 15...18	15±0,0 15...15	14±0,3 12...15
1 неделя (скорость роста)	2	1,4	1,3	1,1	0,9	0,7
2 неделя (диаметр мицелия)	55±1,0 51...59	47±0,3 45...48	38±2,2 29...48	41±0,3 40...43	30±3,2 16...43	30±0,3 28...31
2 неделя (скорость роста)	4,5	4	2,9	3,4	2,1	2,3
3 неделя (диаметр мицелия)	75±0,0 75...75	73±1,2 68...78	40±8,2 4...75	55±0,3 54...57	43±6,7 15...72	53±0,3 52...55
3 неделя (скорость роста)	2,9	3,7	0,3	2	1,9	3,2

Примечание: * – среднее значение показателя ± стандартное отклонение;

** - доверительный интервал для среднего значения при $p < 0,05$

Результаты исследования показали, что через неделю после посева размеры мицелия *F. equiseti* в вариантах опыта с 1, 2,5 и 5% содержанием нефти в субстрате не имели достоверных различий с контрольным вариантом. Во вторую и третью недели эксперимента в этих вариантах опыта размеры мицелия также не имели достоверных различий с контролем, за исключением варианта 5%, где в третью неделю наблюдались достоверно меньшие по сравнению с контролем показатели диаметра мицелия (на 12 мм).

Бухарина И.Л., Исупова А.А.

Пределы устойчивости микроскопических грибов к нефтяному загрязнению

Электронный научно-производственный журнал

«АгроЭкоИнфо»

При этом скорость роста мицелия в первую неделю эксперимента в этих вариантах составляла 6,5-7,2 мм/сут. (таблица 1), во вторую и третью недели скорость роста мицелия существенно снизилась соответственно до 2-2,5 и 0,3-2 мм /сутки, а на третьей неделе – составила 2 мм/сутки. При концентрации нефти 5% через 3 недели рост мицелия практически остановился.

В вариантах опыта с высоким содержанием нефти (7,5 и 10%) в первую же неделю эксперимента размеры мицелия гриба были достоверно ниже, чем в контроле и затем эти различия сохранялись в ходе всего эксперимента. При этом скорость роста мицелия составляла 2 мм/сут. Во вторую неделю скорость роста мицелия возросла до 2,5-3 мм/сут., но на третьей неделе эксперимента в варианте содержания 7,5% нефти наблюдалось снижение скорости роста мицелия до 1,6 мм/сут., а при концентрации 10% – рост мицелия остановился, в 30% случаев по периферии мицелия произошла его гибель.

Что касается другого изучаемого объекта, то через неделю после посева *S. magnusianum* размеры мицелия не имели достоверных различий с контролем в варианте опыта с 1% содержанием нефти. В остальных вариантах опыта мицелий имел достоверно меньшие размеры по сравнению с контролем. Это же наблюдалось на второй и третьей неделях эксперимента, за исключением варианта с 1% содержанием нефти, где достоверных различий с контролем в третью неделю эксперимента не выявлено.

Следует отметить, что реакции ростовых процессов на содержание нефти в субстрате у изучаемых видов были различными в ходе эксперимента. У *S. magnusianum* скорость роста мицелия в первую неделю эксперимента во всех вариантах опыта была меньше, чем в контроле и составляла 0,7-1,4 мм/сут. Во вторую неделю во всех вариантах опыта скорость роста мицелия была ниже, чем в контроле, но выше чем в первую неделю. На третьей неделе скорость роста мицелия снизилась, за исключением варианта с самым высоким содержанием нефти 10%.

Оба исследуемых вида грибов способны выживать при высоких концентрациях нефти в субстрате, но они используют разные механизмы для выживания, отражающиеся в динамике и скорости роста мицелия. *F. equiseti* характеризовался наиболее активным ростом в начале эксперимента (возможно за счет внутренних резервов), далее наблюдалось замедление ростовых процессов. *S. magnusianum* на агрессивные условия среды в начале эксперимента реагировал менее активным ростом, который в течение

Бухарина И.Л., Исупова А.А.

Пределы устойчивости микроскопических грибов к нефтяному загрязнению

Электронный научно-производственный журнал

«АгроЭкоИнфо»

сроков эксперимента увеличивался. Таким образом, можно отметить разные стратегии адаптивных реакций изучаемых видов грибов на стрессовые условия нефтяного загрязнения, что может найти свое применение в биотехнологических методах восстановления нефтезагрязненных земель. *F. equiseti* может быть более эффективен при низких концентрациях нефти в субстрате и необходимости быстрого восстановления почвы, а *C. magnusianum* - при длительном восстановлении и высоких концентрациях нефти. Таким образом, оба гриба можно использовать для дальнейших исследований эффективности инокуляции растений – ремедиантов при формировании устойчивости растений в условиях биологического этапа восстановления нефтезагрязненных земель.

Выводы

Эндотрофные микроскопические грибы *Fusarium equiseti* и *Cylindrocarpon magnusianum* способны выживать при высоких концентрациях нефти в субстрате, при этом они используют разные механизмы адаптации. *F. equiseti* на субстратах с внесением нефти проявлял активный рост уже в первую неделю контакта с нефтезагрязненным субстратом, далее наблюдалось уменьшение скорости роста мицелия в 3-5 раз. *C. magnusianum* в течение первой недели эксперимента не проявлял активного роста, а затем скорость роста мицелия увеличилась в 2-3 раза. Таким образом, мы наблюдали видоспецифические реакции исследуемых грибов на условия нефтяного загрязнения субстрата.

Оба эти гриба можно использовать в технологиях нефтеструкции, рекультивации нефтезагрязненных земель, но при разных уровнях загрязнения субстрата нефтью. Например, *F. equiseti* может быть более эффективен при низких концентрациях нефти в субстрате и при необходимости быстрого восстановления земель, а *C. magnusianum* - при длительном нефтезагрязнении и высоких концентрациях нефти.

Список использованных источников

1. [Электронный ресурс] URL: <http://www.activestudy.info/vliyanie-nefti-i-nefteproduktov-na-pochvu/>.
2. Бухарина И.Л., Исламова Н.А. Исследование пределов устойчивости микроскопических грибов и формирование коллекции перспективных изолятов. Мат.

Бухарина И.Л., Исупова А.А.

Пределы устойчивости микроскопических грибов к нефтяному загрязнению

Электронный научно-производственный журнал

«АгроЭкоИнфо»

годичное собрание общества физиологов растений России "Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма". – СПб., 2016. – С. 362–363.

3. Бухарина И.Л., Исламова Н.А., Жавад А.Ф., Абдуллах М.Р., Лебедева М.А., Шашов Л.О. Особенности формирования металлрезистентности при инокуляции томата микромицетом *Cylindrocarpum Magnusianum* // Естественные и технические науки. – 2019а. – № 10 (136). – С. 105-112. <https://doi.org/10.25633/ETN.2019.10.15>

4. Бухарина И.Л., Исламова Н.А., Жавад А.Ф., Лебедева М.А., Шашов Л.О. Влияние инокулята *Cylindrocarpum Magnusianum* на формирование адаптивных реакций растений к стрессовым факторам // Аграрная Россия. – 2019. – №12. – С. 26-32. <https://doi.org/10.30906/1999-5636-2019-12-26-32>.

5. Bukharina, I., Franken, P.H., Kamasheva, A., Vedernikov, K., Islamova, N. 2016. About the species composition of microscopic fungi in soils and woody plant roots in urban environment. In International Journal of Advanced Biotechnology and Research. – V. 7(4). – P. 1386–1394. 6. Horinouchi H., Watanabe H., Taguchi Y., Muslim A., Hyakumachi M. *Fusarium equiseti* GF191 as an effective biocontrol agent against *Fusarium* crown and root rot of tomato in rock wool systems // BioControl. – 2011. – V. 56. – P. 915–923.

7. Motlagh, MRS; Javadzadeh, A. Study of the reaction of major weeds and some rice cultivars to *Fusarium equiseti* // Journal of medicinal plants research. 2011. – V. 5. – Issue: 24. – P. 5796-5802.

8. Palmero D., de Cara M., Iglesias C., Galvez L., Tello J.C. Comparative study of the pathogenicity of seabed isolates of *Fusarium equiseti* and the effect of the composition of the mineral salt medium and temperature on mycelial growth // Brazilian Journal of Microbiology. 2011. – V.4. – P.948-953.

9. Нарманова Р.А., Омаров Е.А., Пирманова Ж.М., Аппазова З.Ж. Газохроматографический анализ углеводородного состава нефтей, извлеченных из загрязненных почв (на примере загрязненных нефтью почв Приаральского региона) // Кызылординский государственный университет им. Коркыт Ата. – 2015. – №2 (1). – С.36-38.

10. Пызыкова К.Е., Измайлова С.В. Использование микроорганизмов как метод очистки нефтезагрязненных грунтов // Сибак. 2016. – №10 (45).

11. Рябов В.Д. Химия нефти и газа: учебное пособие. – М.: ИД «ФОРУМ», 2009. – С.336.

Цитирование:

Бухарина И.Л., Исупова А.А. Пределы устойчивости микроскопических грибов к нефтяному загрязнению// АгроЭкоИнфо. – 2020, №3. – http://agroecoinfo.narod.ru/journal/STATYI/2020/3/st_313.pdf