Министерство науки и высшего образования РФ
ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»
Институт гражданской защиты
Кафедра инженерной защиты окружающей среды

Допустить к защите
Руководитель магистерской программы
д.б.н., профессор Бухарина И.Л.
_____
«26» 01 2026 г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

ВЛИЯНИЕ ПРОДУКТОВ ЛИКВИДАЦИИ ЗОНЫ НИЗКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ ПОГЛОЩЕНИЯ ПРИ СТРОИТЕЛЬСТВЕ НЕФТЯНЫХ СКВАЖИН НА ЖИВЫЕ ОРГАНИЗМЫ

Магистранты _____ Королёва Екатерина Александровна
_____ Сахибова Полина Алексеевна

Направление подготовки:
20.04.02 «Природообустройство и водопользование»
Направленность/профиль: «Экологическая экспертиза, защита и восстановление природной среды»

Научный руководитель
к.б.н., доцент _____ Исламова Надежда Александровна

Ижевск 2026

ВКР УдГУ

Аннотация

Выпускная квалификационная работа выполнена студентками группы ЗМ-20.04.02.01-21 Королёвой Екатериной Александровной и Сахибовой Полиной Алексеевной на тему «Влияние продуктов ликвидации зоны низкой интенсивности поглощения при строительстве нефтяных скважин на живые организмы».

Структура расчетно-пояснительной записки представлена введением, двумя главами, заключением, списком литературы и приложениями. Работа включает 72 страницы, 28 рисунков, 13 таблиц, 3 формулы и 3 приложения. Список литературы включает 55 источников.

Во введении определены актуальность темы, использование и воздействие продуктов нефтедобывающей отрасли, влияние микроорганизмов на нефтепродукты, указаны цели и задачи ВКР (МД). В первой главе представлена аналитическая часть дипломного проекта, где более подробно описано использование растворов для ликвидации поглощений буровых промывочных жидкостей низкой интенсивности при строительстве нефтяных скважин, воздействие строительства нефтяных скважин и использования солевых растворов на почву и растительность, а также влияние микроорганизмов на повышение устойчивости растений к нефтяному и солевому загрязнению почв. Во второй главе представлена исследовательская часть магистерской диссертации, где описаны и проанализированы объекты исследования, метод инокуляции тестовых растений, вегетационные опыты, степень микоризной инфекции, анализ флуоресценции и обработаны результаты полученных данных.

В заключении приведены основные результаты проекта.

ВКР УлГУ

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 3

ГЛАВА 1 АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР 5

1.1 Использование растворов для ликвидации поглощений буровых промывочных жидкостей низкой интенсивности при строительстве нефтяных скважин 5

1.2 Воздействие строительства нефтяных скважин и использования солевых растворов на почву и растительность 8

1.3 Влияние микроорганизмов на повышение устойчивости растений к нефтяному и солевому загрязнению почв 15

ГЛАВА 2 ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ РАЗДЕЛ 18

1 Методы и объекты исследований 18
1.1 Объекты исследования 18
1.2 Методы исследования 22
1.2.1 Инокуляция тестовых растений 22
1.2.2 Вегетационные опыты с тестовыми растениями 24

2 Результаты лабораторного эксперимента 28
2.1 Биохимические и физиологические показатели тестовых растений 28
2.2 Степень развития микоризной инфекции в корнях тестовых растений 38

2.3 Анализ флуоресценции хлорофилла в тестовых растениях 39

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 47

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 49

ПРИЛОЖЕНИЯ 59

ВКР УлГУ

ВВЕДЕНИЕ

В современном мире нефтедобывающая отрасль занимает важное место в экономике. Но ее развитие сопровождается существенными негативными экологическими воздействиями, такими как поглощение буровых промывочных жидкостей, которые являются одним из видов осложнений при бурении скважин, и их устранение требует значительных временных и материальных ресурсов. Наиболее подвержены поглощению продуктивные и водоносные горизонты, отличающиеся высокой пористостью и низким пластовым давлением.

Степень поглощения определяется интенсивностью процесса и разницей давлений между скважиной и пластом. Поглощения классифицируются по степени их интенсивности [2, 17, 30, 36, 37, 45]. Так, поглощения умеренной и частичной силы относят к поглощениям низкой интенсивности, а полные и катастрофические – к поглощениям высокой интенсивности.

Формирование большого количества трещин в породе способствует скоплению в них нефти. Объем накапливаемой нефти прямо пропорционален количеству таких трещин. Вторичными образованиями по отношению к трещинам являются поры, которые возникают в результате растворения гипса и известняковых компонентов породы под воздействием воды, циркулирующей по трещинам. Соединяясь друг с другом через трещины, поры создают единую гидравлическую систему.

Закачка насыщенных растворов разных солей является техническим решением для ликвидации поглощений низкой интенсивности. Процесс заключается в порционной закачке солевых растовров в поглащающтй пласт, с последующим перемешиванием их в пласте, для образования нерастворимого осадка. Образовавшийся осадок эффективно закупоривает поглащающие каналы [24]. Внесение таких солевых растворов оказывает деструктивное

ВКР УлГУ

воздействие на почву, приводящее к ее засолению. Это, в свою очередь, губительно для растительности, поскольку повышенное содержание легкорастворимых минеральных солей (более 0,25%) является токсичным для растений, вызывая у них солевой стресс. В связи с этим особое значение приобретает разработка методов, позволяющих активировать защитные механизмы растений и повышать их устойчивость к солевым нагрузкам.

Микроскопические грибы, влючая патогенные и симбиотические виды, играют важную роль в экосистеме. Исследования показывают, что инокуляция грибами может оказать положительное воздействие на устойчивость растений к различным стрессовым факторам, в том числе к солевому стрессу. Использование таких грибов в качестве биологических агентов может помочь растениям вырабатывать защитные механизмы.

Таким образом, актуальность исследования обусловлена возрастающей необходимостью поиска инновационных и экологически безопасных методов повышения устойчивости растений к солевому стрессу в условиях нефтедобывающей отрасли.

Исходя из этого, целью данной работы является: изучить влияние продуктов ликвидации зоны низкой интенсивности поглощения при строительстве нефтяных скважин на растения и микромицеты.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1) Изучить влияние микромицетов на устойчивость растений к солевому раствору;

2) Провести лабораторный эксперимент по оценке влияния солевого раствора для заполнения скважин нефтедобывающей отрасли на биологические показатели тестовых растений;

3) Оценить устойчивость растений, инокулированных *Neonectria macrodidyma*, к содержанию экспериментального солевого раствора в субстрате;

ВКР УлГУ

4) Оценить возможность использования солевого раствора при строительстве нефтяных скважин.

ГЛАВА 1 АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР

1.1Использование растворов для ликвидации поглощений буровых промывочных жидкостей низкой интенсивности при строительстве нефтяных скважин

При строительстве нефтяных скважин важной задачей является обеспечение эффективного удаления буровых промывочных жидкостей из пористых и слоистых пород. Особенно актуально это при работе с поглощениями низкой интенсивности, когда поглощение буровых жидкостей в породы не превышает 10-15% от объема используемой жидкости. Метод ликвидации поглощений низкой интенсивности основан на создании барьера в пласте путем химического осаждения. В пласт закачиваются насыщенные растворы различных солей, которые, смешиваясь, образуют нерастворимый осадок, закупоривающий каналы поглощения. Закачка осуществляется порционно для обеспечения оптимального смешивания и осадкообразования [26].

Выбор методов ликвидации поглощений должен основываться на следующих критериях:

- Надежная изоляция зон поглощения для качественного цементирования скважины;
- Оптимизация технического процесса углубления ствола скважины в осложненных условиях для снижения временных и материальных издержек.

Методы борьбы с поглощениями бурового раствора в наши дни подразделяются на две основные группы:

ВКР УлГУ

- Предупреждение поглощений: комплекс мер, направленных на предотвращение утечек бурового раствора в пласт, во время углубления скважины;
- Ликвидация катастрофических поглощений: специальные методы, применяемые для полной остановки утечки бурового раствора в пласт, требующие приостановки бурения. Эти методы включают в себя, например, закачку тампонирующих составов, изоляционные работы или установку специальных устройств, для перекрытия зоны поглощения [26].

Основным профилактическим мероприятием по предотвращению и ликвидации поглощающих зон является процесс закупоривания трещин или кольматация. Эффективность кольматации определяется соотношением ширины раскрытия трещин и гранулометрическим составом кольматанта, а также величиной репрессии на пласт.

В России разработаны и применяются различные инертные наполнители. Специальные растворы работают по типу закупорки каналов поглощения в поглощающем пласте. Это необходимо, потому как поглощение происходит, когда гидростатическое давление столба бурового раствора больше пластового, и раствор начинает проникать в имеющиеся трещины и поры. Для борьбы с поглощением применяют растворы с минимально возможной для данных условий плотностью, большой вязкостью, прочной структурой и минимальной водоотдачей. Нередко, в их состав вводят разные наполнители, которые способны закупорить трещины, полости и поры. К таким наполнителям можно отнести резиновую крошку, отходы хлопкового волокна, реактопластов, опилки, волокна, стружку. Также в процессе корректируют свойства раствора, то есть уменьшают плотность, повышают динамическую вязкость и водоотдачу.

При добавлении наполнителей к буровым и тампонажным растворам возрастает их закупоривающая способность, что способствует уменьшению расхода растворов и материалов для их приготовления, а также сокращения

ВКР УдГУ

затрат времени на изоляционные работы. Тампонажные смеси представляют собой растворы на основе неорганических вяжущих полимеров или на глинистой основе. Обычно данные растворы состоят из цемента, воды и каких-либо добавок. Например, цемент может быть изготовлен на основе шлакового цемента, портландцемента, глиноземистого, гипсоглиноземистого и известково- кремнеземистого. В качестве жидкости затворения чаще всего используют воду, реже – углеводородную жидкость (нефть, дизтопливо). Добавки регулируют свойства раствора. То есть для изменения плотности используют утяжеляющие и облегчающие добавки; для повышения закупоривающей способности – наполнители; для корректировки сроков схватывания – ускорители и замедлители схватывания; для повышения текучести – разжижители. Чаще всего тампонажные растворы используют для решения следующих проблем: укрепление стенок скважин, заполнение трещин, изоляция пластов, защита обсадных труб, закрепление стенок скважин [5].

Снижение плотности бурового и тампонажного растворов способствует снижению гидростатического и гидродинамического давлений, а, следовательно, интенсивности поглощения. Однако, следует отметить, что к уменьшению плотности промывочной жидкости следует относиться с особой осторожностью, особенно при наличии в необсаженном стволе напорных пластов и неустойчивых пород. Снижение плотности бурового раствора достигается насыщением его воздухом (аэрацией) или разбавлением водой.

Аэрация раствора возможна двумя способами: компрессорный и бескомпрессорный. Первый способ предопределяет использование сжатого воздуха и его закачку от компрессора через специальные устройства в нагнетательную линию насоса. Второй способ предопределяет необходимость обработки бурового раствора поверхностно-активными веществами (сульфонол, диталан), лигносульфонатами (ФХЛС, КССБ) и другими вспенивающими реагентами [3].

ВКР УлГУ

Пены вводят в оборот в том случае, когда специальные растворы не приносят положительных эффектов. Пены получают путем смешивания воздуха и воды, которые содержат добавки ПАВ, бентонита и химических реагентов. Также они отличаются тем, что имеют высокую степень аэрации и низкую плотность. Пены обладают закупоривающей способностью поровых каналов. Работает она следующим образом: в ходе циркуляции пузырьки в призабойной зоне прилипают к поверхности поровых каналов, что в свою очередь и предотвращает поглощение промывочной жидкости. В зонах с аномально низким пластовым давлением могут использовать пеноцементы, которые содержат вещества, способствующие ускорению затвердевания.

Следует отметить, что к разбавлению раствора водой следует подходить с особой осторожностью, т. к. можно необратимо ухудшить качество раствора.

1.2 Воздействие строительства нефтяных скважин и использования солевых растворов на почву и растительность

В процессе бурения нефтяных скважин большое количество загрязняющих веществ с разным уровнем токсичности поступают в окружающую среду и оказывают значительное негативное воздействие на все ее компоненты.

В процессе оценки воздействия нефтегазового комплекса на окружающую среду значительное влияние уделяется почвам. Так как гумусовый горизонт почвы является основным накопителем загрязняющих веществ, что вследствие приводит к их поступлению в растительный мир и, через трофические связи, в человеческий организм [48].

Основными источниками загрязнения почвы нефтепродуктами являются:

- аварийные проливы при проведении различных операций;

ВКР УдГУ

- нарушение герметичности резервуаров и трубопроводных коммуникаций (в том числе из-за коррозии);
- выход из нормального режима эксплуатации технологического оборудования;
- нарушение правил эксплуатации технических средств и технологического оборудования;
- образование неутилизированных отходов.

Химическое загрязнение почв, вызванное поступлением нефтепродуктов, буровых и тампонажных растворов, происходит вследствие некачественной обваловки и гидроизоляции амбаров. Определение безопасного уровня таких загрязнителей основывается на оценке естественной способности почвы к восстановлению. Нефтяное загрязнение является наиболее устойчивым и опасным среди всех видов загрязнений. В почвах песчаного и супесчаного типа нефть может проникать на значительную глубину – 1,0 м и более. Степень загрязнения оценивается по глубине проникновения: сильное загрязнение характеризуется проникновением нефти свыше 25 см, а слабое до 10 см [11].

Загрязнение почв морских и грунтовых вод во время бурения скважин обусловлено несколькими факторами. К таким факторам относятся буровые растворы, в состав которых входят различные химические реагенты, буровые растворы на нефтяной основе. Помимо этого, в качестве загрязнителя выступают пластовые воды, которые могут содержать до 300 кг солей в 1 кубометре. На отдельных месторождениях соотношение извлекаемых пластовых вод к добытой нефти может достигать 10:1.

Буровые сточные воды (далее БСВ) составляют основную массу отходов при бурении скважин. Они представляют собой многокомпонентные суспензии, содержащие нефть, нефтепродукты, минеральные и органические соединения. В растворенном виде в них присутствуют минеральные соли (натрия, калия, кальция, магния и химические реагенты). Нефтепродукты в БСВ могут находиться как в эмульгированном, так и в растворенном состоянии. Высокая

ВКР УлГУ

концентрация загрязняющих веществ делает БСВ непригодными для сброса в природные объекты без обязательной предварительной очистки [10].

Для эффективной и экологически безопасной утилизации буровых сточных вод (далее БСВ) наиболее целесообразно осуществить переход на замкнутый цикл водоснабжения на буровой установке. Такой подход обеспечит снижение норм водопотребления, а также сточные воды можно использовать повторно, например, для приготовления тампонажных растворов. По завершении строительства скважины, БСВ и отходы буровых растворов (далее ОБР) целесообразно вывозить на соседние объекты для повторного использования [10].

Шламовые амбары - это токсичный очаг, который является источником загрязнения для прилегающих территорий. Процесс строительства сопровождается деградацией растительного покрова (вырубка деревьев и кустарников), уничтожением надпочвенного покрова и отчуждением земельных ресурсов. Все это приводит к исключению из хозяйственного оборота существенных площадей, занятых шламовыми амбарами, содержащими токсичный буровой шлам. К основным категориям буровых отходов относятся выбуренные породы, отработанные буровые растворы, буровые сточные воды с осадком и буровой шлам [10].

Так как в составе бурового шлама присутствует порода (60–80%), органическое вещество (8–10%), водорастворимые соли (6%), нефть, разнообразные реагенты и т. п. [43], то ключевое негативное воздействие на объекты окружающей среды будет обусловлено загрязнением химическими реагентами, минеральными солями и нефтепродуктами.

Основными причинами негативного воздействия бурового шлама на водные ресурсы (подземные и поверхностные) в первую очередь связаны с недостатками из-за ненадлежащего устройства шламовых амбаров. К таким недостаткам относятся, например, отсутствие или неисправность гидроизоляционного слоя, а также отсутствие защитных насыпей (обваловок) и

ВКР УлГУ

каналов для отвода воды. Кроме того, загрязнение может произойти, когда буровой шлам, хранящийся на территории буровой вне специально оборудованных амбаров, контактирует с дождем или талым снегом, вызывая подтопление участка.

Нарушенная гидроизоляция шламового амбара приводит к снижению продуктивности почвенного покрова, вследствие чего происходит загрязнение подземных и повехностных вод.

Трубопроводы среди линейных объектов занимают первое место по масштабам негативного воздействия на растительность и почву. Во время их эксплуатации могут образовываться свищи и аварийные порывы, что приводит к загрязнению обширных земельных участков нефтью и минеральными водами (до 32 м в ширину и до 220 м в длину в зависимости от размера труб) [8].

Строительство и введение в эксплуатацию скважин приводит уничтожению до 80 % почвенного покрова, загрязнению до 40 % площади нефтью, буровыми растворами и химическими реактивами [8].

Наиболее существенное негативное воздействие на биоценозы и почвы прилегающих территорий оказывают аварийные разливы нефти. Участки с умеренным загрязнением, где деградация растительности обратима и не требует рекультивации, составляют менее 5% от общей площади загрязнений.

Источниками разливов минеральных вод являются буровые установки, а также объекты, обеспечивающие заводнение нефтяных пластов: насосно-компрессорные станции (далее КНС), центральные насосные станции (далее ЦПС) и водоводы. Высокое содержание ионов хлора в почвах, превышающее 0,1% являются очевидным показателем солевого воздействия на растительность. В результате чего на территории разлива наблюдается полная гибель фитоценозов.

Процесс бурения скважин характеризуется потреблением ориентировочно 1,0 м3 на каждый метр проходки, во время которого происходит загрязнение токсичными веществами. Состав этих буровых

ВКР УлГУ

сточных вод (далее БСВ) напрямую зависит от геологических особенностей месторождения (минерального состава пород, наличие солевых пластов и рассолов) и используемых химических добавок. Сброс БСВ в природную среду недопустимо, так как это приводит к полной гибели растительности на загрязненных участках. Поэтому необходимо предусмотреть утилизацию таких вод в процессе строительства скважин и осуществить переход на полный и частичный замкнутый цикл водообеспечения буровой, во время которого БСВ будут попадать в отстойники, а образовавшийся осадок перекачивается в шламовый амбар для утилизации [42].

Для очистки почв от нефтяных загрязнений применяются механические, физические, термические, физико-химические, химические и биологические методы. Выбор методов зависит от характера, уровня и глубины загрязнения.

На первых этапах ликвидации загрязнений почв применяются механические способы сбора разлитой нефти, так как они наиболее эффективны с точки зрения экологической безопасности. А также применяются в совокупности с физико-химическими методами очистки (промывка, сжигание, сорбция) [48].

Использование методов, основанных на материалах способных адсобировать и абсорбировать нефть. К таким материалам относятся торф, мох, опилки, сено, полиуретан, целлюлоза, смолы. Такие искусственные сорбенты обладают наибольшим потенциалом, так как могут многократно использоваться после регенерации (до 30 раз) [48].

Химические методы применяют при ликвидации нефтяных разливов при помощи эмульгаторов для создания эмульсий с целью ускорения разложения нефти; отвердители, придающие нефти густую консистенцию; моющие средства для смывания нефтяных пленок, пятен и покрытий с пляжных участков [48].

Биотехнология - один из наиболее эффективных методов при очистке почв, при котором происходит окисление нефтепродуктов при помощи

ВКР УлГУ

микроорганизмов. Данный процесс обеспечивает расщепление углеводородов, их минерализация и последующая гумификация [48].

При восстановлении нарушенных земель биологическим методом рекультивации большое значение имеет способность растений аккумулировать некоторые загрязнители. Хотя многие научные исследования демонстрируют взаимосвязь между химическим составом растений и элементным составом среды. Однако прямого соответствия не наблюдается, так как растения в некоторых случаях демонстрируют избирательность к накоплению химических элементов [35].

Определение точных нормальных концентраций микроэлементов в растениях представляет собой непростую задачу для исследователей, что приводит к разногласиям в научных работах. Это обусловлено тем, что определение токсичных уровней для каждого элемента является сложным процессом, поскольку на него влияет целый комплекс факторов, таких как тип почвы, ее pH, влажность, содержание гумуса, наличие других металлов и питательных веществ, а также сам вид растения [35].

Когда почва насыщена солями, у растений происходит увеличение осмотического давления и осмотического градиента между их корнями и листьями. Это связано с тем, что происходит накопление в клетках повышенных концентраций осмотически активных гидрофильных ионов солей [25, 51]. Чрезмерная концентрация солей наносит вред, повреждая поверхностные структуры цитоплазмы, что ведет к увеличению ее проницаемости и потере селективности в транспорте веществ [1, 40, 44]. Также высокая концентрация солей влияет на повреждение мембранных структур, например, плазмолемма теряет способность к избирательному накоплению веществ [44]. Предполагается [18, 23], что увеличение осмотического потенциала клеточного сока также может быть вызвано накоплением низкомолекулярных органических соединений, связанных с метаболическими изменениями. Наблюдается тенденция к снижению суккулентности растений

ВКР УлГУ

при увеличении концентрации соли, что указывает на нарушение механизмов осморегуляции. Таким образом, при повышении концентрации хлорида натрия растения теряют способность поддерживать водный баланс органов, что негативно сказывается на их солеустойчивости [53].

Так же нарушаются обменные процессы, например, азотный обмен, в ходе которого накапливается аммиак и другие ядовитые вещества. Наибольшее отрицательное воздействие соли оказывают на корневую систему, в которой повреждаются наружные клетки, соприкасающиеся с раствором соли. В стебле больше всего подвержены клетки проводящей системы [9].

В последствии растения активируют защитные механизмы, зачастую направленные на минимизацию проникновения солей. Процесс проникновения солей в клетки растений сложен: он включает в себя как поглощение и накопление солей в протоплазме, так и их последующее высвобождение в клеточный сок. У некоторых видов растений эта способность выражается в активном выведении и концентрировании солей, в то время как другие просто не позволяют им проникать. Таким образом, солепроницаемость плазмы неодинакова: виды, способные к экскреции солей, обладают наибольшей проницаемостью, тогда как солеустойчивые растения, не пропускающие соли, имеют наименьшую. Растения, накапливающие соли, занимают промежуточную позицию [7].

В отсутствие прямых защитных механизмов против высокой концентрации солей, их адаптация может происходить через эффективные механизмы засухоустойчивости. Важным общим признаком соле- и засухоустойчивости является эффективная осморегуляция, обеспечивающая стабильность водного и осмотического потенциалов содержимого растительных клеток.

Для поддержания оптимального водного состояния клеток, используется еще один эффективный метод- аккумуляция низкомолекулярных соединений. Этот механизм основан на увеличении концентрации в клетках неорганических

ВКР УлГУ

ионов и/или совместимых осмолитов, к которым относятся аминокислоты, четвертичные ионы, сахароспирты и углеводы [35].

В процессе адаптации растений к стрессовым воздействиям окружающей среды, в том числе тяжелых металлов, задействуются различные метаболиты, такие как витамины, ферменты, пигменты, гормоны, фенольные соединения [7].

1.3 Влияние микроорганизмов на повышение устойчивости растений к нефтяному и солевому загрязнению почв

Нефтяное и солевое загрязнение почвы представляют серьезную угрозу для растительного мира, поскольку данные факторы приводят к снижению фотосинтеза, нарушению обмена веществ, ухудшению плодоношения и т.д. В поисках эффективных решений, в настоящее время возрос интерес к использованию микроорганизмов для укрепления защиты растений от этих негативных воздействий. Такие микроорганизмы способны полностью разлагать нефть и ее компоненты до углекислого газа и воды, а также повышают устойчивость растений к засолению [22].

В процессе восстановления загрязненных почв и повышения их плодородия ключевую роль играют микроорганизмы. Бактерии, грибы и актиномицеты участвуют в различных биохимических процессах, таких как биоремедиация и биостимуляция, эффективно, снижая токсичность загрязняющих веществ, и улучшают условия, необходимые для активного роста растений [12].

Биоремедиация нефтяных загрязнений:

- Деградация нефти и её компонентов: процесс деградации нефти и ее компонентов возможен такими видами бактерий, которые являются представителями таких родов как *Pseudomonas, Alcanivorax, Rhodococcus*. Эти микроорганизмы преобразуют углеводороды нефти в углекислый газ и воду

ВКР УлГУ

или в промежуточные соединения, которые могут быть усвоены другими микроорганизмами. Данный процесс приводит к повышению фиторезистентности, поскольку токсичное воздействие загрязняющих веществ на их организм снижается.

- Улучшение структуры почвы: разложение сложных органических веществ происходит под действием работы микроорганизмов. Вследствие чего происходит улучшение аэрации и водопроницаемости почвы.

- Стимуляция роста растений. Выделяемые микроорганизмами биологически активные вещества, такие как фитогормоны, витамины, вторичные метаболиты, способствуют улучшению фосфорного и азотного питания и повышают стрессоустойчивость.

- Продуцирование биосурфактантов. Повышение биодоступности гидрофобных компонентов в почве и их дальнейшая биодеградация, достигается с помощью эндофитных штаммов бактерий, что стимулирует защитные механизмы растений.

Повышение устойчивости к солевому стрессу:

- Микробиологическая фиксация азота: бактерии способствуют растениям в получении азота из атмосферы, что важно при ограниченных ресурсах. Такие бактерии относятся к роду *Rhizobium*.

- Обеспечение солеустойчивых метаболических путей: существует ряд микроорганизмов, которые синтезируют осмолитики и другие соединения, помогая растениям адаптироваться к высоким концентрациям солей.

- Регуляция синтеза и накопление осмопротекторов и сигнальных молекул. Данный процесс усиливает толерантность растений к стрессу, повышает доступность питательных веществ и укрепляет антиоксидантную систему.

- Обеспечение растений фитогормонами. Так как они участвуют в регуляции роста и общем смягчении стресса. К таким фитогормонам можно отнести ауксин, цитокинин и абсцизовая кислота.

ВКР УлГУ

- Продуцирование соединений, модулирующие растворимость питательных веществ и связывающие Na+.
- Регулирование осмотического баланса и гомеостаза ионов осуществляется с помощью микроорганизмов, которые способствуют синтезу защитных клеточных компонентов, таких как аминокислоты, сахара, полиолы и бетаины.
- Микоризные грибы: уменьшают негативное воздействие солевых стрессов путем поглощения воды и минералов.

Текущий научный подход к борьбе с нефтяным и солевым загрязнением почв основывается на использовании микроорганизмов, таких как бактерии, грибы и актиномицеты. Эти микроорганизмы эффективно разлагают нефть, улучшают структуру почвы, стимулируют рост растений и повышают их устойчивость к стрессам. В частности, они способствуют деградации токсичных веществ, укрепляют питание растений, обеспечивают фиксацию азота и синтезируют защитные соединения, что способствует восстановлению плодородия и снижению токсичности загрязнений. Такой биологический метод является перспективным и экологически безопасным решением для восстановления загрязненных почв.

ВКР УлГУ

ГЛАВА 2 ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ РАЗДЕЛ

1 Методы и объекты исследований

1.1 Объекты исследования

Почвенные грибы рода *Cylindrocarpon* (Teleomorph: *Neonectria wolenw = Dactylonectria = I lyonectria*) представляет собой группу повсеместно распространенных почвенных грибковых патогенов, вызывающих заболевание "черная ножка" у разнообразных растений-хозяев, включая виноградную лозу, клубнику, яблони и хвойные деревья. Заражение растений – хозяев видами *Cylindrocarpon* происходит через раны на корнях и других подземных частях подвоя, причем стрессовые условия могут способствовать проявлению заболевания. Были зафиксированы случаи поражения виноградной лозы черной ножкой, вызванной Neonectria macrodidyma и тремя другими видами рода (*C. destructans, C. liriodendra или C. macrodidyma*), в питомниках и на виноградниках в многочисленных странах, таких как Австралия, Канада, Чили, Новая Зеландия, Южная Африка, Испания, Тасмания, США и Уругвай [50, 55].

Neonectria macrodidyma (таксономия представлена ниже), патоген, имеющий существенное экономическое значение для калифорнийских питомников, особенно для рассады в контейнерах, а также для сеянцев яблони, сосны и других хвойных деревьев [55], был впервые обнаружен в 2011 году. С тех пор этот грибок, ранее известный как *Cylindrocarpon macrodidymum*, регулярно выделяется из образцов цитрусовых, демонстрирующих симптомы сухой корневой гнили. Широкое распространение Neonectria macrodidyma и его роль в развитии сухой корневой гнили цитрусовых предполагают возможность

ВКР УлГУ

его взаимодействия с другими ключевыми почвенными патогенами Калифорнии, включая *Fusarium solani, Phytophthora nicotianae и P. Citrophthora*, которые являются основными возбудителями корневых и/или прикорневых гнилей цитрусовых [50].

Этот патоген, вызывающий некроз растений, недавно был переименован в *Dactylonectria macrodidyma* (ранее *Ilyonectria macrodidyma*). Помимо уже известных основных почвенных патогенов цитрусовых в Калифорнии – *Phytophthora nicotiana* (ранее *P. n. var. parasitica*), *P. citrophthora и Fusarium solani*, – *Neonectria macrodidyma* и другие представители рода *Cylindrocarpon spp*. рассматриваются как возможные, но еще не полностью изученные угрозы [49].

Таксономия:

Царство	Fungi
Тип	Ascomycota
Подтип	Pezizomycotina
Класс	Sordariomycetes
Подкласс	Hypocreomycetidae
Отряд	Hypocreales
Семейство	Nectriaceae
Род	Dactylonectria
Вид	Neonectria macrodidyma

Тест – культуры

Для изучения влияния инокуляции растений – мелиорантов эндотрофными микромицетами на их биохимические показатели, использовались такие тест – культуры, как мятлик луговой и овсяница луговая, обладающие высокой скоростью роста корневой системы и быстрым заражением корней грибами.

ВКР У ДГУ

Poa pratensis, или мятлик луговой, – это многолетнее злаковое растение, известное своей многогранностью и отличной выносливостью. Его активно используют для формирования густых травяных покрытий, организации пастбищ и заготовки кормов, а также в целях декоративного благоустройства территорий [29].

Это растение характеризуется наличием подземных и ползучих побегов, способных формировать как плотные, так и рыхлые дерновины. Высота стеблей варьируется от 30 до 90 см, иногда от 10 до 20 см. Листья узкие, линейные, шириной не более 4 мм, могут иметь гладкую или слегка шероховатую поверхность. Соцветие – метёлка длиной до 20 см, продолговатой или пирамидальной формы, состоит из многочисленных колосков (по 3-5 на шероховатых веточках). Колосковые чешуи практически идентичны и заострены, в то время как нижние цветковые чешуи ланцетовидные, с выраженными опушёнными жилками и обильными соединительными волокнами у основания. Плод представляет собой семянку без остей, продолговатую и трехгранную, длиной от 2 до 2,7 миллиметров и шириной до 0,6 миллиметров [31].

Нетребователен к климатическим условиям, превосходя многие другие травы по зимостойкости и морозоустойчивости. Теневыносливость и засухоустойчивость оцениваются как средние, уступая овсянице красной. Наиболее благоприятными для мятлика луговго относятся плодородые, нейтральные, связные глинистые и суглинистые почвы, устойчив к переуплотнению. Он также способен выдерживать продолжительное затопление талыми водами. Однако для оптимального развития необходимо избегать условий с pH ниже 5.5 и засолением выше 5000 ppm, хотя существуют специализированные сорта (например, *Moonlight SLT*) для адаптации к орошению морской водой. Устойчив к токсичным выбросам, даже произрастая вблизи от загрязняющих объектов. Тем не менее, в тени мятлик луговой

ВКР УлГУ

становится уязвимым для мучнистой росы и ржавчины, что ограничивает его применение на затененных территориях [24].

Festuca pratensis – овсяница луговая, представляет собой многолетнее трявянистое растение, относится к роду Овсяница (*Festuca*) семейства Злаки, или Мятликовые (*Poaceae*) [32].

Овсяница луговая отличается развитой мочковатой корневой системой, способной проникать на глубину свыше 2 метров, что обеспечивает ей высокую засухоустойчивость. Большая часть корней сосредоточена в верхнем, пахотном слое почвы. Растение имеет прямостоячий, гладкий, округлый стебель высотой 120-170 см. В кусте преобладают короткие, густо облиственные вегетативные побеги. Листья линейные, плоские, с глянцевой нижней поверхностью и характерными ушками у основания, охватывающими стебель. Хотя листья в основном сосредоточены у основания в виде розетки, облиственность самого стебля составляет около 29%. Соцветие представляет собой метелку, которая в период до и после цветения сжата, а во время цветения становится раскидистой. Семена, заключенные в сероватые, легко осыпающиеся пленки, являются текучими [35].

Овсяница луговая обладает хорошей устойчивостью к низким температурам, однако очень чувствительна к перепадам температур, особенно к весенним и осенним заморозкам. Это влаголюбивое растение способно переносить затопление паводковыми водами до 10-12 дней. Засушливые периоды переносит плохо, но благодаря развитой корневой системе, проникающей глубоко в почву, более устойчива к засухе. Овсяница луговая предпочитает солнечные места, лучше развивается на открытых, хорошо освещенных участках. Растет на глинистых и суглинистых почвах, а также на мергелистых почвах с умеренным содержанием питательных веществ и гумуса. Не переносит переувлажнения и заболоченные почвы, хорошо растет на улучшенных торфяниках, а также на лугах в поймах рек и низинах. Может расти на слабокислых почвах (pH 5-6) и устойчива к засолению. Растение

ВКР УлГУ

хорошо переносит вытаптывание, засуху, уплотнение почвы и загрязнение воздуха [33].

1.2 Методы исследования

1.2.1 Инокуляция тестовых растений

Технология культивирования тест - культуры газонной травы.

Для закладки почвы использовали контейнеры площадью 0,0198 м² и массой 15 грамм. В качестве субстрата использовали кокосовую стружку и песок в соотношении 2:1, суглинистую, дерново – подзолистую и окультуренную почвы. В результате масса в воздушно - сухом состоянии составила: кокосовая стружка и песок - 127,5 грамм, суглинистая почва - 885 грамм, дерново – подзолистая почва - 750 грамм, окультуренная почва - 655,8 грамм. Затем производился полив субстрата до влажного состояния. Полив осуществлялся дистилированной водой: кокосовая стружка и песок - 200 мл, суглинистая почва - 50 мл, дерново – подзолистая почва - 25 мл, окультуренная почва - 25 мл.

Поскольку целью исследования является изучение воздействия солевого раствора, анализ на определение типа почвы не проводился. Предполагается, что использованные субстраты относятся к определенным типам, исходя из того, что они были отобраны в местах, для которых эти типы являются характерными.

Семена газонной травы (мятлик луговой 50%, овсяница луговая 50%) высаживались в контейнеры в почвенный субстрат с массой семян на один контейнер 2 грамма. Инокулированные растения в данном и последующих экспериментах выращивались в климатической камере BINDER KBWF-720 (Германия) в условиях, отвечающих требованиям культивирования:

ВКР УдГУ

температура +23ºС (8:00-20:00) и ночная – +19 ºС (20:00-8:00); освещенность – 20000 лк, продолжительность светового дня 10 часов.

Тест-культуру полили солевым раствором. Количество данного раствора рассчитывали по соотношению к площади контейнера, объем составил 12,8 мл. Солевой раствор был введен в контейнеры с вариантами А1 – без гриба и с солевым раствором и А2 – с грибом и с солевым раствором.

Во всех контейнерах наблюдалось активное проростание семян, кроме вариантов В0 (инертный субстрат – кокосовая стружка + песок).

Процесс выращивания микроскопического гриба *Neonectria macrodidyma* включал подготовку питательной среды на основе декстрозного бульона, агар-агара и дистиллированой воды. Эта среда подвергалась автоклавированию при 121 ºС в течение 15 минут для стерилизации. Затем, после остывания, в нее вводили антибиотик стрептомицин (0,0018 мг/100 мл). Полученную смесь заливали в чашки Петри. После отвердевания среды в чашках, гриб высевали с использованием цилиндра [21].

Выращенный микроскопический гриб использовался в создании накопительной культуры для инокуляции растений. Для данного процесса изготавливался декстрозный бульон и подвергался автоклавированию. После охлаждения бульон разливали в колбы по 200 мл, добавляли антибиотик стрептомицин (0,0018 мг/100 мл) и помещали высечки грибов. Колбы были герметично закрыты стерильными пробками и помещены в шейкер (60 оборотов в минуту, при температуре 25 ºС) для дальнейшей инкубации. По достижении грибом многократного увелечения объема, отделили бульон путем процеживания. Мицелий разбавили стерильной водой и подвергли измельчению в блендере. Полученную суспензию использовали для последующего заражения.

После прорастания посевного материала производилась инокуляция грибной суспензии эндотрофного гриба Neonectria macrodidyma, в объеме 20 мл

ВКР УлГУ

на один контейнер, путем полива. Грибная суспензия была введена в контейнеры с фактором А2 – с грибом и с солевым раствором.

1.2.2 Вегетационные опыты с тестовыми растениями

Исследования проводились в УНЛ «Экологические биотехнологии» ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет» в период с февраля по июль 2025г.

Для проведения исследований был заложен лабораторный эксперимент по инокуляции растений-мелиорантов микроскопическими эндотрофными грибами, и, с целью изучения их выносливости к раствору для заполнения скважин нефтедобывающей отрасли.

Опыт, по выявлению влияния инокуляции грибом Neonectria macrodidyma на устойчивость растений к раствору для заполнения скважин нефтедобывающей отрасли, был заложен по следующей схеме:

Фактор А – наличие раствора и гриба	**Фактор В – почва**
А0 – без гриба и без раствора	В0 – инертный субстрат (кокосовая стружка + песок)
А1 – без гриба и с раствором	В1 – суглинистая почва
А2 – с грибом и с раствором	В2 – дерново-подзолистая почва
	В3 – окультуренная почва

Все варианты опыта закладывались в 3-х кратном повторении (Таблица 1).

Таблица 1 – Варианты лабораторного эксперимента

А0В0	А0В1	А0В2	А0В3
А1В0	А1В1	А1В2	А1В3

ВКР УдГУ

A2B0	A2B1	A2B2	A2B3

Исследования представляли собой ряд последовательных лабораторных экспериментов.

Определение содержания сухого вещества в растительном материале

Содержание сухого вещества в тестовых культурах определяли по ГОСТ 31640-2012 Методы определения содержания сухого вещества.

Пустые бюксы заранее взвешивают на аналитических весах. Растительный материал измельчают с помощью ножниц и помещают в бюксы, которые снова взвешивают и помещают в сушильный шкаф.

Растительный материал высушивают до постоянной массы при температуре 105 ºС. Процесс высушивания составляет 2-3 часа, после чего бюксы вынимают из сушильного шкафа с помощью специальных щипцов и помещают для охлаждения в эксикатор. Когда бюксы с высушенным растительным материалом остыли, их взвешивают на аналитических весах [28].

Содержание сухого вещества (%) рассчитывают по формуле 1

$$М = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \times 100\ \%, \qquad (1)$$

где m_1 – масса бюкса, г;

m_2 – масса бюкса с сырм растительным материалом, г;

m_3 – масса бюкса с высушенным растительным материалом, г.

Определение содержания фотосинтетическик пигментов (хлорофиллов *a, b* и каротиноидов) – Эксперимент 1. Исследуемый материал был измельчен ножницами в объеме 0,1 грамм. Полученную биомассу поместили в форфоровую ступку, затем залили навеску небольшим количеством этилового спирта и довели путем перетирания до однородной массы. После чего пробирки с раствором подвергались центрифугированию, и проводился анализ на спектрофотометре ПЭ-5400 ВИ (Россия). Принцип работы

ВКР УлГУ

спектрофотометра ПЭ-5400 ВИ (Россия), осуществляется путем определения оптической плотности спиртовой вытяжки пигментов с дальнейшим расчетом концентрации пигментов по уравнениям Холма-Веттштейна [6,13]. Плотность экстракта на спектрофотометре измеряли при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения хлорофиллов *a* (660 нм) и *b* (642,5 нм) в красной области спектра и при длине волны абсорбционного максимума каротиноидов (440,5 нм). Результаты анализа приведены в таблице 3 [13].

Колличественное определение аскорбиновой кислоты (витамин С) (по С.М. Прокошеву)

Для начала анлиза отбирали надземную часть в объеме 0,1 грамм. После чего поместили в фарфоровую ступку для дальнейшего перетираяния до однородной массы с добавлением 1% HCl и поместили в пробирку. Затем ополаскивали ступку 1% щавелевой кислотой, полученый раствор так же сливали в пробирку и доводили до метки. Анализ проводился по ГОСТ 24556-89 (титриметрический метод).

Содержание малонового диальдегида (МДА) в листьях растений определяли по степени накопления продукта его реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Оптическую плотность раствора выявляли на спектрофотометре при длине волны 532 нм [19]. МДА в листьях растений идентифицировали путем доведения до однородности в реакционной среде, содержащей 0,5% раствор ТБК в 20 % трихлоруксусной кислоте (ТХУ).

Степень развития грибной инфекции (инокулята) в корневой системе растений.

Предварительно осуществляли подготовку корневой системы растений. С помощью метода Травло [47] с предварительной мацерацией корней, была установлена степень развития полезной грибной инфекции (инокулята) в корневой системе растений.

На водяной бане WB4MS осуществлялась мацерация корней газонной травы (мятлик луговой 50%, овсяница лугова 50%). Корни помещали в 10 %-ый

ВКР УлГУ

раствор КОН, после чего в течение 10 минут при температуре 95 °С держали на водяной бане. Затем корни помещали в 5 %-ный раствор HCl на 3 минуты, а после заливали 1 %-ным раствором трипана. Полученную смесь погружали на водяноую баню на 5 минут, при температуре 95 °С. Далее поместили в 96% этанол, после чего нагревали на водяной бане в течение 2 минут при той же температуре. По окончании мацерации корни растений заливали специальным раствором (молочная кислота, глицерин и дистиллированная вода в соотношении 1:2:1) и хранили до процедуры микроскопирования.

Определение степени развития грибной инфекции в корневой системе проводили с помощью метода микроскопирования с использованием цифрового микроскопа Levenhuk D870T (Германия) с кинокамерой, 8 Мпикс, тринокулярного при увеличении ×100. Для количественного учета использовали шкалу насыщенности корней микромицетами, которая включает 6 классов (таблица 2). Каждый класс соответствует определенной плотности грибной инфекции в корне и, соответственно, проценту плотности от максимальной.

Таблица 2 – Классы насыщенности корней микромицетами для определения интенсивности развития грибной инфекции

Классы	5	4	3	2	1	0
Средняя	95 %	80 %	50 %	20 %	5 %	0 %
Диапазон	100-88	87-66	65-36	35-13	12-1	0

ВКР УлГУ

Далее рассчитывали показатели, характеризующие общее развитие эндотрофных грибов в корне растения: частоту встречаемости грибной инфекции (F, %) и интенсивность развития грибной инфекции в корне (M, %).

Частоту встречаемости грибной инфекции, выраженную в процентах, вычисляли по формуле:

$$F = \frac{100 \times (N - n)}{N} \quad (2)$$

где N – общее число просмотренных отрезков;

n – число отрезков без гриба.

Интенсивность развития грибной инфекции, пересчитанную на 1 см корня и выраженную в процентах, рассчитывали по формуле:

$$\mathrm{M} = \frac{95 \times \mathrm{n}_5 + 80 \times \mathrm{n}_4 + 50 \times \mathrm{n}_3 + 20 \times \mathrm{n}_2 + 5 \times \mathrm{n}_1}{\mathrm{N}} \quad (3)$$

где n_5 – сумма отрезков корней, относящихся к 5 классу;

n_4 – сумма отрезков корней, относящихся к 4 классу и т. д.;

N – общее число просмотренных отрезков.

2 Результаты лабораторного эксперимента

2.1 Биохимические и физиологические показатели тестовых растений

Для изучения возможности эндотрофных грибов влиять на адаптацию высших растений к засоленным условиям почвы был проведен эксперемент с популяциями гриба *Neonectria macrodidyma.* Данные популяции применялись для инокуляции тестовых культур, представленных газонной травой. В рамках эксперемента растения с инокуляцией и без нее выращивались как в загрязненном солевым раствором субстрате, так и без внесения раствора. В качестве субстратов использовались 4 вида почвы: инертный субстрат (кокосовая стружка и песок), суглинистая, дерново – подзолистая и окультуренная почвы.

ВКР УлГУ

По завершению вегетационного опыта у растений была измерена биомасса надземной части и проведен биохимический анализ следующих показателей:

- содержание сухого вещества в надземной части растений;
- содержание фотосинтетических пигментов в растениях;
- содержание аскорбиновой кислоты в надземной части растений;
- содержание малонового диальдегида (МДА) в надземной части растений;
- степень заражения корней растений эндотрофным грибом *Neonectria m.* методом микроскопирования.

Результаты представлены в таблицах 3-6 и рисунках 1-3.

Таблица 3 – Биологические показатели тестовых растений

Вариант	Биомасса надземной части, г	Содержание сухого вещества в надземной части, г
A0B0	33,300 ± 0,000 33,300…33,300	10,000 ± 0,000 10,000…10,000
A0B1	108,333 ± 11,150 95,716…120,951	20,808 ± 2,202 18,316…23,299
A0B2	136,000 ± 5,292 130,012…141,988	14,338 ± 3,834 9,999…18,676
A0B3	185,667 ± 23,438 159,145…212,189	13,809 ± 1,375 12,253…15,365
A1B0	46,333 ± 18,771 25,093…67,574	10,750 ± 2,135 8,334…13,165
A1B1	130,667 ± 0,577 130,013…131,320	18,871 ± 0,902 17,850…19,892
A1B2	140,667 ± 11,930	15,953 ± 0,154

ВКР ИГУ

	127,166…154,167	15,778…16,127
A1B3	132,000 ± 21,166 108,049…155,951	13,999 ± 3,981 9,494…18,504
A2B0	48,333 ± 9,018 38,128…58,539	19,883 ± 7,868 10,980…28,786
A2B1	116,667 ± 25,697 87,588…145,745	17,527 ± 3,054 14,070…20,983
A2B2	133,333 ± 4,933 127,751…138,915	16,984 ± 3,566 12,949…21,019
A2B3	157,333 ± 25,166 128,856…185,811	15,379 ± 0,871 14,393…16,365
*Варианты опыта: А – наличие раствора и гриба: А0 – без гриба и без раствора, А1 – без гриба и с раствором, А2 – с грибом и сраствором; В – тип почвы: В0 – инертный субстрат, В1 – суглинистая почва, В2 – дерново-подзолистая, В3 – окультуренная почва.		

По содержанию сухого вещества наименьший показатель наблюдался на инертном субстрате (контрольный). Данный факт может быть обусловлен тем, что инертный субстрат содержит недостаточное количество питательных веществ, в частности азота, имеет плотную структуру, что ухудшает аэрацию. Увеличение количества сухого вещества, по сравнению с контролем (инертный субстрат), было выявлено в растениях без инокуляции, выращенных на суглинистой и окультуренной почвах (А0В1 и А0В3). При этом максимальное количество сухого вещества наблюдалось в образце А0В1 (суглинок). В других видах почвы по содержанию сухого вещества достоверных различий не наблюдалось. Внесение солевого раствора и грибной суспензии не повлияло на содержание сухого вещества во всех образцах.

Биомасса надземной части растений во всех образцах была достоверно больше, по сравнению с контрольным образцом (А0В0). После добавления

ВКР УлГУ

солевого раствора произошло уменьшение биомассы надземной части в образцах с окультуренной почвой (A1B3), по сравнению с контролем (A0B3). В остальных образцах достоверных изменений не наблюдалось. Визуально растения в резервуарах с добавлением солевого раствора имели более тонкие стебли, а также присутствовало различие в оттенках надземной части растений, они были более тусклого цвета, хотя темпы роста не отличались. В образцах с добавлением грибной суспензии достоверных изменений также не наблюдалось.

Таблица 4 – Кислотность почвы

Вариант	pH в начале экперимента	pH в конце эксперимента
A0B0	4,9 ±0,173 4,704…5,096	5,1 ± 0,819 4,474…6,326
A0B1	7,0 ±0,058 6,968…7,099	7,1 ± 0,306 6,788…7,479
A0B2	6,4 ± 0,058 6,301…6,432	6,3 ± 0,153 6,094…6,440
A0B3	6,9 ±0,208 6,631…7,102	7,1 ± 0,200 6,874…7,326
A1B0	4,5 ± 0,586 3,870…5,196	4,8 ± 0,500 4,234…5,366
A1B1	6,8 ± 0,781 5,916…7,684	6,3 ± 0,520 5,712…6,888
A1B2	5,8 ± 0,058 5,768…5,899	6,5 ± 0,551 5,910…7,157
A1B3	7,0 ± 0,643 6,306…7,761	6,7 ± 0,306 6,388…7,079
A2B0	4,1 ± 0,153 3,960…4,306	4,7 ± 0,208 4,498…4,969

ВКР У ДГУ

A2B1	6,2 ± 0,529 5,601…6,799	5,4 ± 0,200 5,174…5,626
A2B2	5,6 ± 0,200 5,374…5,826	6,5 ± 0,306 6,121…6,812
A2B3	6,6 ± 0,231 6,372…6,895	6,7 ± 0,351 6,269…7,064

*Варианты опыта: А – наличие раствора и гриба: А0 – без гриба и без раствора, А1 – без гриба и с раствором, А2 – с грибом и сраствором; В – тип почвы: В0 – инертный субстрат, В1 – суглинистая почва, В2 – дерново-подзолистая, В3 – окультуренная почва.

В вариантах с добавлением солевого раствора наблюдалось изменение pH дерново-подзолистой почвы (А1В2). В начале эксперимента в контрольном образце (А0В0) pH почвы сотавлял 6,4 – нейтральная, после внесения солевого раствора pH почвы составил 5,8 – слабо кислая, такой результат обусловлен засолением почвы. В конце эксперемента pH почвы вернулся к исходному показателю. Это свидетельствует о том, что в процессе вегетации растения продуцируют биохимические вещества, которые оказывают влияние на химический состав субстрата, окружающего корневую систему. Так, мятлик луговой (*Poa praténsis*) адаптирован к слабокислой среде и не переносит повышенной концентрации солей. Овсянница луговая (*Festuca pratensis*) также способна расти на слабокислых почвах (в диапазоне pH 5-6), но демонстрирует низкую толерантность к засолению.

В образцах с растениями, инокулированными грибом *Neonectria macrodidyma*, изменения были выявлены в вариантах с инертным субстратом (А2В0) и дерново-подзолистой почвой (А2В2). В данных образцах в начале эксперимента после внесения солевого раствора наблюдалось закисление почвы, а в конце эксперемента pH почвы вернулись к исходным показателям. Это может быть связано с тем, что эндофитные грибы трансформируют

ВКР УлГУ

минеральные вещества в более доступные формы, а растения путем взаимодействия с субстратом и выделением химических агентов, оказывают влияние на pH среды. Но для подтверждения этой версии необходимы дополнительные исследования.

Содержание фотосинтетических пигментов в тестовых растениях представлено на рисунках 1-3, а также в приложении А.

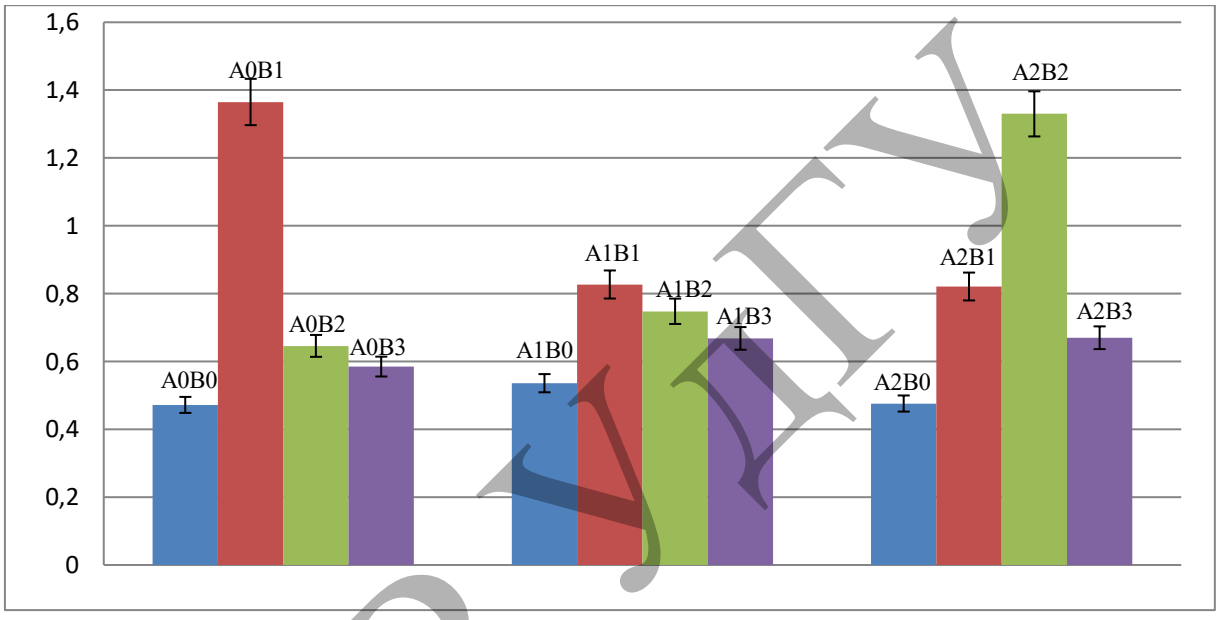


Рисунок 1 – Содержание хлорофилла *a* в тестовых растениях, мг/г. Варианты опыта: А – наличие раствора и гриба: А0 – без гриба и без раствора, А1 – без гриба и с раствором, А2 – с грибом и сраствором; В – тип почвы: В0 – инертный субстрат, В1 – суглинистая почва, В2 – дерново-подзолистая, В3 – окультуренная почва.

ВКР УлГУ

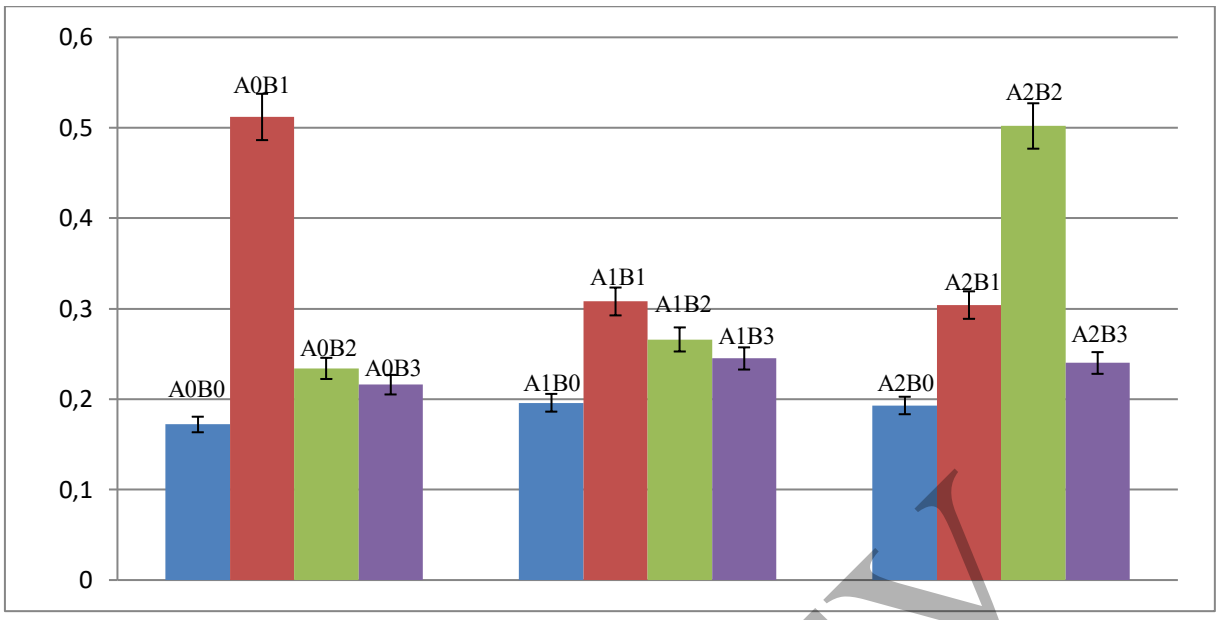


Рисунок 2 – Содержание хлорофилла *b* в тестовых растениях, мг/г. Варианты опыта: А – наличие раствора и гриба: А0 – без гриба и без раствора, А1 – без гриба и с раствором, А2 – с грибом и сраствором; В – тип почвы: В0 – инертный субстрат, В1 – суглинистая почва, В2 – дерново-подзолистая, В3 – окультуренная почва.

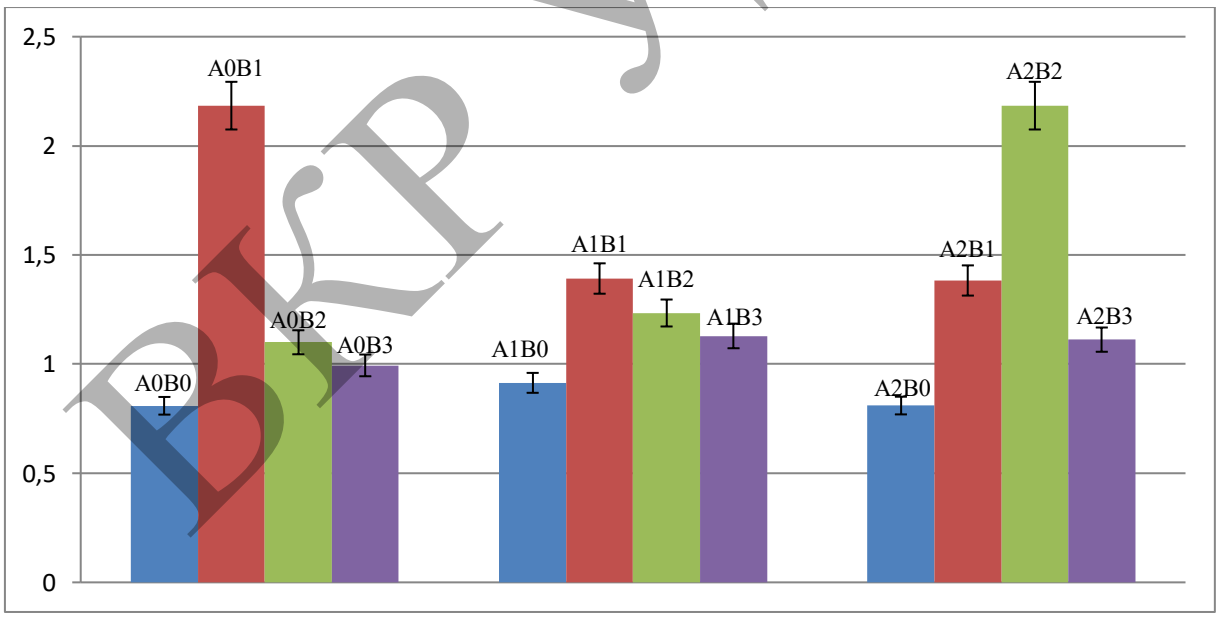


Рисунок 3 – Содержание каротиноидов в тестовых растениях, мг/г. Варианты опыта: А – наличие раствора и гриба: А0 – без гриба и без раствора, А1 – без гриба и с раствором, А2 – с грибом и сраствором; В – тип почвы: В0 – инертный субстрат, В1 – суглинистая почва, В2 – дерново-подзолистая, В3 – окультуренная почва.

ВКР УлГУ

Как видно по графическим рисункам 1 и 2, внесение солевого раствора не повлияло на выработку растениями фотосинтетических пигментов – хлорофилла *a* и *b*. При инокуляции растений грибом *Neonectria macrodidyma* наблюдалось повышение хлорофилла *a* в образцах с дерново-подзолистой (A2B2) и окультуренной (A2B3) почвами, а повышение хлорофилла *b* было выявлено только в образце с дерново-подзолистой почвой (A2B2), по сравнению с контролем (A0B0). Такие показатели могут быть связаны с тем, что эндофитные грибы способствуют ускорению процесса обмена веществ в растениях и стимулируют биосинтез хлорофилла в экспериментальных растениях.

По содержанию каратиноидов, представленных на графическом рисунке 3, почти во всех образцах достоверных изменений не наблюдалось. При инокуляции растений грибом *Neonectria macrodidyma* повышенное содержание каратиноидов наблюдалось в образце с дерново-подзолистой почвой (A2B2), такие показатели могут быть связаны с тем, что грибы участвуют в биосинтезе каратиноидов у растений. Это происходит путем передачи ферментов, учавствующих в биосинтезе каратиноидов, от гриба к растению, также усиливают адаптивные реакции растений, связанные с содержанием каратиноидов, в неблагоприятных условиях среды.

Для оценки влияния солевого раствора в субстрате, а также инокуляции эндофитным грибом *Neonectria macrodidyma* на тестовые растения был проведен анализ содержания витамина С, результаты которого представлены в таблице 5.

ВКР УлГУ

Таблица 5 – Содержание аскорбиновой кислоты, мг/100 г

Вариант	Среднее значение	Стандартное отклонение	-95%	+95%	Доверительный интервал
A0B1	118,600	4,095	113,966	123,234	4,634
A0B2	111,400	5,268	105,439	117,361	5,961

A0B3	109,100	14,532	92,656	125,544	16,444
A1B0	117,450	43,063	68,721	166,179	48,729
A1B1	142,600	24,659	114,696	170,504	27,904
A1B2	128,000	32,600	91,110	164,890	36,890
A1B3	96,500	7,550	87,957	105,043	8,543
A2B0	108,500	4,583	103,314	113,686	5,186
A2B1	145,500	22,650	119,870	171,130	25,630
A2B2	125,000	21,754	100,383	149,617	24,617
A2B3	105,800	1,386	104,232	107,368	1,568
A0B0	112,500	0,000	112,500	112,500	0,000
*Варианты опыта: А – наличие раствора и гриба: А0 – без гриба и без раствора, А1 – без гриба и с раствором, А2 – с грибом и сраствором; В – тип почвы: В0 – инертный субстрат, В1 – суглинистая почва, В2 – дерново-подзолистая, В3 – окультуренная почва.					

Согласно данным, представленным в таблице 5, в ходе оценки тестовых растений было установлено, что при внесении солевого раствора в почву достоверных изменений в содержании аскорбиновой кислоты в растениях не наблюдалось.

При инокуляции тестовых растений грибом *Neonectria macrodidyma* содержание аскорбиновой кислоты увеличилось в образце с суглинистой почвой (А2В1). Это может быть обусловлено тем, что эндотрофная микориза способствует выработке биологически активных веществ и выделению органических кислот и ферментов, которые обеспечивают биодоступность фосфора и азота, переводя их из труднодоступных форм в усвояемые. Но напрямую эндотрофные грибы не влияют на выработку витамина С в растениях.

ВКР УлГУ

Таблица 6 – Содержание малонового диальдегида (МДА), мкмоль/1 г сырой массы

Вариант	Оптическая плотность при D532	Оптическая плотность при D600	МДА
A0B0	0,228 ± 0,000 0,228…0,228	0,082 ± 0,000 0,082…0,082	0,00009
A0B1	0,279 ± 0,065 0,205…0,353	0,164 ± 0,019 0,143…0,185	0,00007
A0B2	0,296 ± 0,066 0,221….0,370	0,133 ± 0,100 0,019…0,247	0,00010
A0B3	0,272 ± 0,008 0,262…0,281	0,156 ± 0,020 0,133…0,179	0,00007
A1B0	0,316 ± 0,037 0,274…0,357	0,144 ± 0,008 0,136…0,153	0,00011
A1B1	0,339 ± 0,101 0,225…0,453	0,129 ± 0,080 0,039…0,219	0,00014
A1B2	0,350 ± 0,084 0,255…0,445	0,193 ± 0,010 0,182…0,204	0,00010
A1B3	0,317 ± 0,046 0,265…0,369	0,175 ± 0,026 0,146…0,205	0,00009
A2B0	0,294 ± 0,015 0,276…0,311	0,132 ± 0,069 0,054…0,211	0,00010
A2B1	0,375 ± 0,034 0,337…0,413	0,181 ± 0,083 0,087…0,276	0,00013
A2B2	0,346 ± 0,071 0,232…0,393	0,192 ± 0,044 0,142…0,242	0,00008
A2B3	0,256 ± 0,021 0,232…0,280	0,156 ± 0,009 0,147…0,166	0,00006
*Варианты опыта: А – наличие раствора и гриба: А0 – без гриба и без раствора,			

ВКР УлГУ

A1 – без гриба и с раствором, A2 – с грибом и сраствором; B – тип почвы: B0 – инертный субстрат, B1 – суглинистая почва, B2 – дерново-подзолистая, B3 – окультуренная почва.

При оптической плотности D532 содержание малонового диальдегида, после добавления солевого раствора, повысилось в образце с инертным субстратом (A1B0), такие показатели связаны с тем, что солевой стресс, вызывающий повреждение мембран, может приводить к увеличению концентрации МДА. При инокуляции растений грибом *Neonectria macrodidyma* также в образце с инертным субстратом (A2B0) было установлено повышение содержания малонового диальдегида по сравнению с контролем (A0B0). В остальных образцах достоверных изменений в содержании малонового диальдегида в растениях не наблюдалось.

2.2 Степень развития микоризной инфекции в корнях тестовых растений

Оценка развития грибов эндофитов в корнях проводилась путем окрашивания препаратов корней (*trypanblue 1%*). Предварительная мацерация корней осуществлялась согласно стандартным методикам, после чего проводился анализ под световым микроскопом [47]. Результаты, отражающие частоту и интенсивность развития грибковой инфекции в корнях растений, подвергшихся тестированию, представлены в таблице 7. Фотографии инфицированных корней, полученных с помощью цифрового микроскопа *Levenhuk D870T* с кинокамерой, 8 Мпикс, представлены в приложении Б.

Таблица 7 – Степень развития грибной инфекции в корнях тестовых растений

Вариант	Частота встречаемости грибной инфекции, %	Интенсивность развития грибной инфекции, %

ВКР УдГУ

A2B0	75,6 ± 13,9 59,9…91,3	7,8 ± 3,3 4,1…11,5
A2B1	88,9 ± 13,9 73,2…104,6	10,7 ± 3,6 6,6…14,8
A2B2	100 ± 0,0 100…100	30,9 ± 12,1 17,2…44,6
A2B3	95,6 ± 7,7 86,8…104,3	8,4 ± 2,5 5,6…11,3
*Варианты опыта: А – наличие раствора и гриба: А2 – с грибом и сраствором; В – тип почвы: В0 – инертный субстрат, В1 – суглинистая почва, В2 – дерново-подзолистая, В3 – окультуренная почва.		

Результаты анализа степени развития грибной инфекции в корнях тестовых растений показали, что все опытные образцы были успешно инокулированы грибом *Neonectria macrodidyma*. Данный факт подтверждается высокой частотой встречаемости грибной инфекции, достигавшей более 80%, за исключением растений, которые выращивались на инертном субстрате (кокосовая стружка и песок). Это может быть связано с тем, что инертный субстрат не содержит необходимые питательные вещества, в частности азот. Также кокосовая стружка и песок имеют достаточно плотный слой субстрата, что препятствввует благоприятной аэрации. Немало сказывается и быстрая потеря влажности на развитии грибной инфекии.

ВКР УлГУ

2.3 Анализ флуорисценции хлорофилла в тестовых растениях

Одним из способов оценки состояния растений является метод оценки состояния их фотосинтетического аппарата, основанный на анализе флуоресценции хлорофилла. Данный метод позволяет быстро, с помощью

специального прибора – флуориметра, определить, насколько эффективно растение проводит фотосинтез, и выявить возможные стрессовые воздействия. Анализ позволяет ещё до появления внешних признаков определить, как различные виды внешних воздействий, такие как засуха, засоление, загрязнение почвы и т.д., сказываются на состоянии растений.

Флуоресценция хлорофилла отражает эффективность фотосистемы II (PSII). При проявлении каких-то нарушений в фотосинтезе в результате неблагоприятных внешних факторов уровень флуоресценции меняется.

Выделяют несколько типов флуориметров, наиболее популярные из них – каутские и импульсные амплитудно-модулированные флуориметры.

Каутские флуорометры - растительные клетки быстро (за несколько минут) приспосабливаются к отсутствию света. В этот период все возбужденные электроны покидают систему электронного транспорта, и акцепторные молекулы освобождаются. После этого клетки подвергают воздействию коротких, но мощных вспышек света, который используется в фотосинтезе. Специальный прибор – чувствительный фотометр – регистрирует изменение интенсивности флуоресценции, наблюдая за ее ростом и последующим спадом [54].

ВКР УлГУ

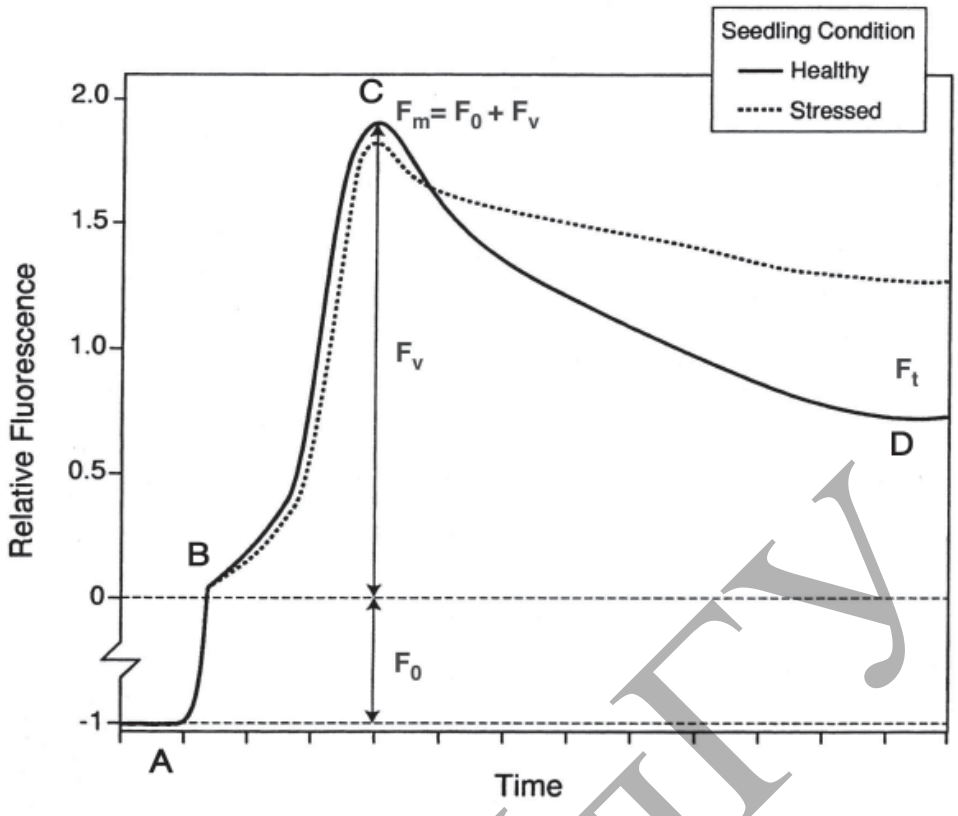


Рисунок 4 – Типичная кривая эмиссии хлорофилла для листа, снятая при помощи флуориметра Каутский. A – активация светового импульса; B – выброс хлорофилла, когда все реакционные центры открыты; C – пик излучения; D – выброс, приближающийся к устойчивому состоянию. Fo – это флуоресценция, исходящая от светособирающего комплекса. Fm – максимальная флуоресценция. Fv, переменная флуоресценция = Fm – Fo. Ft – стабильная флуоресценция.

На графике, известном как "кривая Каутского" (см. рис. 4), сначала наблюдается повышение флуоресценции до уровня Fo. Эта точка соответствует состоянию, когда все фотосинтетические реакционные центры открыты, а фактор тушения флуоресценции qP достигает своего максимума. Затем следует быстрый скачок до максимального уровня флуоресценции, обозначаемого как Fm. Разница между Fm и Fo (Fm - Fo) называется переменной флуоресценцией (Fv). Максимальная флуоресценция (Fm) не является статичной. После достижения пика она заметно снижается, а затем постепенно стабилизируется

ВКР УдГУ

на уровне Ft. Важно отметить: если растение испытывает сильный стресс, пик флуоресценции может оставаться высоким в течение продолжительного времени. Это указывает на то, что здоровые клетки не могут эффективно поглощать световую энергию, которая могла бы быть использована поврежденными или погибшими клетками [54].

Соотношение Fv/Fm служит прямым показателем "Оптимальной квантовой эффективности" фотосинтеза растения. Это ключевой параметр, отражающий, насколько эффективно растение преобразует световую энергию в ходе световой фазы фотосинтеза. Теоретически, максимальное значение этого показателя составляет около 0,83 [54].

Флуориметры, использующие метод амплитудно-импульсной модуляции (PAM), применяют специфическую последовательность световых импульсов для анализа фотосинтетической активности. Сначала подается короткий световой импульс, а затем следует серия очень мощных (до 6000 мкмоль/м²/с) и быстрых импульсов насыщающего света. Эти интенсивные импульсы перегружают систему акцепторов электронов, что приводит к подавлению фотохимического тушения (qP) – процесса, при котором энергия света используется для химических реакций. Разница в интенсивности флуоресценции, наблюдаемая между пиком и последующей кривой затухания, отражает величину нефотохимического тушения (qN). Этот метод, известный как анализ тушения, позволяет разделить и количественно оценить три основных компонента тушения флуоресценции, что делает его ценным инструментом для выявления и оценки стрессовых состояний у растений. Идеальным для растения является фотохимическое тушение (далее qP), которое означает эффективное преобразование световой энергии в химическую. Нефотохимическое тушение (далее qN), напротив, можно рассматривать как своего рода "аварийный клапан" для рассеивания избыточной энергии, который не приносит растению прямой пользы. Хотя растения в стрессовых условиях используют оба механизма для управления энергией, qP обычно остается на

ВКР УлГУ

относительно стабильном уровне, в то время как qN имеет тенденцию к значительному увеличению, сигнализируя о перегрузке фотосинтетического аппарата [52].

Энергетическое тушение представляет собой совокупность механизмов, позволяющих листу растения справляться с избытком поглощенной энергии. Выделяют три конкурирующих процесса:

- Фотохимическое тушение (qP): Преобразование световой энергии в химическую для поддержания фотосинтеза.
- Нефотохимическое тушение (qN): Рассеивание большей части избыточной энергии в форме тепла.
- Тушение флуоресценции (qF): Высвобождение небольшой, но важной доли энергии через флуоресценцию молекул хлорофилла.

Показатнли максимальной флуоресценции в темноте:

Таблица 8 – Показатели максимальной флуоресценции в темноте на инертном субстрате

Вариант	A0B0	A1B0	A2B0
F0	80,0 ± 41,38 33,17…126,84	109,33 ± 54,93 47,18…171,49	99 ,00 ± 28,58 66,66…131,34
Fm	301,33 ± 157,89 122,67…480,0	428,33 ± 231,5 166,37…690,3	409,67 ± 115,68 278,76…540,57
F0`	62,67 ± 34,99 23,07…102,26	91,0 ± 48,38 36,25…145,75	81,0 ± 24,02 53,82…108,18
Fm`	148,33 ±88,64 48,03…248,63	244,67 ± 153, 34 71,15…418,18	215,67 ± 67,6 139,17…292,17
Fv/Fm	0,73 ± 0,01 0,72…0,75	0,74 ± 0,02 0,72…0,76	0,76 ± 0,004 0,75…0,76
A – наличие раствора и гриба: A2 – с грибом и сраствором; B – тип почвы: B0 – инертный субстрат, Fo – это флуоресценция, исходящая от			

ВКР УлГУ

светособирающего комплекса. Fm – максимальная флуоресценция. Fv, переменная флуоресценция = Fm – Fo.

Таблица 9 – Показатели максимальной флуоресценции в темноте на суглинистом субстрате

Вариант	A0B1	A1B1	A2B1
F0	101,67 ± 29,14 68,69…134,64	147,67 ± 10,41 135,89…159,44	107,0 ± 21,28 82,92…131,08
Fm	384,67 ± 97,67 274,14…495,19	544,33 ± 51,79 485,73…602,94	391,67 ± 47,43 338,0…445,33
F0`	75,0 ± 13,45 59,78…90,22	121,33 ± 7,02 113,39…129,28	80,67 ± 18,18 60,10…101,23
Fm`	171,33 ± 27,30 140,44…202,23	390,33 ± 185,53 180,39…600,28	178,0 ± 39,15 133,69…222,31
Fv/Fm	0,74 ± 0,01 0,72…0,75	0,73 ± 0,03 0,70…0,76	0,73 ± 0,02 0,70…0,76
A – наличие раствора и гриба: A2 – с грибом и сраствором; B – тип почвы: B1 – суглинистая почва, Fo – это флуоресценция, исходящая от светособирающего комплекса. Fm – максимальная флуоресценция. Fv, переменная флуоресценция = Fm – Fo.			

Таблица 10 – Показатели максимальной флуоресценции в темноте на дерново - подзолистом субстрате

Вариант	A0B2	A1B2	A2B2
F0	122,0 ± 22,72 96,30…147,70	77,33 ± 53,41 16,90…137,77	120,67 ± 51,79 62,06…179,27
Fm	512,0 ± 81,28 420,02…603,98	319,33 ± 246,19 40,75…597,92	512,33 ± 214,26 269,88…754,79
F0`	91,0 ± 17,06	61,33 ± 43,82	98,0 ± 44,14

ВКР УлГУ

	71,70…110,30	11,75…110,92	48,06…147,94
Fm`	210,67 ± 39,02 166,52…254,82	154,0 ± 118,51 19,90…288,10	258,67 ± 122,17 120,43…396,91
Fv/Fm	0,76 ± 0,01 0,75…0,78	0,74 ± 0,04 0,69…0,79	0,77 ± 0,003 0,76…0,77
A – наличие раствора и гриба: A2 – с грибом и сраствором; B – тип почвы: B2 – дерново-подзолистая почва, Fo – это флуоресценция, исходящая от светособирающего комплекса. Fm – максимальная флуоресценция. Fv, переменная флуоресценция = Fm – Fo.			

Таблица 11 – Показатели максимальной флуоресценции в темноте на окультуренном субстрате

Вариант	A0B3	A1B3	A2B3
F0	96,67 ± 20,55 73,41…119,92	105,0 ± 49,24 49,28…160,72	164,67 ± 43,94 114,95…214,38
Fm	383,0 ± 88,10 283,31…482,69	374,0 ± 178,63 171,87…576,13	620,0 ± 139,69 461,93…778,07
F0`	75,0 ± 15,10 57,91…92,09	84,0 ± 37,04 42,09…125,91	129,0 ± 33,45 91,15…166,85
Fm`	179,67 ± 37,85 136,84…222,49	191,0 ± 83,0 97,08…284,92	306,0 ± 73,08 223,30…388,70
Fv/Fm	0,75 ± 0,01 0,73…0,76	0,72 ± 0,04 0,68…0,76	0,74 ± 0,02 0,71…0,76
A – наличие раствора и гриба: A2 – с грибом и сраствором; B – тип почвы: B3 – окультуренная почва, Fo – это флуоресценция, исходящая от светособирающего комплекса. Fm – максимальная флуоресценция. Fv, переменная флуоресценция = Fm – Fo.			

ВКР УлГУ

Исходя из выше представленных результатов можно сделать вывод, что все показатели Fv/Fm (оптимальный квантовый выход) входят в диапазон «нормальных» значений, который составляет 0,70-0,83. Это свидетельствует о том, что растения не находились в стрессовом состоянии, их первичные реакции фотосинтеза эффективно утилизировали энергию света, а также фотосистема II работала в оптимальных условиях.

Показатели флуоресценции в свету:

Во всех образцах при анализе показателей F0/F0` наблюдалась единая тенденция к снижению F0`, что свидетельствует об отсутствии стрессовых условий для растений. Аналогично, при анализе Fm/Fm` отмечено уменьшение Fm` во всех контейнерах. Это указывает на активацию нефотохимического тушения – естественной защитной реакции растений на интенсивное световое излучение, предотвращающей повреждение фотосинтетического аппарата избыточной энергией. Все рисунки представлены в приложении В.

Снижение показателя Y (II) так же было выявлено во всех исследуемых образцах, как видно на рисунках № В.9 – В.12, представленных в приложении В. Это указывает на угнетение фотохимических реакций, и свидетельствует о том, что растения испытывали солевой стресс, который негативно повлиял на работу фотосистемы II.

При анализе ETR (скорость транспорта веществ) наблюдается линейный рост показателей во всех образцах, что означает высокую интенсивность фотосинтеза. Рисунки № В.13 – В.16 продемонстрированы в приложении В.

Исследование показателя NPQ, представленых на рисунках № В.17 – В.20 в приложении В, выявило его увеличение во всех контейнерах, что говорит о включении защитных механизмов. Высокие значения NPQ в условиях высокой интенсивности солнечного излучения (PAR) являются благоприятным признаком, поскольку они указывают на то, что растение эффективно использует термальное рассеивание для защиты от переоблучения.

ВКР УлГУ

Показатель qP отражает долю открытых реакционных центров фотосистемы II. Сравнение результатов (рисунки № В.21 – В.24 в приложении В) показывает, что в вариантах А0В0 и А2В2 наблюдается сохранение умеренного показателя qP при высоком PAR, свидетельствующем об активной работе фотосистемы II. Это указывает на эффективный перенос электронов и использование энергии. В отличие от этого, в других вариантах наблюдалось снижение qP, что говорит о закрытии реакционных центров фотосистемы II и, как следствие, о накоплении НАДФН.

ВКР УДГУ

Заключение

1. В ходе анализа литературных источников, касающихся симбиотических связей между эндотрофными микромицетами и высшими растениями, а также их воздействия на устойчивость растений, можно сформулировать следующий вывод: микробиологические методы, основанные на использовании микромицетов, представляют перспективное направление в

биоремедиации нефтяных и солевых загрязнений почв. Эти микроорганизмы обеспечивают эффективную деградацию углеводородов, улучшение физико-химических свойств почвы, а также стимулируют рост и повышают стрессоустойчивость растений за счет синтеза фитогормонов, осмопротекторов и биосурфактантов. Такой биотехнологический подход способствует восстановлению плодородия, снижению токсичности и обеспечению экологической безопасности загрязненных территорий.

2. В ходе проведения лабораторного эксперимента по оценке влияние солевого раствора для заполнения скважин нефтедобывающей отрасли на биологические показатели тестовых растений, установлено, что достоверных изменений не наблюдалось. В некоторых вариантах произошло уменьшение биомассы надземной части. Также визуально часть растений имели более тонкие стебли и тусклый цвет. В одном из вариантов было выявлено, что внесение солевого раствора, привело к изменению кислотности. На содержание хлорофиллов *a, b*, каратиноидов и аскорбиновой кислоты солевой раствор не повлиял. По содержанию МДА достоверные изменения наблюдались в одном образце A2B0.

3. Инокуляция грибом *Neonectria macrodidyma* не повлияла на устойчивость растений к засолению почв экспериментальным солевым раствором. Данный вывод можно обосновать отсутсвием солевого стресса для растений.

4. В условиях лабораторных экспериментов было выявлено, что солевой раствор не оказал значительного негативного воздействия на биологические показатели почвы и растений. Такой результат указывает на возможную экологическую безопасность использования солевых растворов в определенных условиях, однако для более надежных выводов необходимо учитывать масштаб и реальные условия эксплуатации.

ВКР УдГУ

ВКР УДГУ

Список литературы

1. Аббасова З. И., Алиахвердиев С. Р., Зейналов Э. М., Гучейнова Н. Б. Коиформационные изменения митохондрий при солевом стрессе//Ш съезд Всерос. общества физиологов растений. - Санкт-Петербург, 1993. - 464 с. – Текст: непосредственный.

2. Ахлгребави Р., Алрайхан А.В., Макаров С.С., Кузьмин В.Н. / Усовершенствование технологии изоляции зон поглощения бурового раствора профильным перекрывателем // Сборник тезисов XII Международной научно-

практической конференции, 15 апреля 2022 г. – Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2022. С. 138-143 – Текст: непосредственный.

3. Аэрированные промывочные растворы и пены – Технология бурения нефтяных и газовых скважин. Т.2. URL:https://bstudy.net/986528/tehnika/aerirovannye_promyvochnye_rastvory_peny?ysclid=mfuqt3k44a274458559 (дата обращения 04. 07.2025) – Текст: электронный.

4. Биологический этап рекультивации земель и земельных участков, загрязненных нефтью и нефтепродуктами. URL:https://e-ecolog.ru/docs/ttqSpt6z2Nu2_t0_evQF7/360?utm_referrer=https%3A%2F%2Fyandex.ru%2F (дата обращения 07.07.2025) – Текст: электронный.

5. Борьба с поглощением промывочной жидкости. URL: https://neftegaz.ru/tech-library/burovye-ustanovki-i-ikh-uzly/141548-borba-s-pogloshcheniem-promyvochnoy-zhidkosti (дата обращения 05.07.2025) – Текст: электронный.

6. Булда О.В., Рассадина В.В., Алексейчук Г.Н., Ламан Н.А. «Спектрофотометрический метод определения содержания каротиноидов, ксантофиллов и хлорофиллов в экстрактах семян растений» 2008. URL: https://www.elibrary.ru/contents.asp?id=33232183 (дата обращения 13.07.2025) – Текст: электронный.

7. Бухарина И. Л., Аль Маолаи М. С. Д., Исламова Н. А., Самигуллина Г. З. Влияние продуктов ликвидации зоны низкой интенсивности поглощения при строительстве нефтяных скважин на живые организмы. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-produktov-likvidatsii-zony-nizkoy-intensivnosti-pogloscheniya-pri-stroitelstve-neftyanyh-skvazhin-na-rasteniya-i-pochvy (дата обращения 10.07.2025) – Текст: электронный.

8. Владимиров, В. А., Дубнов, П.Ю. Аварийные и другие несанкционированные разливы нефти // Стратегия гражданской защиты :проблемы и исследования. – 2013 – Текст: непосредственный.

ВКР УлГУ

9. Влияние на растения избытка солей. URL: https://vk.com/wall-57245325_200 (дата обращения 10.07.2025) – Текст: электронный.

10. Воздействие нефтегазовых объектов на почву, растительный и животный мир. URL: https://intuit.ru/studies/courses/3475/717/lecture/21335?page=6 (дата обращения 11.07.2025) – Текст: элетронный.

11. Воздействие предприятия нефтяной отрасли на окружающую среду. URL: https://studfile.net/preview/11791429/page:3 (дата обращения 11.07.2025) – Текст: электронный

12. Высоцкая Л.Б и др. «Сравнение реакции растений различных видов на нефтяное заегрязнени». URL: https://biomicsj.ru/upload/iblock/8f0/bmcs19111086.pdf (дата обращения 13.07.2025) – Текст: электронный.

13. Гавриленко В.Ф., Жигалова Т.В. Большой практикум по фотосинтезу / В.Ф. Гавриленко, Т.В. Жигалова: под ред. И.П. Ермакова: Учеб. пособие для студ. вузов. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 256 с. Булда О. В. Спектрофотометрический метод определения содержания каротинов, ксантофиллов и хлорофиллов в экстрактах семян растений / О. В. Булда [и др.] / Физиология растений. – 2008. – Т. 55, № 4. – С.604-611 – Текст: непосредственный.

14. Гавриленко В.Ф., Жигалова Т.В. Большой практикум по фотосинтезу / В.Ф. Гавриленко, Т.В. Жигалова: под ред. И.П. Ермакова: Учеб. пособие для студ. вузов. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 256 с. Булда О. В. – Текст: непосредственный.

15. **ГОСТ 24556-89.** Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения витамина С = Products of fruits and vegetables processing. Methods for determination of vitamin C : межгосударственный стандарт : издание официальное : утвержден и введен в действие Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 27.03.89 N 743 : введен

ВКР УдГУ

впервые : дата введения 1990-01-01 / Разработан и внесен Государственным агропромышленным комитетом СССР. – Москва : ИПК Издательство стандартов, 1989. – 10 с. – Текст : непосредственный.

16. **ГОСТ 31640-2012.** Методы определения содержания сухого вещества = Feeds. Methods for determination of dry matter content : национальный стандарт Российской Федерации : издание официальное : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 26 сентября 2012 г. N 436-ст : введен впервые : дата введения 2013-07-01 / подготовлен Государственным научным учреждением "Всероссийский научно-исследовательский институт кормов им. В.Р.Вильямса" (ГНУ "ВНИИ кормов"), Государственным научным учреждением "Всероссийский научно-исследовательский институт агрохимии им.Д.Н.Прянишникова" (ГНУ "ВНИИА"). – Москва : Стандартинформ, 2013. – IV, 7, [1] с. ; 8 см. – Текст : непосредственный.

17. Губайдуллин Ф.А., Кузьмин В.Н., Аскаров Р.Ф. [и др.] / Ликвидация зон катастрофического поглощения бурового раствора с помощью современного полимерсодержащего реагента "ПРМД" // Бурение&нефть. - 2020. - № 3. - С. 44-47 – Текст: непосредственный.

18. Достанова Р. Х. Фенольный комплекс растений при засолении среды//Диссерт. на соискание ученой степени д. б. н. в форме научного доклада. - Новосибирск. -1994. -23 с. URL: https://viewer.rsl.ru/ru/rsl01000130182?page=1&rotate=0&theme=white https://studfile.net/preview/11791429/page:3 (дата обращения 06.07.2025) – Текст: электронный

19. Жильцова Ю.В., Зависимость антиоксидантно-прооксидантного равновесия в макрофитах от уровня антропогенной нагрузки / Ю.В. Жильцова // Труды БГУ 2011. – Том 6, часть 2. – С. 47-54 – Текст: непосредственный.

20. Исламова Н.А. Пределы толерантности Fusarium equiseti и Cylindrocarpon magnusianum и использование инокуляции растений при

ВКР УлГУ

создании устойчивых искусственных экосистем : специальность 1.5.15 – Экология (биологические науки) : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Исламова Надежда Александровна ; Удмуртский государственный университет. – Ижевск, 2022. – 166 с. – Текст : непосредственный.

21. Кадырова Г.Х., Хусанов Т.С., Закирьяева И.С., Ахмедова З.Р., Шонахунова Т.Э. «Взаимодействие растебний и микроорганизмов в условиях солевого стресса» - Текст: непосредственный.

22. Как правильно выбрать семена для газона? URL:https://greenturf.ru/zapiski-agronoma/kak-pravilno-vybrat-semena-dlya-gazona/ (дата обращения 20.08.2025) – Текст: электронный.

23. Клышев Л. К. Биохимические и молекулярные аспекты исследования солеустойчивости растений/ЯТроблемы солеустойчивости растений. -1989. -195 с. URL: https://bulletennauki.ru/gallery/AsadovH%20MammadovT%20MirjalalliI%20AtaevaH.pdf (дата обращения 05.07.2025) – Текст: электронный.

24. Кузьмин В.Н., Аль Маолаи М.С.Д «Ликвидация поглощений буровых промывочных жидкостей низкой интенсивности при строительстве нефтяных скважин» 209–221 с. – Текст: непосредственный.

25. Леонова Т.Г., Гончарова Э.А., Ходоренко А.В., Бабаков А.В. Солеустойчивые и солечувствительные сорта ячменя и их характеристика//Физиология растений. -2005. - №6. -С. 876-881. – Текст: непосредственный.

26. Магистерская диссертация Макаренко Павел Сергеевич «Исследование способов предотвращения катастрофических поглощений бурового раствора на месторождениях Восточной Сибири и республике Саха (Якутия)». URL: https://earchive.tpu.ru/bitstream/11683/38915/1/TPU366698.pdf – Текст: электронный.

ВКР УлГУ

27. Микробно-растительное взаимодействие при нефтяном загрязнении дерново-подзолистых почв южной тайги Предуралья. URL: https://www.dissercat.com/content/mikrobno-rastitelnoe-vzaimodeistvie-pri-neftyanom-zagryaznenii-dernovo-podzolistykh-pochv-yu (дата обращения 13.07.2025) - Текст: электронный.

28. Мятлик луговой. URL: https://agrolist.ru/product/myatlik-lugovoy-21594?ysclid=mio9b3onbv274083064 (дата обращения 20.08.2025) – Текст: электронный.

29. Мятлик луговой - описание, газоны из мятлика, плюсы и минусы, уход. URL: https://igazon.ru/article/myatlik-lugovoy (дата обращения 20.08.2025) – Текст: электронный.

30. Нургалеева И.Т., Санникова Ю.О., Мыльников А.С., Кузьмин В.Н. / Профилактика поглощений малой интенсивности [Электронный ресурс] // Вестник Западно-Казахстанского инновационно-технологического университета. - 2020. - № 1, тем. вып. Материалы XX Международной конференции молодых ученых «Прогресс науки – залог развития инновационного общества», посв. 1150-летию выдающегося мыслителя Востока аль-Фараби, 13-15 апреля 2020 года, г. Уральск. - С. 62-64 – Текст: непосредственный.

31. Овсяница луговая. URL: https://ru.wikipedia.org/wiki/Овсяница_луговая (дата обращения 20.08.2025) – Текст: электронный.

32. Овсяница луговая семена. URL: https://agrosemservis.by/semena/semena-i-travosmesi-kormovykh-kultur/zlakovye-travy/ovsyanitsa-lugovaya (дата обращения 20.08.2025) – Текст: электронный.

33. Овсяница луговая сорт «Дединовская 8» РС1. URL: https://www.apk-kolos.ru/ovsjanica-lugovaja/c1195.html (дата обращения 20.08.2025) – Текст: электронный.

ВКР УлГУ

34. Охрана окружающей среды при бурении скважин. URL: https://burenie-ural.ru/info/ohrana-okrujayuschey-sredyi-pri-burenii-skvajin.html (дата обращения 04.07.2025) – Текст: электронный.

35. Позняк С.С.__Содержание некоторых тяжелых металлов в растительности полевых и луговых агрофитоценозов в условиях техногенного загрязнения почвенного покрова, 2011 г. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/soderzhanie-nekotoryh-tyazhelyh-metallov-v-rastitelnosti-polevyh-i-lugovyh-agrofitotsenozov-v-usloviyah-tehnogennogo-zagryazneniya (дата обращения 5.07.2025) – Текст: электронный.

36. Сверкунов С.А., Вахроеев А.Г., Мартынов Н.Н. / Ликвидация осложнений при бурении скважин на нефть и газ всложных геологических условиях Восточной Сибири // Известия Сибирского отделения Секции наук о Земле РАЕН. – 2017. - №4. - С. 94-97. – Текст: непосредственный.

37. Семёнов Н.Я. исследование и изоляция поглощающих и водопроявляющих пластов: пособие для инженера-технолога по бурению скважин. Технология изоляционных работ. - Уфа: ООО "Монография". - 2014. - 528 с., с ил. – Текст: непосредственный.

38. Слащева, А. В. Источники загрязнения окружающей среды нефтепродуктами // Проблемы безопасности при чрезвычайных ситуациях. - 1997, вып. 9. - с. 54-59. – Текст: непосредственный.

39. Степень развития грибной инфекции. URL: https://vk.com/away.php?to=https%3A%2F%2Fcyberleninka.ru%2Farticle%2Fn%2Ffiziologicheskie-osnovy-adaptatsii-rasteniy-k-vozdeystviyu-solevogo-stressa&utf=1 (дата обращения 23.08.2025) – Текст: электронный.

40. Строганов Б. П., Кабанов В. В., Шевяков Н. И., Лапина Л. П. Структура и функции клеток при засолении. - М.: Наука, 1970. - 318 с. – Текст: непосредственный.

41. Строительство скважин. URL: https://studizba.com/lectures/gorno-geologicheskaya-otrasl/lekcii-po-ekologii-neftegazodobyvayuschih-

ВКР УлГУ

kompleksov/2603-stroitelstvo-skvazhin.html (дата обращения 05.07.2025) – Текст: электронный.

42. Тетельмин, В. В., Язев, В. А. Защита окружающей реды нефтегазовом комплексе : учебное пособие / В. В. Тетельмин, В. А. Язев. – Долгопрудный : Интелект, 2009 – 352 с. – Текст: непосредственный.

43. Физиологические основы адаптации растений к воздействию солевого стресса. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/fiziologicheskie-osnovy-adaptatsii-rasteniy-k-vozdeystviyu-solevogo-stressa (дата обращения 10.07.2025) – Текст: электронный.

44. Физиология растений. Кузнецов В.В. – 2008. – Т. 55, № 4. – С.604-611. – Текст: непосредственный.

45. Харитонова А.А., Н.Г. Квеско / Методы ликвидации осложнений при бурении скважин на Куюмбинском лицензионном участке // Международный научно-исследовательский журнал. - 2016. - №5-6. - С. 99-101. – Текст: непосредственный.

46. Цепенникова Д. С., Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия «Воздействие нефтегазовых объектов на почву, растительный и животный мир» – Текст: непосредственный.

47. Штарк О.Ю., Лабутова Н.М. Традиционные методы работы с арбускулярно-микоризными грибами. – СПб: ГНУ ВНИИСХМ. – 2014. – Текст: непосредственный.

48. Association of Neonectria macrodidyma with dry root rot of citrus in California. URL: https://www.ars.usda.gov/research/publications/publication/?seqNo115=320308 (дата обращения 24.08.2025) – Текст: электронный.

49. Association of Neonectria macrodidyma with Dry Root Rot of Citrus in California. URL: https://www.researchgate.net/publication/321573741_Association_of_Neonectria_ma

ВКР УлГУ

crodidyma_with_Dry_Root_Rot_of_Citrus_in_California (дата обращения 24.08.2025) – Текст: электронный.

50. Dactylonectria macrodidyma (ИЛИОМА). URL: https://gd.eppo.int/taxon/ILYOMA (дата обращения 24.08.2025) – Текст: электронный.

51. Evaluation of Different Radish (Raphanus sativus) Genotypes under Different Saline Regimes. Flowers, T.J., Hajibagheri, M.A. and Clipson, N.J.W. (1986) Halophytes. The Quarterly Review of Biology, 61, 313-337. URL: https://www.scirp.org/journal/paperinformation?paperid=65924 (дата обращения 04.07.2025) – Текст: электронный.

52. Gary A. Ritchie «Флуоресценция хлорофилла: что это такое и что означают параметры». URL: https://masters.donntu.ru/2020/fkita/prokofiev/library/trarticle10/trarticle10.htm (дата обращения 7.09.2025) – Текст: электронный.

53. Lu Z., Neumann P. Water-Stressed maize, barley and rise seedlings show species diversity in mechanisms of leaf inhibition//J. Exp. Bot. - 1998. - V. 49. - P. 1945-1952. URL: https://pse.agriculturejournals.cz/pdfs/pse/2010/06/02.pdf (дата обращения 16.07.2025) – Текст: электронный.

54. Ombard L. Van Der Merwe NA, Groenewald JZ, Crous PW (2014) Lineages in Nectraceae: re-evaluating the generic status of Ilyonectria and allied genera. Phytopathol Mediter 53: 515-532. – Текст: электронный.

55. Tewoldemedhin YT, Mazzola M. Mostert L, McLeod A (2011) Cylindrocarpon species associated with apple tree roots in South Afnica and their quantification using real-time PCR. Eur J Plant Pathol 129: 637-651. – Текст: электронный.

ВКР УлГУ

ВКР УлГУ

Приложения

ВКР УДГУ

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А.1 – Содержание фотосинтетических пигментов в тестовых растениях

Вариант	Содержание хлорофилла *a*, мг/г	Содержание хлорофилла *b*, мг/г	Содержание каротиноидов, мг/г
A0B0	0,472 ± 0,102 0,357…0,588	0,172 ± 0,040 0,127…0,218	0,809 ± 0,167 0,620…0,998
A0B1	1,365 ± 0, 698 0,575…2,155	0,512± 0,272 0,204…0,820	2,184 ± 1,031 1,018…3,351
A0B2	0,646 ± 0,124	0,234 ± 0,045	1,100 ± 0,210

	0,506…0,787	0,183…0,285	0,863…1,338
A0B3	0,585 ± 0,053 0,525…0,645	0,216 ± 0,019 0,194…0,238	0,994 ± 0,095 0,886…1,102
A1B0	0,536 ± 0,088 0,437…0,635	0,196 ± 0,031 0,160…0,232	0,914 ± 0,145 0,751…1,078
A1B1	0,827 ± 0302 0,485…1,168	0,308 ± 0,113 0,179…0,436	1,392 ± 0,493 0,834…1,949
A1B2	0,748 ± 0,148 0,581…0,915	0,266 ± 0,056 0,203…0,329	1,234 ± 0,252 0,950…1,519
A1B3	0,668 ± 0,162 0,485…0,851	0,245 ± 0,059 0,178…0,312	1,129 ± 0,271 0,822…1,436
A2B0	0,476 ± 0,127 0,332…0,620	0,193 ± 0,081 0,102…0,285	0,810 ± 0,211 0,572…1,049
A2B1	0,821 ± 0,339 0,438…1,204	0,304 ± 0,125 0,163…0,445	1,383 ± 0,548 0,763…2,003
A2B2	1,330 ± 0,289 1,003…1,657	0,502 ± 0,106 0,382…0,622	2,184 ± 0,425 1,703…2,665
A2B3	0,670 ± 0,015 0,653…0,687	0,240 ± 0,013 0,225…0,225	1,112 ± 0,060 1,044…1,180

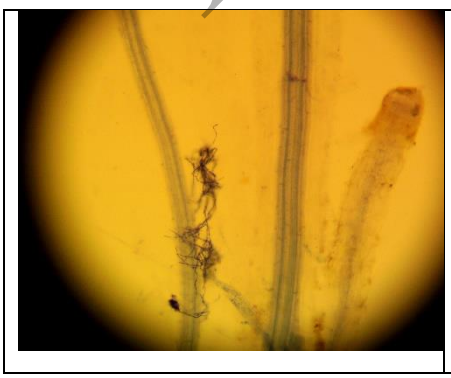
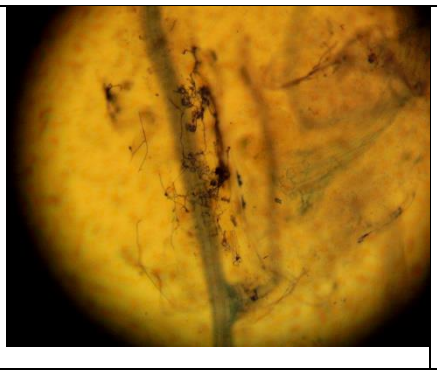
*Варианты опыта: А – наличие раствора и гриба: А0 – без гриба и без раствора, А1 – без гриба и с раствором, А2 – с грибом и сраствором; В – тип почвы: В0 – инертный субстрат, В1 – суглинистая почва, В2 – дерново-подзолистая, В3 – окультуренная почва.

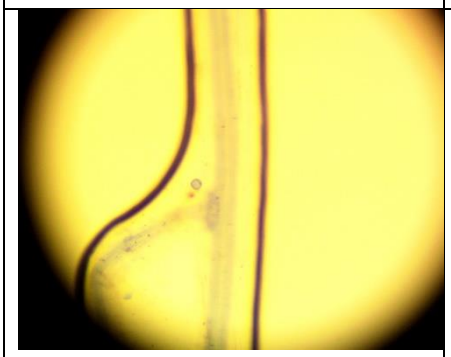
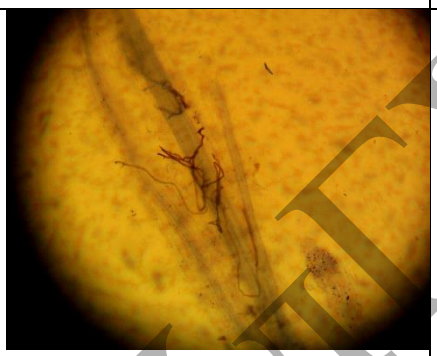
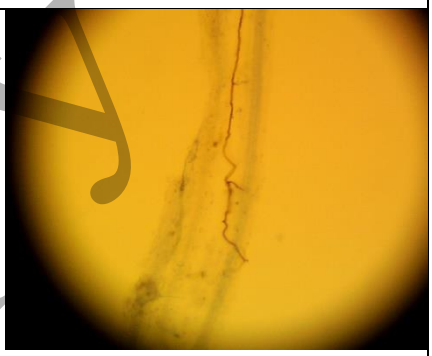
ВКР УлГУ

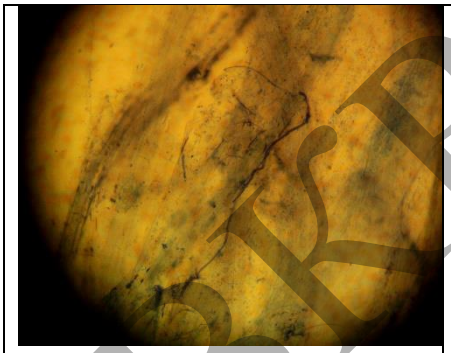
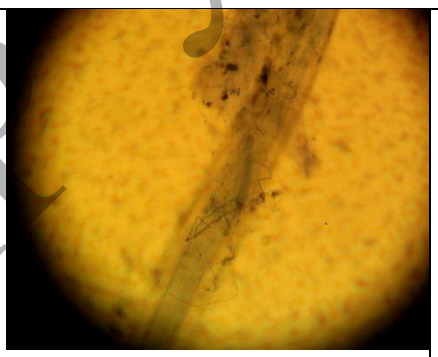
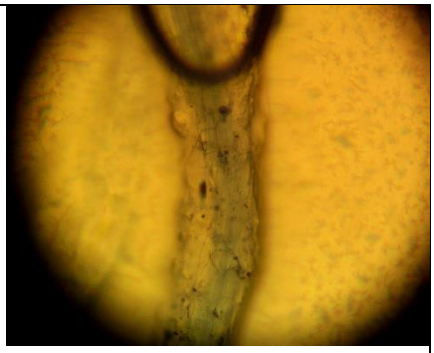
ВКР УДГУ

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Таблица Б.1 – Фотографии грибной инфекции в корнях тест-культуры, инокулированной *Neonectria macrodidyma* (увеличение ×80-100)

A2B0 (1)	A2B0 (2)	A2B0 (3)
		
A2B1 (1)	A2B1 (2)	A2B1 (3)
		
A2B2 (1)	A2B2 (2)	A2B2 (3)

		
A2B3 (1)	A2B3 (2)	A2B3 (3)

REVIEW

ПРИЛОЖЕНИЕ В

ВКР УДГУ

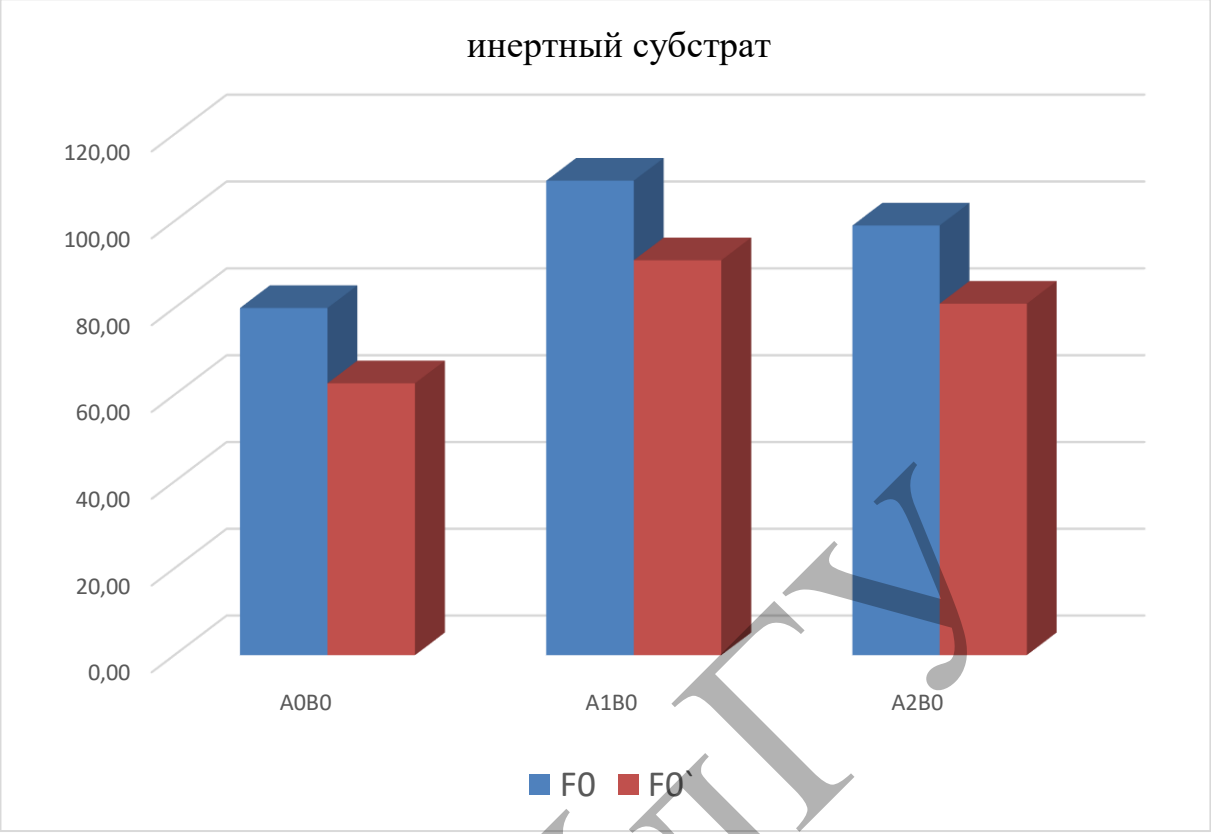


Рисунок В.1 – Флуоресценция, исходящая от светособирающего комплекса

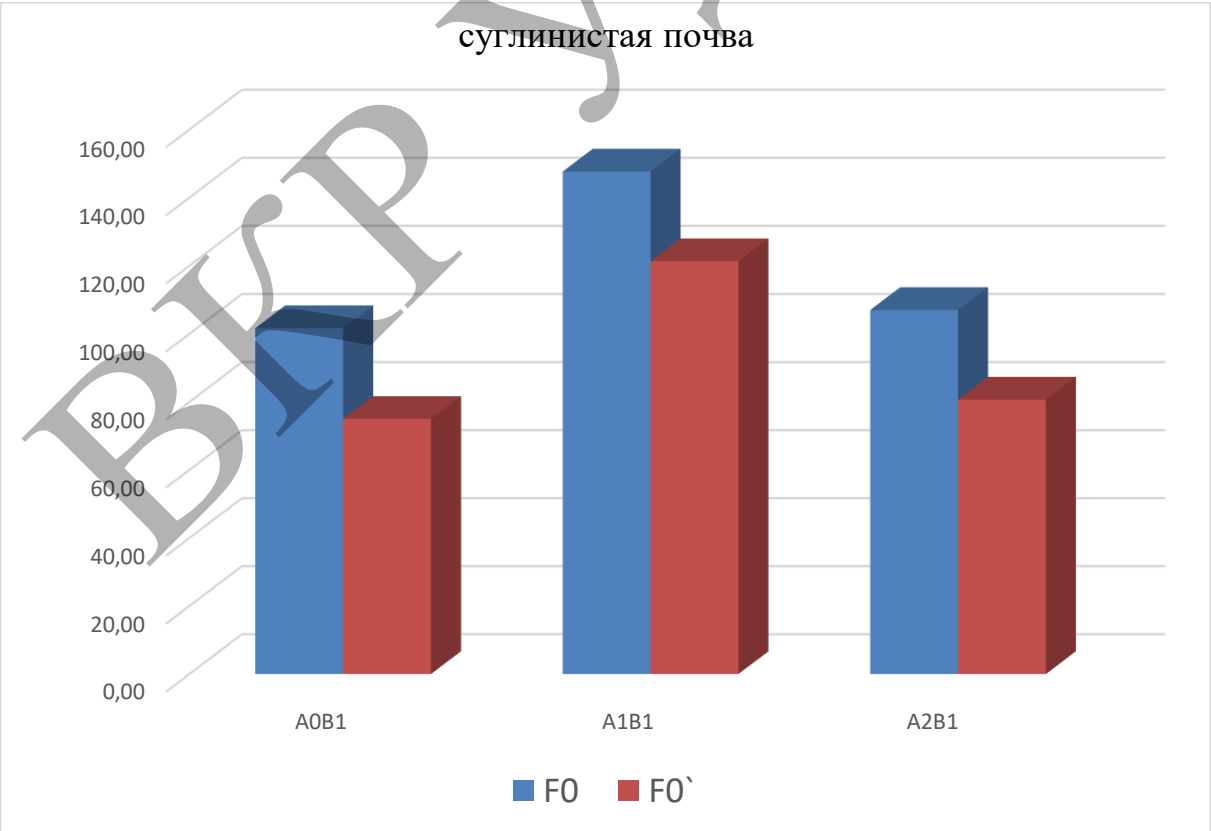


Рисунок В.2 – Флуоресценция, исходящая от светособирающего комплекса

ВКР УлГУ

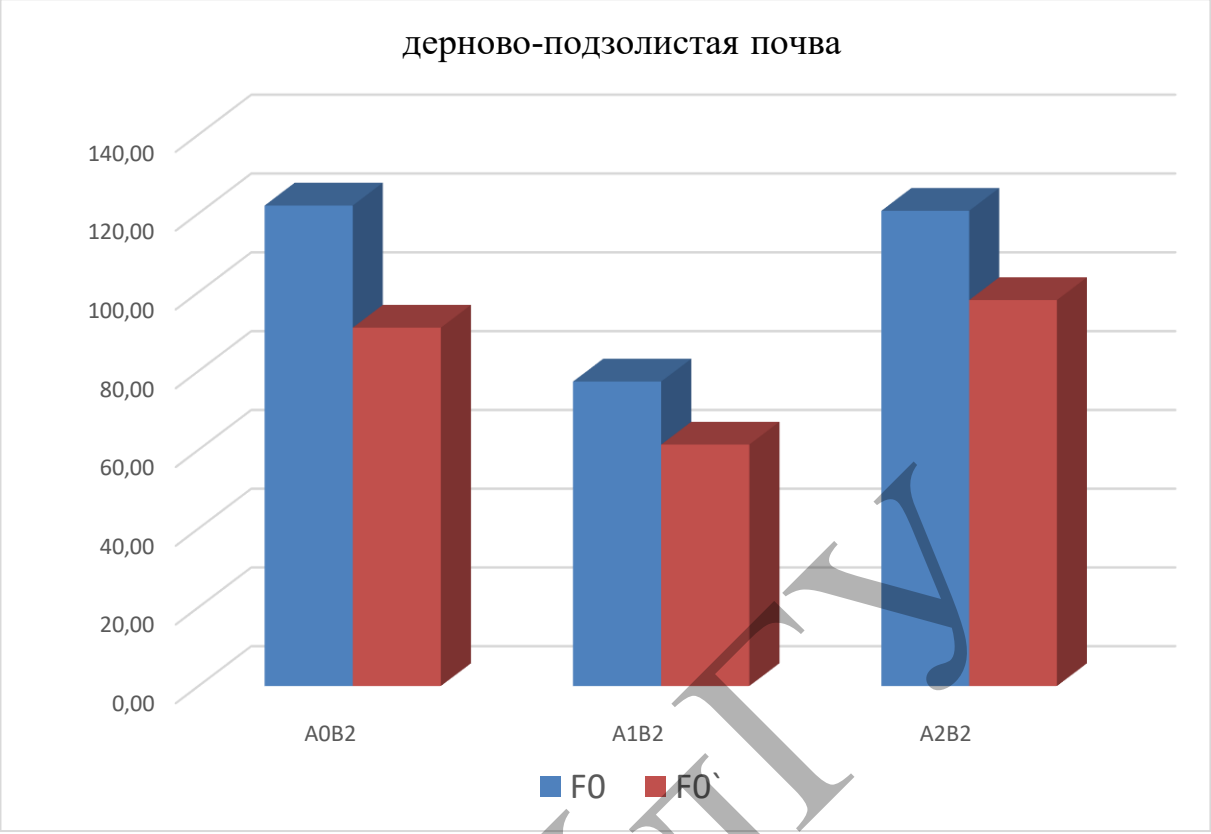


Рисунок В.3 – Флуоресценция, исходящая от светособирающего комплекса

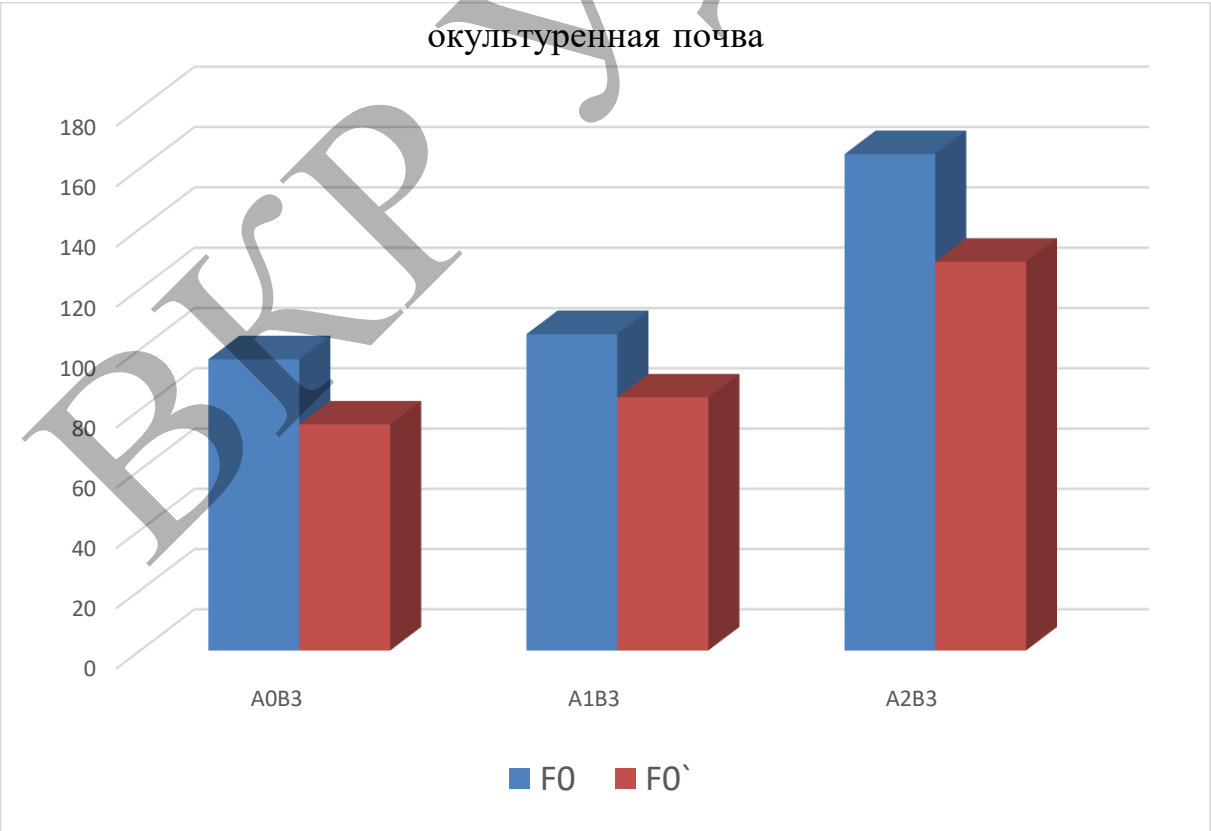


Рисунок В.4 – Флуоресценция, исходящая от светособирающего комплекса

ВКР УлГУ

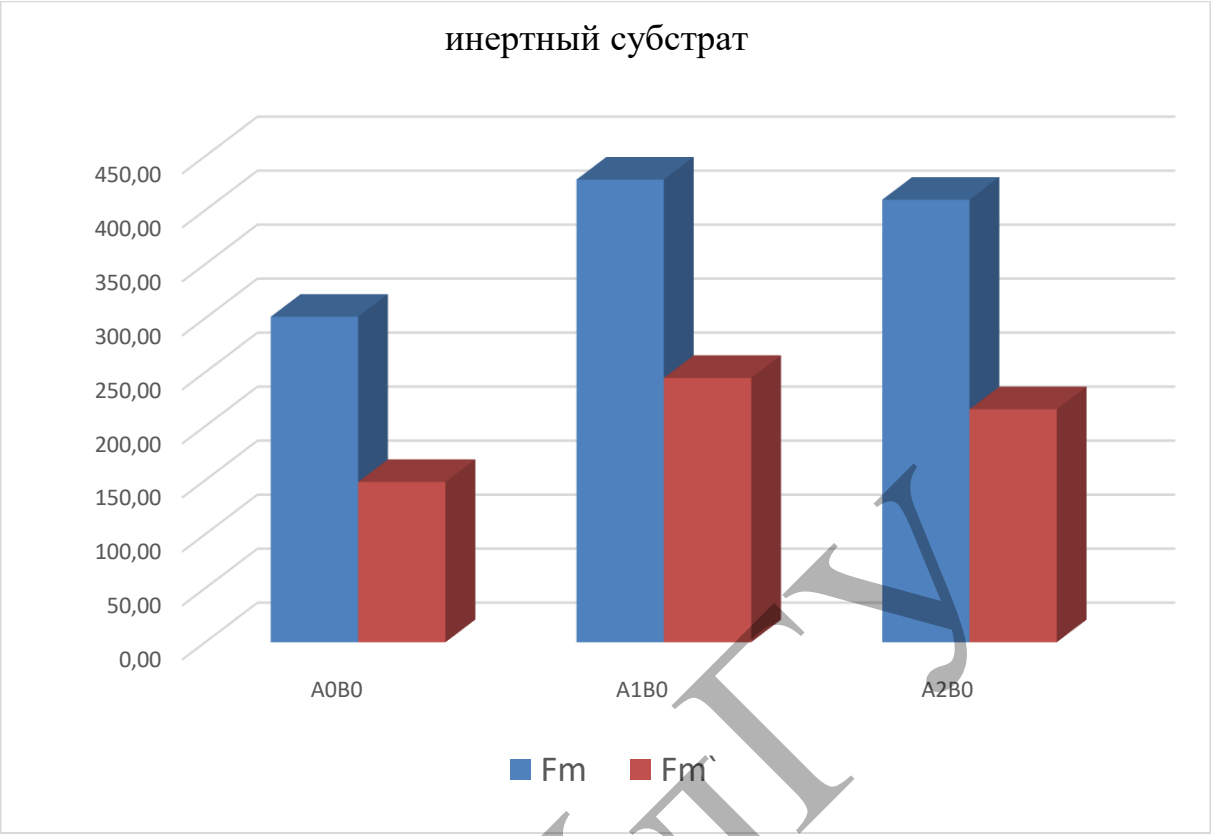


Рисунок В.5 – Оптимальный квантовый выход

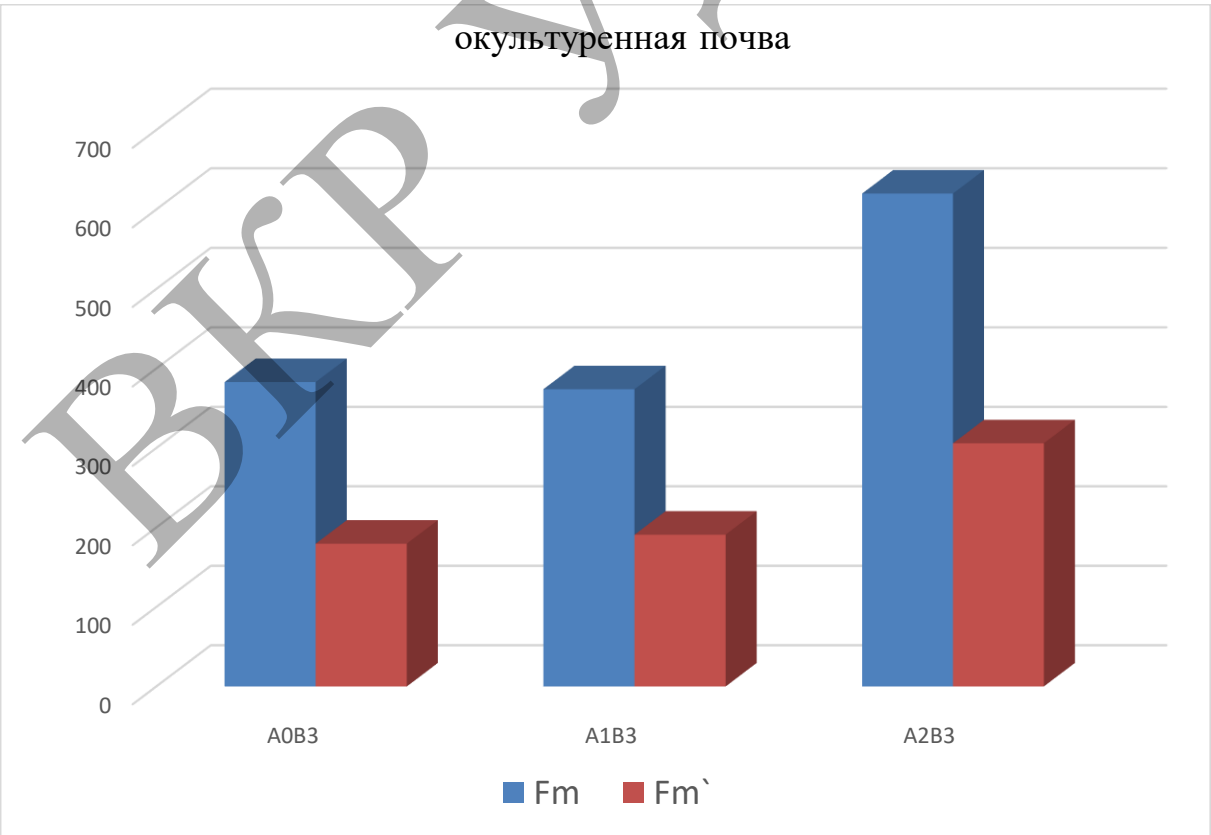


Рисунок В.6 – Оптимальный квантовый выход

ВКР УлГУ

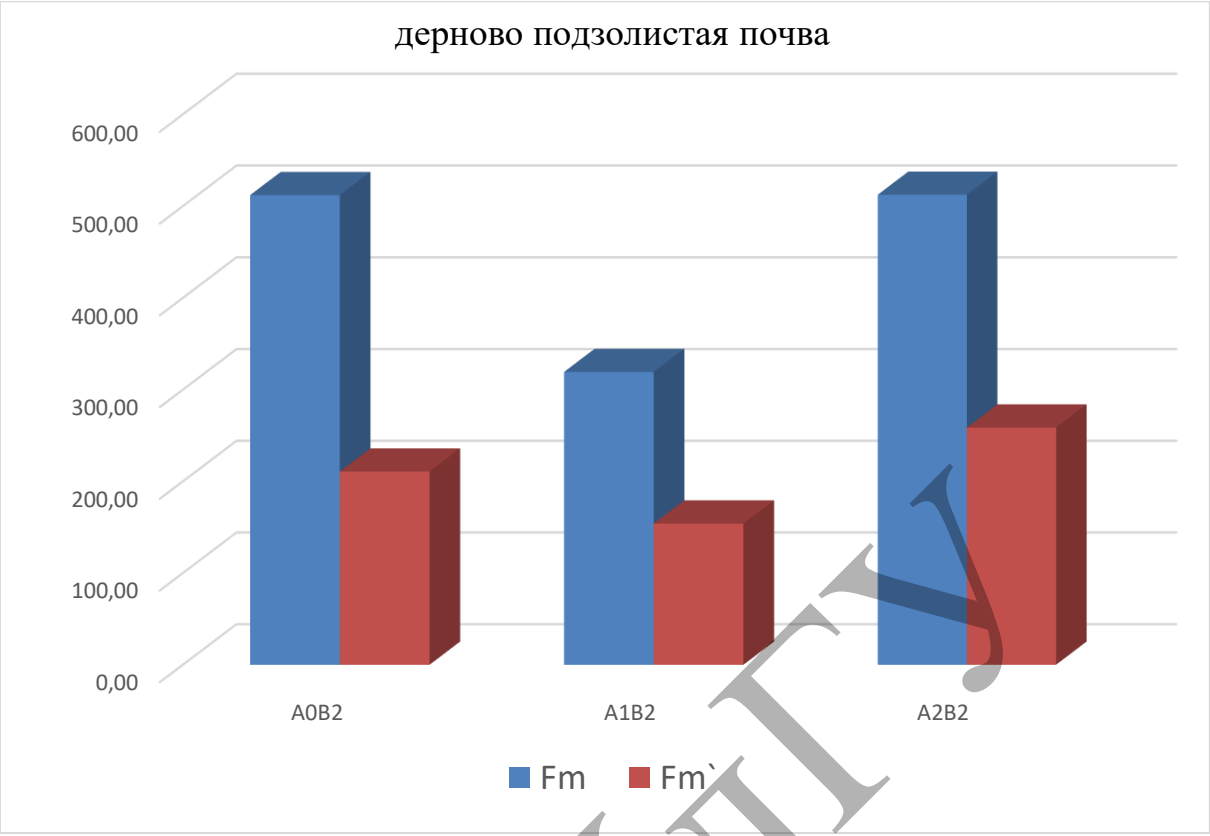


Рисунок В.7 – Оптимальный квантовый выход

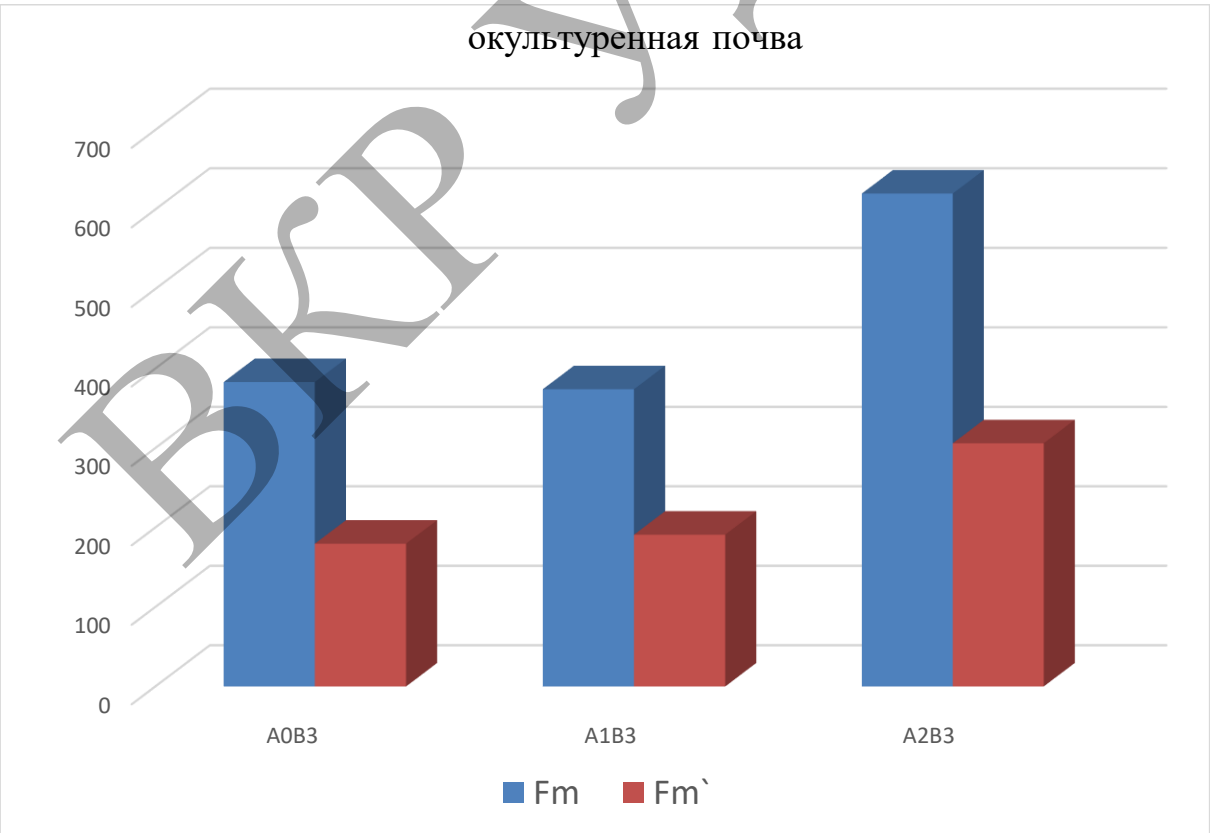


Рисунок В.8 – Оптимальный квантовый выход

ВКР УлГУ

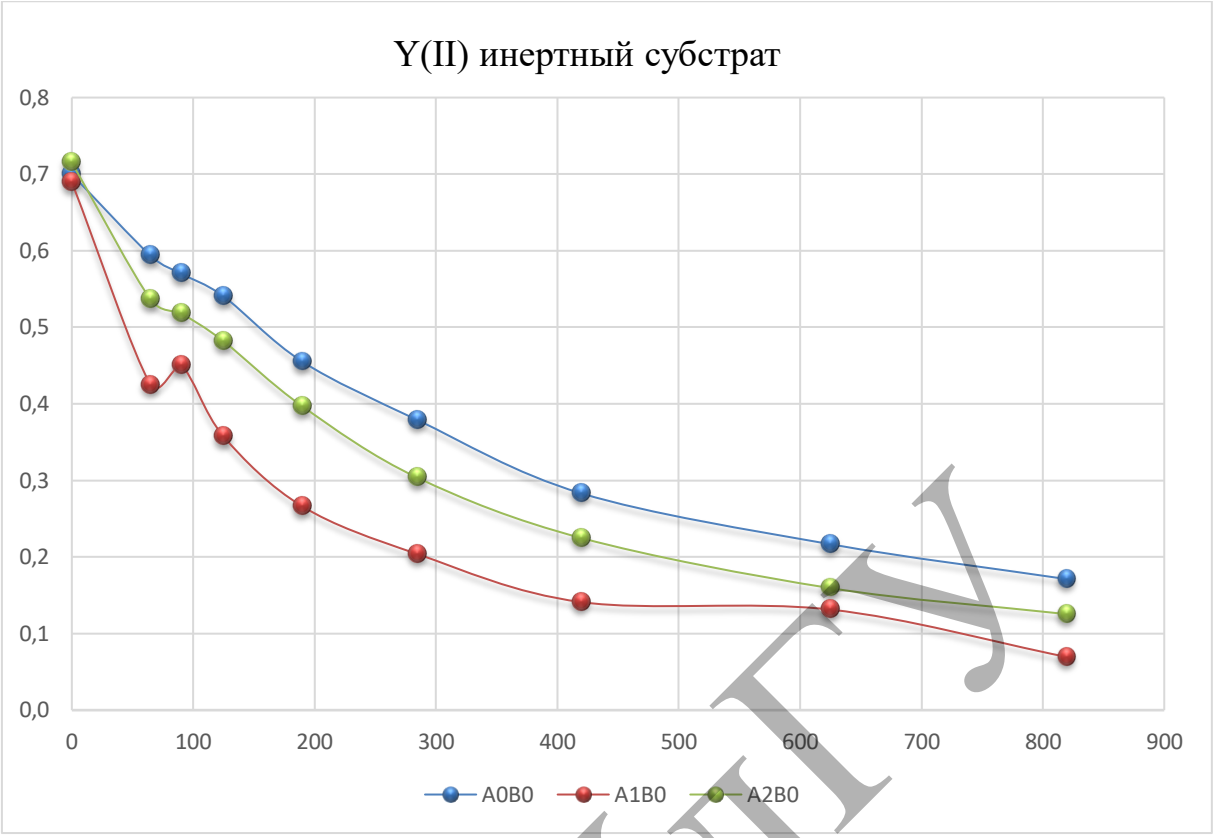


Рисунок В. 9 – Эффективность фотохимических реакций фотосистемы II

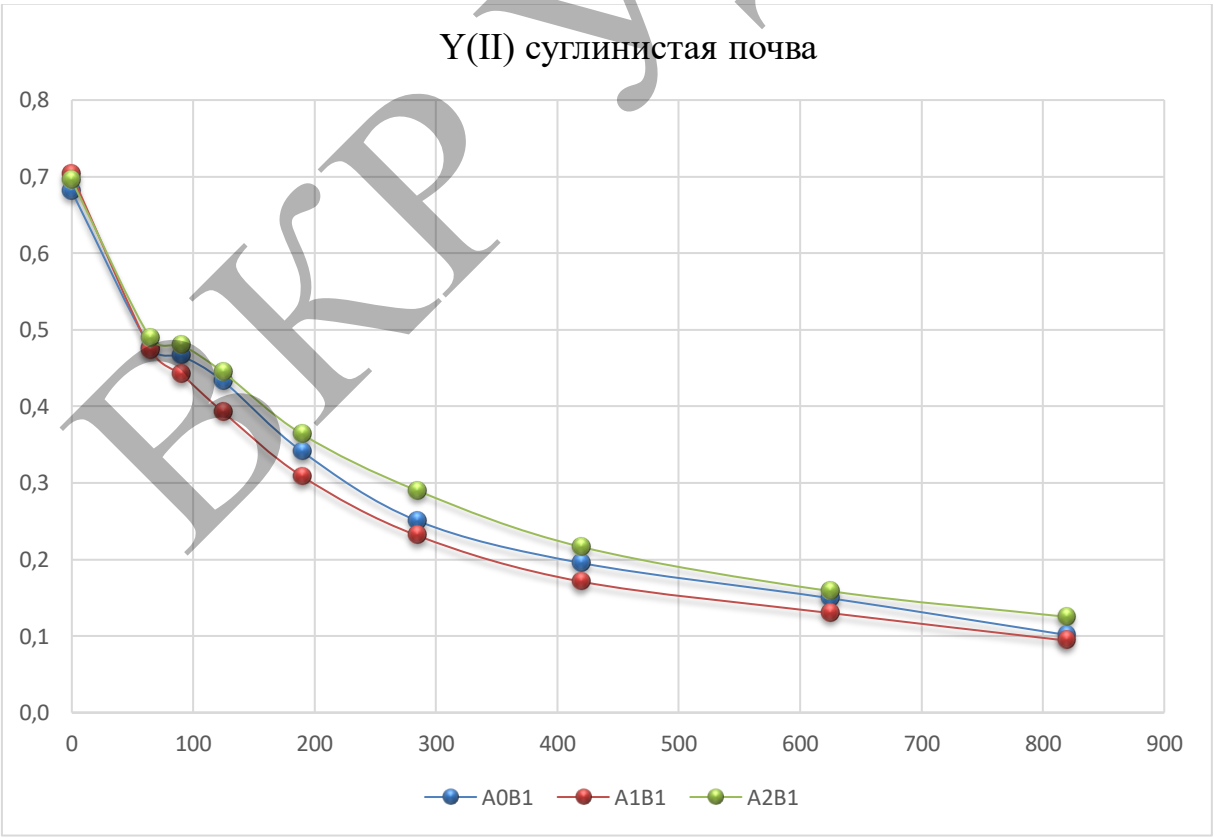


Рисунок В. 10 – Эффективность фотохимических реакций фотосистемы II

ВКР УлГУ

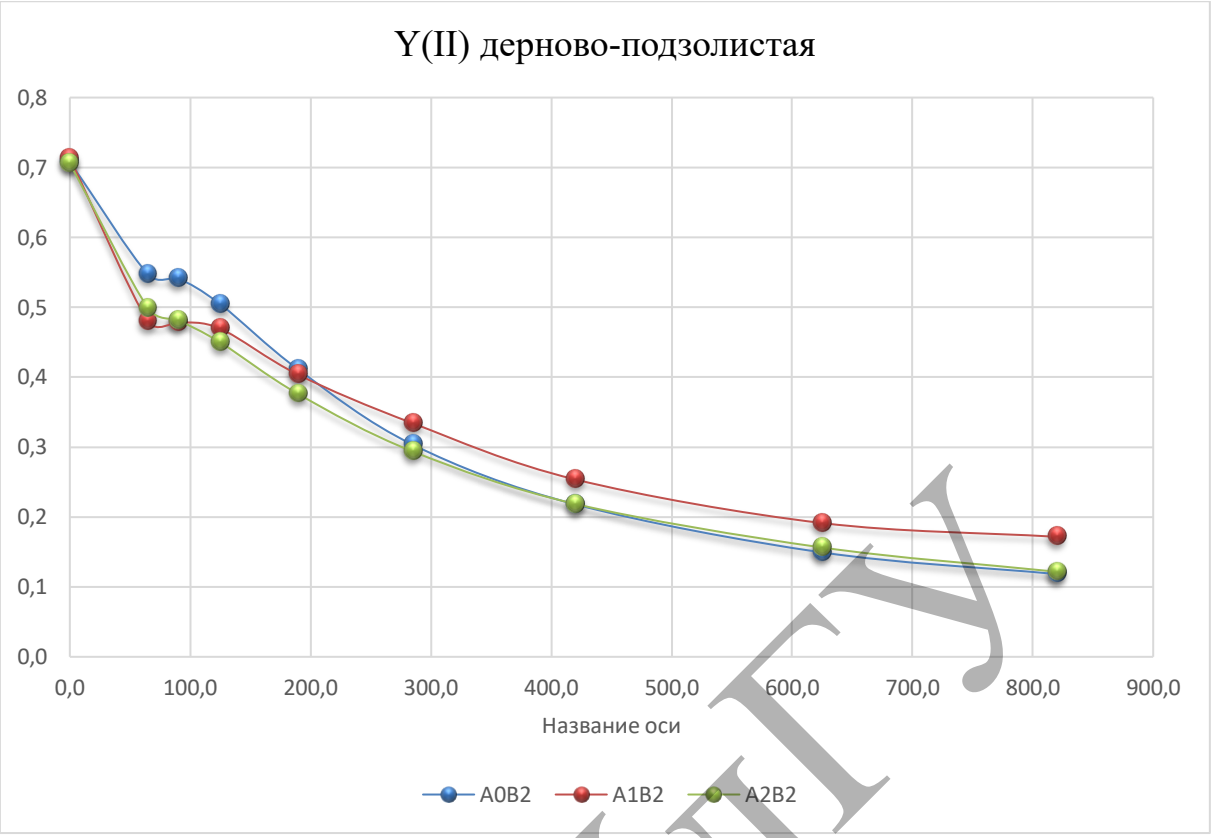


Рисунок В. 11 – Эффективность фотохимических реакций фотосистемы II

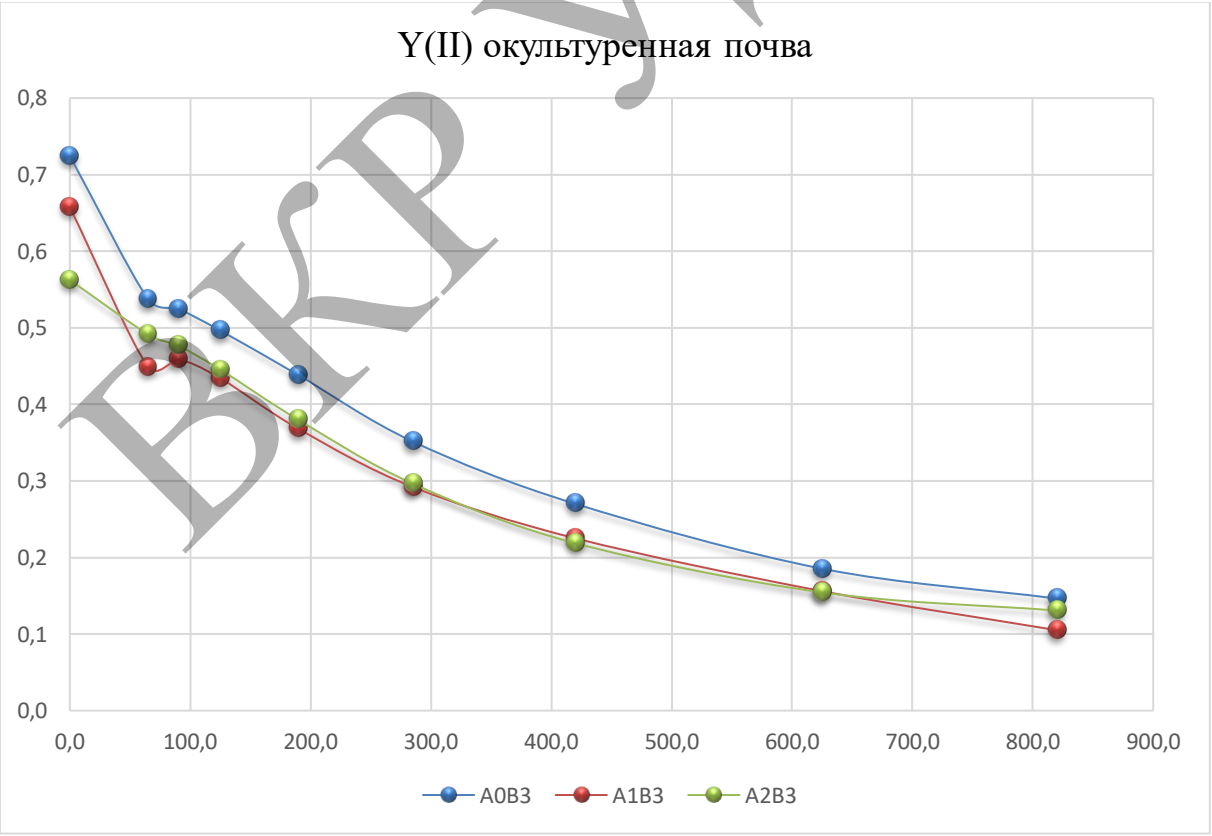


Рисунок В. 12 – Эффективность фотохимических реакций фотосистемы II

ВКР УлГУ

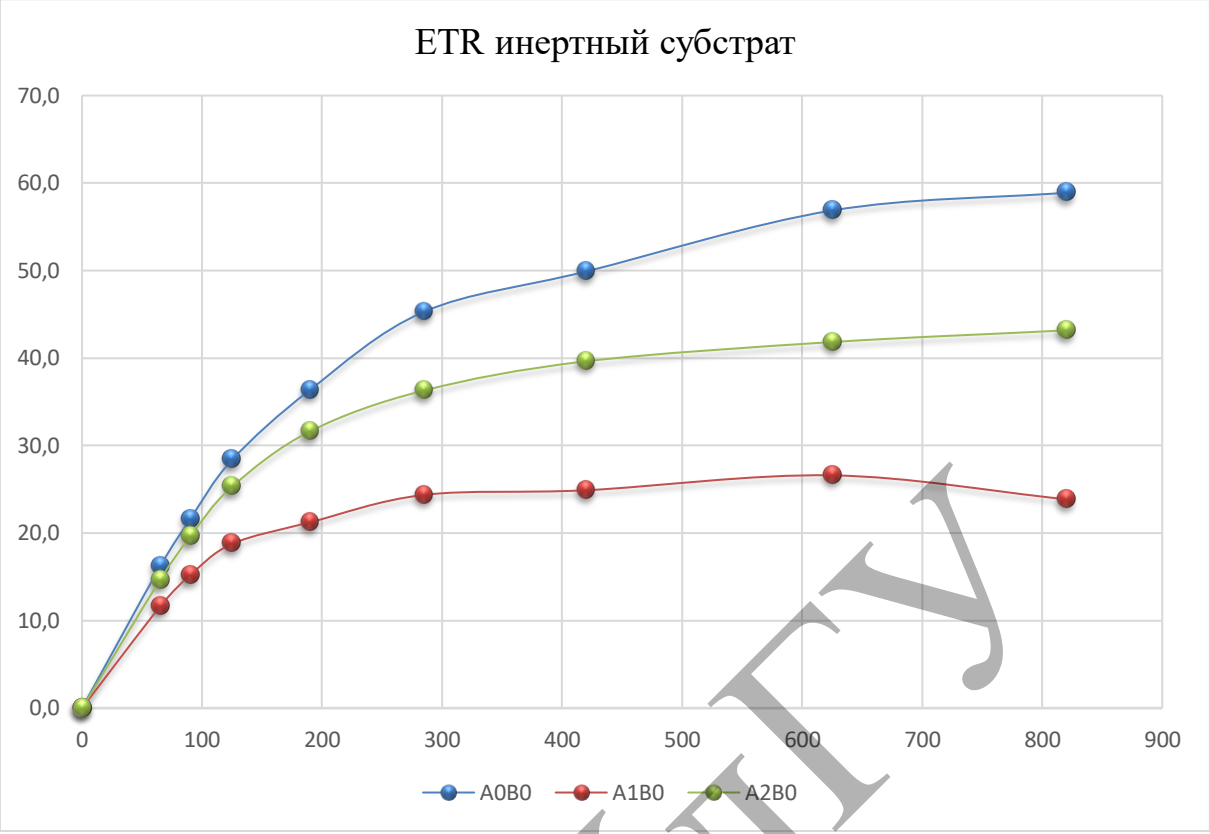


Рисунок В.13 – Скорость транспорта электронов

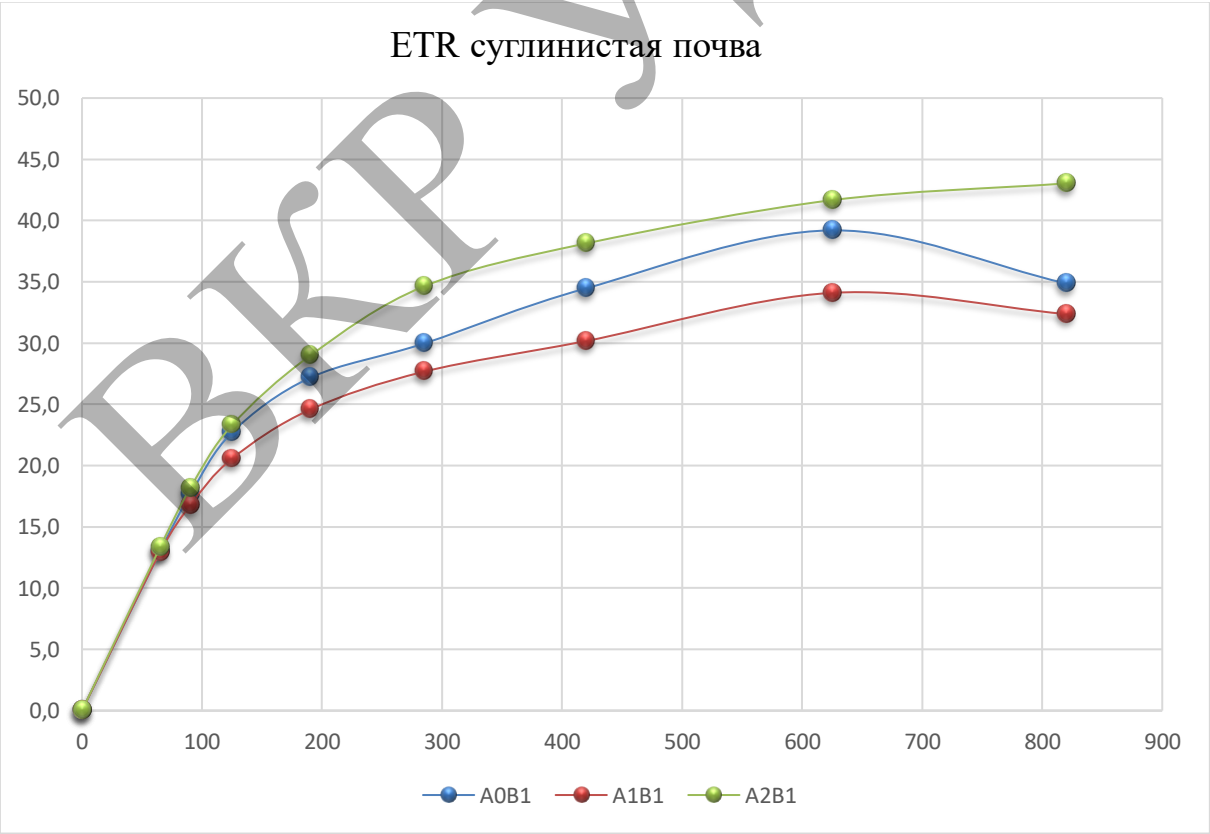


Рисунок В.14 – Скорость транспорта электронов

ВКР УлГУ

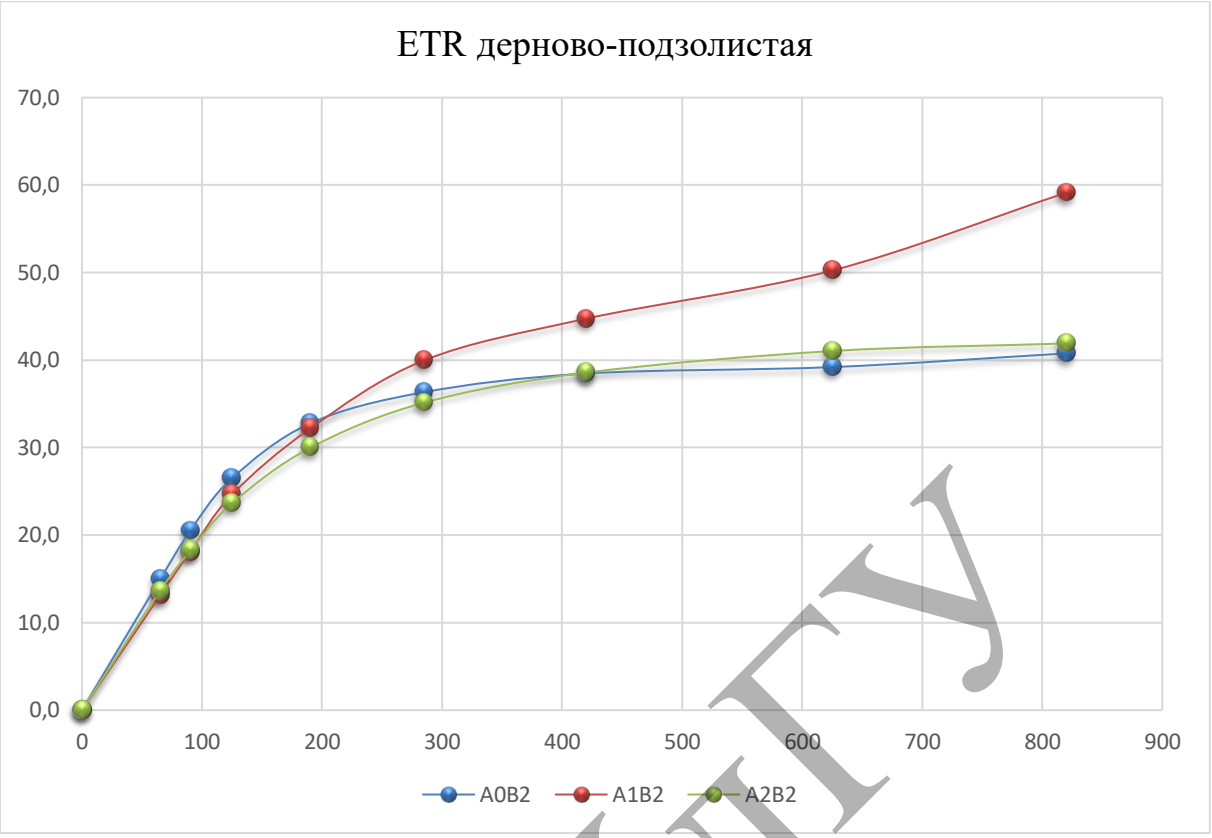


Рисунок В.15 – Скорость транспорта электронов

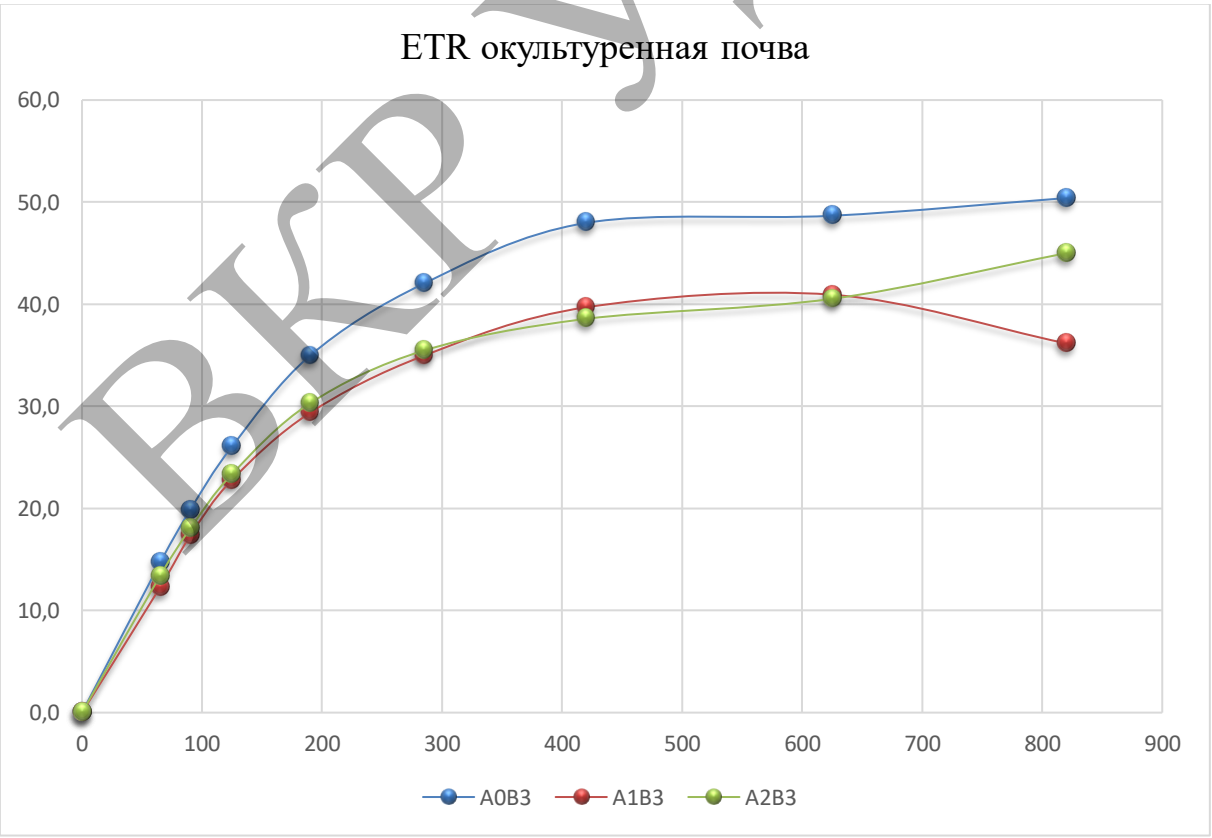


Рисунок В.16 – Скорость транспорта электронов

ВКР УлГУ

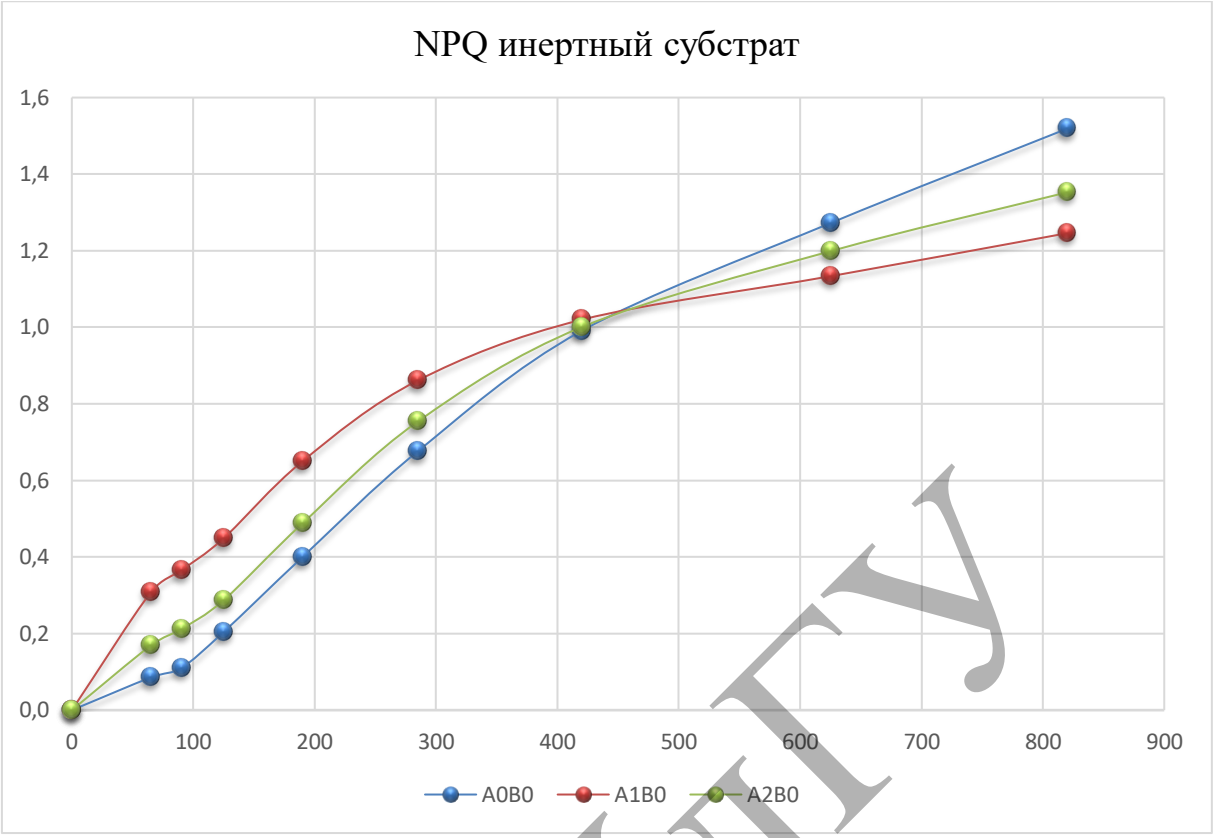


Рисунок В.17 – Нефотохимическое тушение флуоресценции

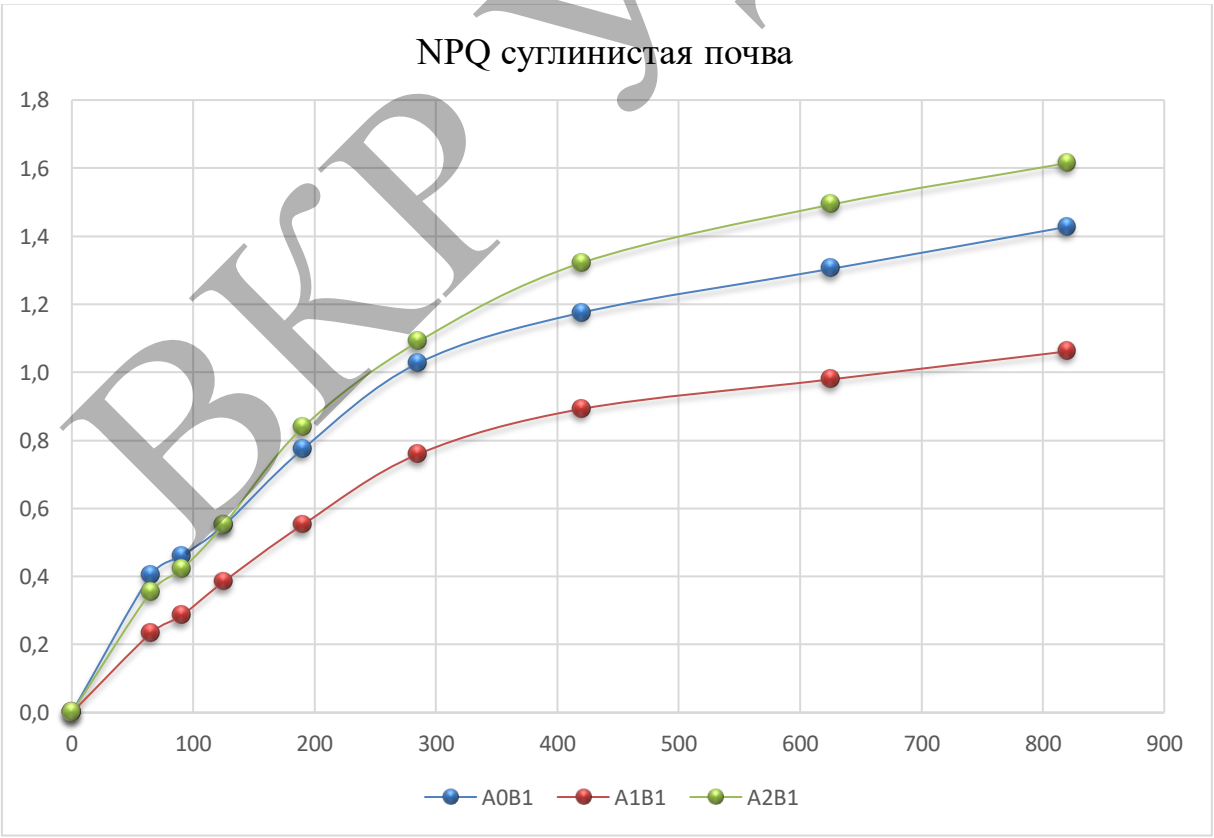


Рисунок В.18 – Нефотохимическое тушение флуоресценции

ВКР УлГУ

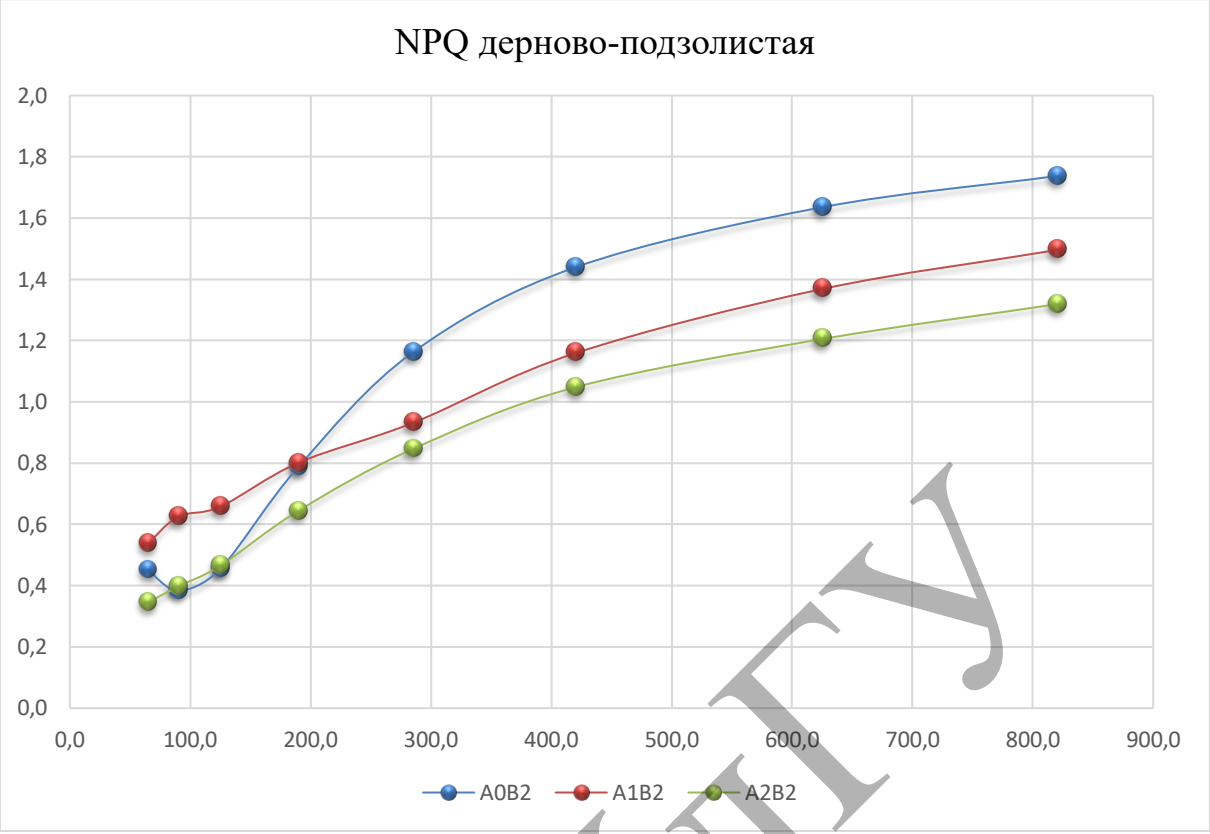


Рисунок В.19 – Нефотохимическое тушение флуоресценции

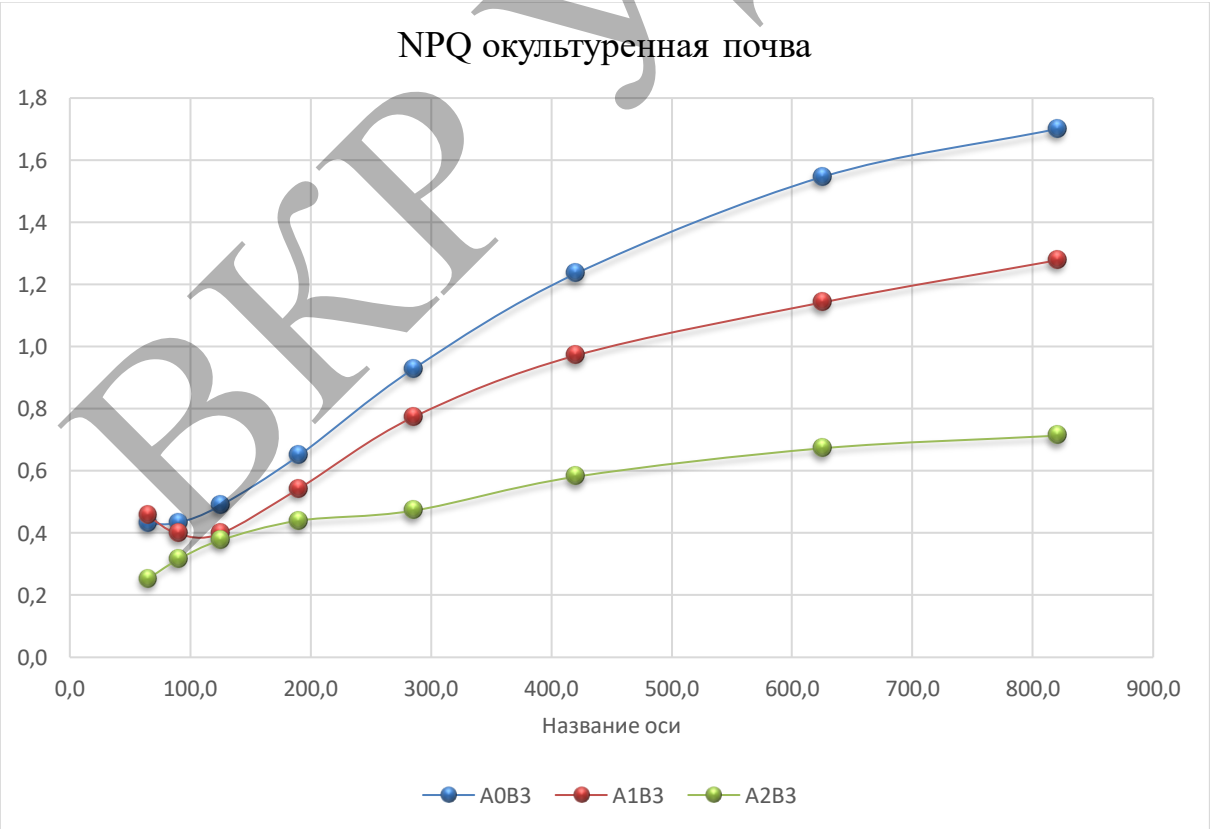


Рисунок В.20 – Нефотохимическое тушение флуоресценции

ВКР УлГУ

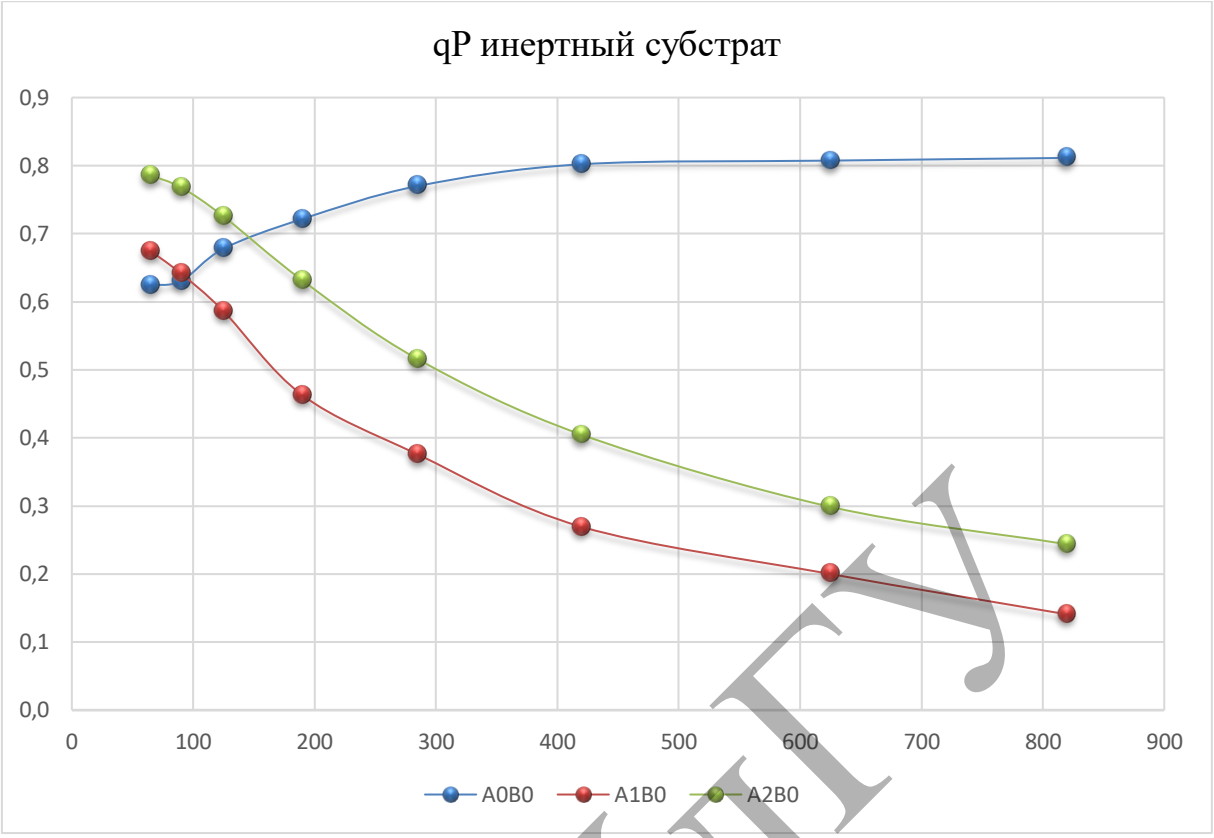


Рисунок В.21 – Фотохимическое тушение флуоресценции

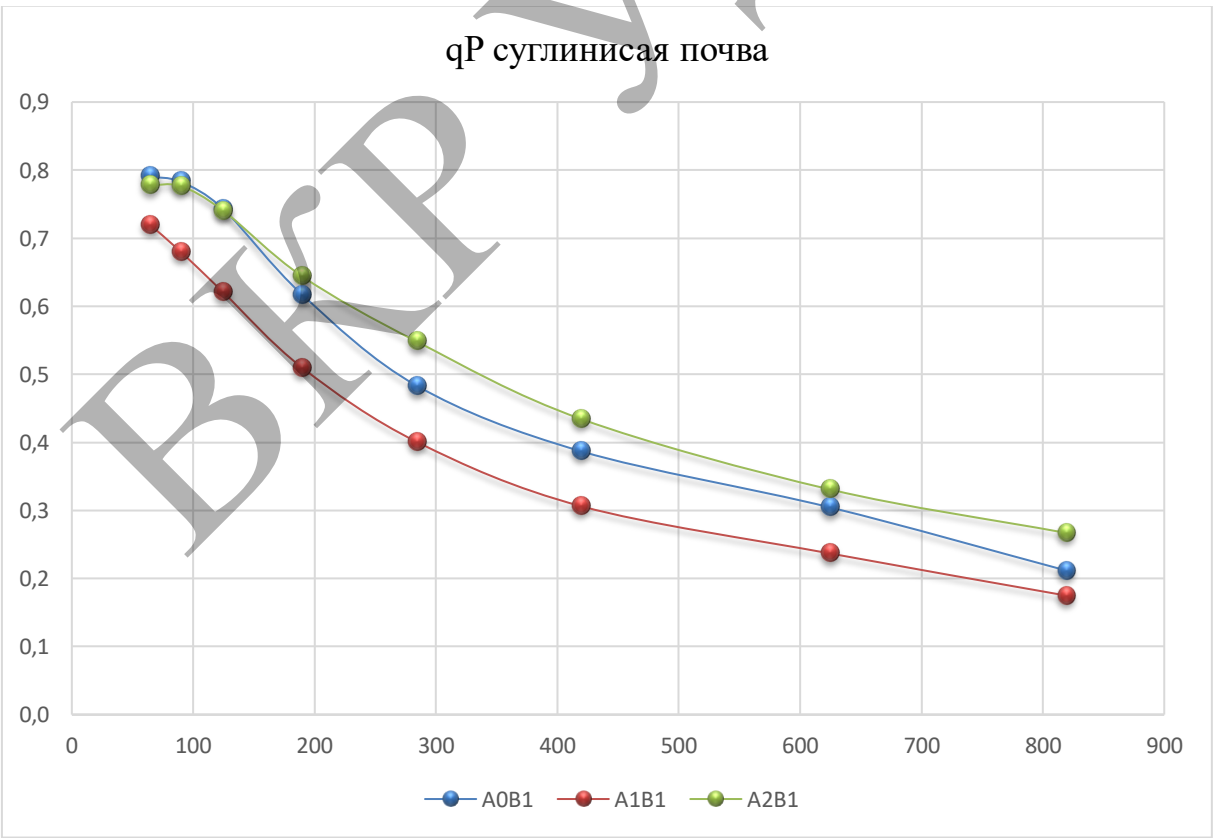


Рисунок В.22 – Фотохимическое тушение флуоресценции

ВКР УлГУ

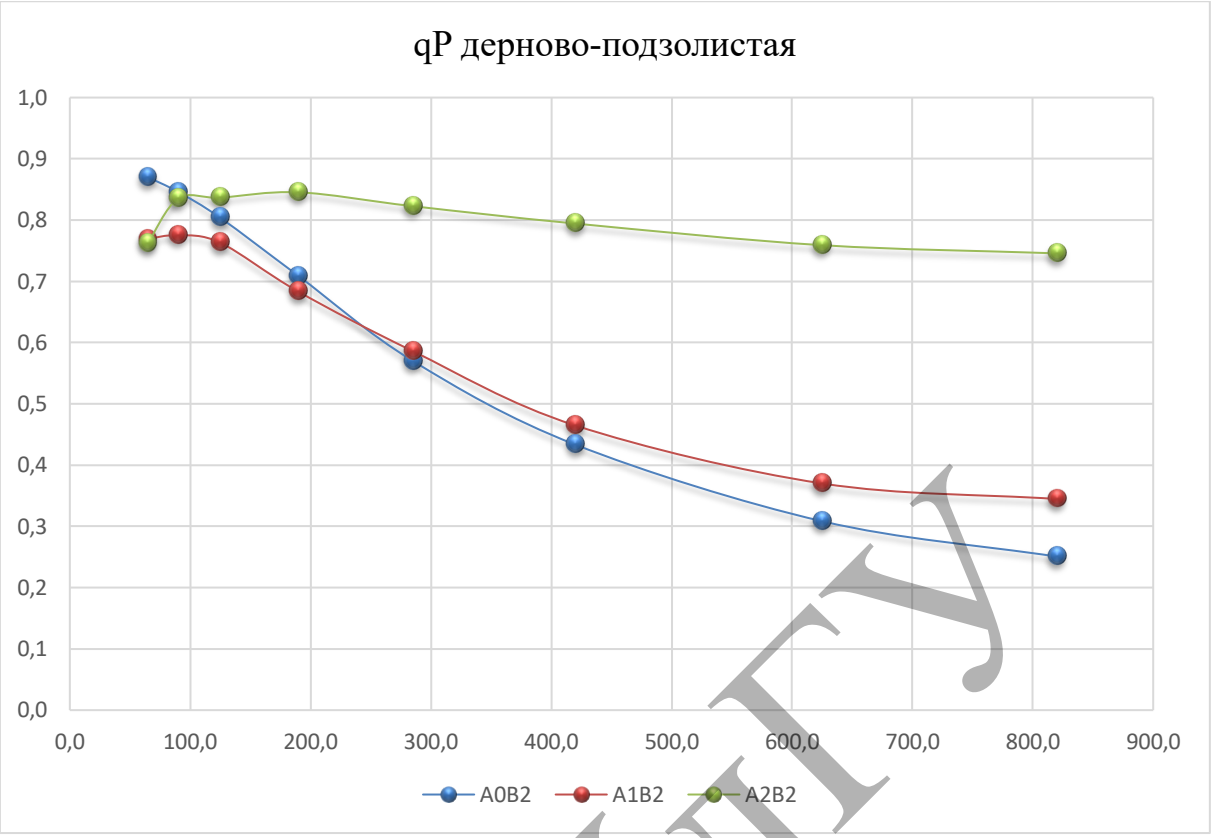


Рисунок В.23 – Фотохимическое тушение флуоресценции

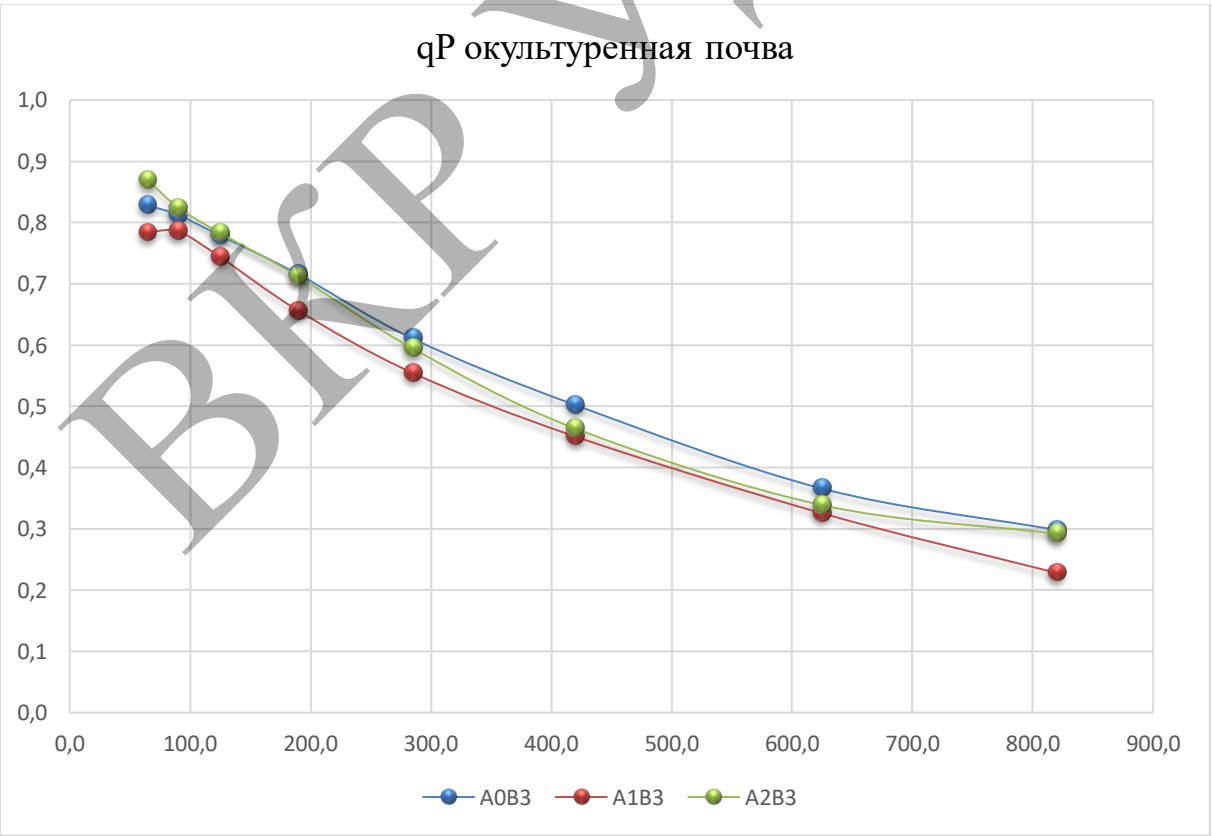


Рисунок В.24 – Фотохимическое тушение флуоресценции

ВКР УлГУ