

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Панова

Панова Мария Игоревна

**ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ГУМИНОВЫХ
ПРОДУКТОВ НА ПОЧВЫ, ЗАГРЯЗНЕННЫЕ ТЯЖЕЛЫМИ
МЕТАЛЛАМИ**

Специальность 03.02.08 – экология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2021

Работа выполнена на кафедре земельных ресурсов и оценки почв, в лаборатории экотоксикологического анализа почв факультета почвоведения МГУ имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель *Терехова Вера Александровна,
доктор биологических наук, доцент*

Официальные оппоненты *Безуглова Ольга Степановна, доктор биологических наук, профессор, кафедра почвоведения и оценки земельных ресурсов Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, профессор*

Попов Александр Иванович, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, кафедра почвоведения и экологии почв, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», профессор

Воронина Людмила Петровна, доктор биологических наук, доцент, кафедра агрохимии и биохимии растений факультета почвоведения ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», ведущий научный сотрудник

Защита диссертации состоится 25 мая 2021 г. в 15 час. 30 мин. на заседании диссертационного совета МГУ.03.05 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, ГСП–1, Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12, МГУ, факультет почвоведения, ауд. М-2.

Эл. почта: mmakarov@soil.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/362404713/>.

Автореферат разослан «22» апреля 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Ковалева Наталия Олеговна



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Химическое загрязнение почв – одна из наиболее острых проблем современной экологии. Для обеспечения устойчивого функционирования наземных экосистем необходим поиск эффективных способов восстановления нарушенных почв, комплексная оценка надежности и безопасности проводимых ремедиационных мероприятий.

Гуминовые продукты (ГП), производимые из разных сырьевых источников органической природы, легко включаются в естественные круговороты веществ, активируют рост и развитие живых организмов (Kozlova et al., 2015; Olk et al., 2018; Canellas et al., 2020). Наличие в составе ГП разнообразных функциональных групп, в том числе ароматических структур, обуславливает их активное участие в сорбционных процессах, в снижении подвижности и биодоступности токсических элементов. Благодаря этим свойствам ГП рекомендуются к практическому применению во многих сферах, в том числе, для восстановления экологического состояния почв, подверженных химическому загрязнению, в частности, тяжелыми металлами (ТМ) (Kulikova et al., 2005; Perminova et al., 2006; Soler-Rovira et al., 2010).

Наличие экспериментально обоснованных универсальных схем оценки качества и ремедиационных свойств ГП – важное условие их безопасного и эффективного использования в природных средах. С помощью высокотехнологичного оборудования достигнуты большие успехи в изучении структурно-функциональной организации гуминовых компонентов почв (Попов, 2004; Лодыгин и др., 2014; Трубецкой, Трубецкая, 2017; Zavarzina et al., 2019; Vinci et al., 2021). Однако, критерии и подходы к выбору базовых показателей качества гуминовых продуктов в отношении улучшения «здоровья» почв до сих пор недостаточно разработаны (Чуков и др., 2010; Yakimenko, Terekhova, 2011; Yakimenko et al., 2019). В некоторых европейских странах для характеристики «здоровья» почв используются показатели микробной биомассы, дыхательной активности почвенных микроорганизмов (Hofman et al., 2004; Ritz et al., 2009; Goss et al., 2013). Известны оценки качества ГП, характеризующие защитные свойства и детоксицирующую способность по отношению к высшим растениям (Куликова, 2008), микроводорослям (Чуков, Голубков, 2005).

Разработка универсального индекса и экспериментально-обоснованной оценки ГП в отношении восстановления нарушенных почв, в которой будут учтены данные химических, биоиндикационных и экотоксикологических анализов, – необходимая мера по обеспечению эффективности их применения и устойчивого развития наземных экосистем.

Согласно биотической концепции, доминирующей в современной системе экологического контроля, первостепенное значение в анализе значимых экологических функций почв следует придавать показателям роста растений, отражающим плодородие, и снижению токсичности для живых систем.

Цель работы заключалась в исследовании влияния гуминовых продуктов на восстановление экологических функций почв, загрязненных тяжелыми металлами.

Задачи

1. Изучить влияние гуминовых продуктов на изменение химических, биоиндикационных и экотоксикологических показателей почв, загрязненных тяжелыми металлами.

2. Оценить экологическое состояние агродерново-подзолистой, аллювиально-луговой, искусственной стандартной почв с высоким содержанием тяжёлых металлов после обработки гуминовыми продуктами (лигногумат, флексом, киргизский угольный и очищенные гуминовые кислоты).

3. Охарактеризовать ремедиационный потенциал гуминовых продуктов в почвах по снижению экотоксичности для гидробионтов и высших растений, иммобилизации тяжелых металлов, структурным и функциональным характеристикам почвенного микробиома.

4. Разработать алгоритм оценки гуминовых продуктов, используемых при ремедиации почв, загрязненных тяжелыми металлами, для возможного включения в программы их сертификации.

Объект исследования – гуминовые продукты (лигногумат, флексом, киргизский угольный и очищенные гуминовые кислоты) из лигносульфоната, торфа, угля; **предмет исследования** – изменения химических, биоиндикационных и экотоксикологических свойств верхних горизонтов аллювиально-луговой почвы, загрязненной ТМ в результате промышленной деятельности, агродерново-подзолистой и искусственной стандартной почв, загрязненных ТМ в условиях эксперимента, до и после обработки гуминовыми продуктами.

Научная новизна

Предложен индекс ремедиации (ИР) как мера оценки гуминовых продуктов в отношении их способности восстанавливать свойства почв при химическом загрязнении. Для расчета ИР гуминовых продуктов определен набор химических, биоиндикационных и экотоксикологических показателей почв, влияющих на их устойчивое функционирование при загрязнении тяжелыми металлами. Получена дополнительная информация об изменении свойств почв, загрязненных в естественных и экспериментальных условиях, позволяющая расширить представления о ремедиационной способности гуминовых продуктов из разных сырьевых источников.

Практическая значимость

Результаты исследования дали основание предложить алгоритм оценки гуминовых продуктов как потенциальных ремедиантов почв при химическом загрязнении ТМ с целью сертификации. Характеристика сравнительной эффективности изученных ремедиантов полезна для потребителей и совершенствования производства гуминовых продуктов.

Отдельные положения и выводы могут быть включены в образовательные программы для студентов экологических специальностей ВУЗов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Междисциплинарная методология ТРИАД позволяет оценить изменение химических и биологических (биоиндикационных и экотоксикологических) характеристик почв, загрязненных ТМ, под воздействием гуминовых продуктов в виде обобщенного показателя - индекса состояния почв.
2. Способность гуминовых продуктов к восстановлению экологических функций почв следует характеризовать по комплексу параметров, включающих содержание ТМ в доступной для растений форме, интенсивность базального дыхания и содержание углерода микробной биомассы, токсичность для гидробионтов и высших растений.
3. Для первичной оценки гуминовых продуктов в отношении восстановления почв, загрязненных ТМ, допустимо использование искусственной почвы стандартного состава (по ISO 11268-2). Для применения ГП в естественных условиях необходим выбор доз внесения в зависимости от степени загрязнения и природных почвенных характеристик.
4. Значения индекса ремедиации как меры качества гуминовых продуктов позволяют ранжировать их эффективность в отношении восстановления нарушенных почв.

Степень достоверности и апробация результатов

Эксперименты проводили в двух-трех параллелях, в каждой параллели было не менее трех повторностей. Проанализировано 339 образцов почв. Результаты обработаны с применением методов вариационной статистики. Выводы достоверны при принятом уровне доверительной вероятности $P=0.95$.

Материалы работы представлены *на конференциях и международных конгрессах*: II Всероссийская научно-практическая конференция «Утилизация отходов производства и потребления: инновационные подходы и технологии» (Киров, Россия, 17 ноября 2020); SETAC Europe 25th Annual Meeting (Барселона, Испания, 3-7 мая 2015); Докучаевские молодежные чтения "Деградация почв и продовольственная безопасность России" (Санкт-Петербург, Россия, 2-5 марта 2015); 4th International Conference on Environmental Pollution and Remediation (Прага Чехия, 2014); 9th International Soil Science Congress on “The Soul of Soil and Civilization” (Сиде, Турция, 14-16 октября 2014); международной школе "Технологии биотестирования в экологической оценке агроценозов и гуминовых веществ" (Москва, Россия, 2014).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 18 работ: **8 статей** в научных журналах (из них **5** – включены в международные базы цитирования Scopus и WoS, **3** – включены в RSCI, рекомендованы ВАК), 1 статья в сборнике конференции, 9 тезисов в сборниках российских и международных конференций.

Личный вклад автора заключается в разработке и теоретическом обосновании схем экспериментов, отборе почвенных образцов, организации опытов в контролируемых лабораторных условиях, выполнении экспериментальной работы и основной части статистической обработки результатов, визуализации, анализе и интерпретации результатов, а также подготовке публикаций и докладов по результатам работы.

Структура и объем диссертации. Диссертация включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть, заключение, выводы, библиографический список – 191 источник, приложение; изложена на 128 страницах, содержит 17 рисунков и 19 таблиц.

Экспериментальная работа выполнена при поддержке РФФИ (18-04-01218-а, 10-04-90758-моб_ст.), обобщение результатов и подготовка к защите осуществлена в рамках Программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова "Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды".

Благодарности. Автор выражает глубокую искреннюю благодарность своему научному руководителю, профессору кафедры земельных ресурсов и оценки почв, Вере Александровне Тереховой за всестороннюю поддержку в ходе проведения исследования, ценные советы и рекомендации. Коллективу кафедры земельных ресурсов и оценки почв факультета почвоведения МГУ имени М.В. Ломоносова за активную дискуссию и важные замечания, полученные в процессе обсуждения результатов работы. Коллективу ЛЭТАП за помочь в проведении экспериментальных работ. А также д.х.н. Кыдрагиевой К.А., к.б.н. Пукальчик М.А., к.б.н Якименко О.С. – за консультации, обсуждение результатов, предоставление образцов гуминовых продуктов, к.б.н. Ивановой А.Е. за помочь в идентификации видов микромицетов, к.б.н. Карпухину М.М. за помочь в проведении химического анализа почв.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Обзор литературы содержит сведения о широко распространённых технологиях, применяемых в органическом земледелии и восстановлении нарушенных почв. Охарактеризовано разнообразие гуминовых продуктов и их функций в зависимости от сырьевых источников, особенностей производства. Рассмотрены проблемы оценки ГП, применение которых рекомендовано для ремедиации химически загрязненных почв.

Дано общее представление о масштабах и последствиях загрязнения почв тяжелыми металлами, приводятся сведения об основных источниках, распространенности и степени опасности ТМ.

Особое внимание уделено анализу влияния ТМ и ГП на биоиндикационные и экотоксикологические характеристики почв. Дан обзор основных подходов к оценке безопасности и качества гуминовых продуктов.

2. Материалы и методы

2.1. Материалы

Образцы агродерново-подзолистой почвы – Albic Glossic Retisols – (АДПП) отбирали из горизонта 0-20 см на опытном поле УОПЭЦ МГУ «Чашниково» (Московская область). Свойства: средний суглинок, pH – 6.3, гумус – 3.45%.

В образцы АДПП вносили Pb(NO₃)₂ и Zn(NO₃)₂ из расчета по 4 ОДК каждого металла. С целью ремедиации вносили флексом (г/кг) по 0.6 и 1.8, лигногумат – 0.8 и 2.3, очищенные гуминовые кислоты – 0.4 и 1.2.

Образцы аллювиально-луговой почвы – Umbric Fluvisols Oxyaquic – (АЛП) отбирали в пойме р. Литавка, Прибрам, Чехия. Почва: легкая глина, pH – 7.2, гумус – 5.52 %; Валовое содержание ТМ (мг/кг): Zn – 7595.7; Cd – 80.8; Cu – 62.5; Pb – 4346.1. В качестве ремедиантов АЛП использовали лигногумат (г/кг) по 0.5 и 1.0 и биоуголь (%) – 0.5 и 5.0.

Образцы стандартной искусственной почвы Reference/Standard/Artificial soil – (ИСП) готовили по протоколу ISO 11268-2: 10% торф, 20% каолин, 70% кварцевый песок; pH – 6.6. В образцы ИСП вносили CuSO₄*5H₂O (2 и 4 ОДК меди). С целью ремедиации использовали флексом, лигногумат и киргизский угольный гумат 0.1 и 1.0 г/кг.

Испытывали ремедиационную способность следующих добавок (экспозиция – 30 сут.):

FL – флексом – гумат калия из торфа (ООО «Флексом», Россия) – зольность 25.8%; Na 0.98, K 103, Ca 1.02, Mg 0.29 мг/г.

LG – лигногумат калия из лигносульфоната (НПО «РЭТ», Россия) – зольность 40%; Na 22.5, K 125, Ca 0.93, Mg 0.2 мг/г.

KR – киргизский угольный гумат натрия (ИХФ НАН, Кыргызстан) – зольность 38.8%; K 1.5 мг/г.

HA – очищенные гуминовые кислоты – извлеченные из угля (ИХФ НАН, Кыргызстан) – зольность 4.38%.

BC – биоуголь – продукт пиролиза древесной щепы («Amagro», Чехия) – фракция 2-8 мм, C 75%, зольность 3.86%; K 0.59, Ca 0.98, Mg 0.02 мг/г.

2.2. Методы исследования

Химический анализ почвенных образцов. Гидролитическую кислотность измеряли потенциометрическим методом (ГОСТ 26423-85) на приборе Hanna HI2211. Для оценки подвижности ТМ проводили последовательное экстрагирование: 1) водорастворимые формы – H₂O; 2) доступные для растений – 1М ацетатно-аммонийный буфер NH₄OAc (ААБ), pH 4.8, в образцах АДПП и ИСП;

0.01 М CaCl₂, в образцах АЛП; 3) подвижные – 0.11 М CH₃COOH, pH 2.0. Валовое содержание ТМ по ЦВ 5.18.19.01-2005. Концентрации ТМ определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанный плазмой на приборе ICP-MS 7500a в Центре коллективного пользования МГУ и на оптическом эмиссионном спектрометре ICP-OES в чешском Институте наук о жизни.

Биотестирование. Экотоксичность проверяли в водных экстрактах (1:4) почв по выживаемости ракообразных *Ceriodaphnia affinis* (ФР.1.39.2007.03221), *Daphnia magna* (ФР 1.39.2007.03222), инфузорий *Paramecium caudatum* (ФР.1.39.2006.02506), изменению прироста численности клеток микроводорослей *Scenedesmus quadricauda* (ФР.1.39.2007.03223).

Фитотестирование проводили: а) в пластиковых планшетах (ФР.1.31.2020.38716) по длине корней проростков семян *Sinapis alba* на увлажненной водным экстрактом фильтровальной бумаге (элюатный способ) и на почвенных образцах (аппликатный способ); б) в вегетационных сосудах – по весу зелёной фитомассы смеси газонных трав.

Биоиндикация. Структуру микробиоты характеризовали по культивируемым видам микромицетов на среде Чапека (Методы почвенной микробиологии..., 1991), учитывали численность КОЕ, число видов – N, разнообразие по Шеннону, сходство по Съеренсену-Чекановскому.

Функциональные отклики микробиома оценивали по активности почвенного дыхания и ферментов.

Базальное дыхание (БД, мкг С-CO₂/г×ч) измеряли в увлажнённой почве (ISO 16072:2002), субстрат-индуцированное дыхание (СИД, мкл С-CO₂/г×ч) после добавления к почве глюкозы, углерод микробной биомассы (C_{мик}, мкг С/г) рассчитывали по формуле: СИД × 40.04 + 0.37 (1), метаболический коэффициент (*q*CO₂) – как отношение БД к C_{мик} (Anderson, Domsh, 1993; Ananyeva et al., 2008).

Активность почвенных ферментов анализировали газометрическими (каталаза) и колориметрическими методами (гидролазы, пероксидаза, кислая фосфатаза).

Оценку экологического состояния почв проводили согласно методологии ТРИАД (ISO 19204:2017). Интегральный индекс состояния (ИС) почв считали по формуле (2) с весовыми коэффициентами химического (ИСх), биоиндикационного (ИСб) и токсикологического (ИСт) индексов (по Dagnino et al, 2005):

$$ИС = \frac{ИСх+1.5\times ИСт+2.0\times ИСб}{1+1.5+2.5}. \quad (2)$$

Для характеристики ремедиационного потенциала гуминовых продуктов рассчитывали ИР – индекс ремедиации:

$$ИР = \frac{ИСг\times 100}{ИСз}, \quad (3)$$

где ИР – индекс ремедиации, ИСг – индекс состояния почвы, обработанной гуминовым продуктом, ИСз – индекс состояния загрязненной почвы, не обработанной ГП.

Статистическая обработка. Сравнение средних значений независимых выборок выполняли однофакторным дисперсионным анализом (one-way ANOVA) с последующим попарным множественным сравнением (критерий Стьюдента, $p < 0.05$). Вклад факторов «тип почвы», «ТМ», «вид ГП», «доза ГП» оценивали дисперсионным анализом (MANOVA). Взаимосвязь между ИР и экспериментальными данными оценивали корреляционным анализом (по Пирсону). Для анализа пространственного распределения образцов и взаимосвязи ИР с содержанием ТМ и биотическими характеристиками использовали метод главных компонент (МГК). Статистическая обработка экспериментальных данных и их визуализация выполнена в программах STATISTICA 13.0 и Excel 2016.

3. Результаты и обсуждение

3.1 Влияние гуминовых продуктов на экологическое состояние агродерново-подзолистой почвы (АДПП), загрязненной тяжелыми металлами

Добавленные соли Pb и Zn – привели к изменению химических, биоиндикационных и экотоксикологических свойств АДПП.

Содержание подвижных форм Zn составило 52% от общего количества, внесенного на момент постановки опыта, а Pb – 57%, значение pH снизилось на 0.35 (с 6.19 до 5.84). Под действием ТМ произошло увеличение С_{мин} с 90.64 до 132.60 мкг С/г, снижение БД с 0.50 до 0.44 мкг С-СО₂/г×ч и *q*CO₂ с 5.55 до 3.32 мкг С-СО₂/мгС×ч. После добавления ТМ активность пероксидазы снизилась на 34% (с 16.6 до 10.98 мг 1,4-ПБХ/г×ч), гидролаз на 40% (с 9.83 до 5.89 мг ФДА/г×ч), активность кислой фосфатазы увеличилась на 31% (с 87.06 до 113.85 мг рНФ/г×ч). ТМ задерживали рост корней *S. alba* на 40%.

Индекс экологического состояния загрязненной ТМ почвы, рассчитанный на основе приведенных данных, ИС = 0.48 (при максимуме неблагополучия ИС = 1.0). Внесение ГП способствовало снижению этого показателя.

Подвижность ТМ в АДПП

Обработка образцов АДПП гуминовыми продуктами привела к снижению подвижности ТМ (табл. 1).

Таблица 1 – Влияние гуминовых продуктов на содержание* Pb и Zn (мг/кг) в образцах агродерново-подзолистой почвы (АДПП)

Вариант опыта	ГП, г/кг	Zn			Pb	
		ВР _{H2O}	ДР NH ₄ OAc	ОК CH ₃ COON	ДР NH ₄ OAc	ОК CH ₃ COON
Без добавок (фон)	0	0.08 ± 0.04f ¹	0.97 ± 0.30e	6.41 ± 1.16d	1.68 ± 0.48c	2.87 ± 0.18b
Pb+Zn	0	1.32 ± 0.30b	24.83 ± 4.11d	459.21 ± 121.70c	29.05 ± 1.24f	315.98 ± 35.21d
	0.6	1.22 ± 0.52ab	18.09 ± 2.94bcd	348.36 ± 29.39b	25.15 ± 1.54e	208.37 ± 26.94a
FL	1.8	0.96 ± 0.18de	14.52 ± 0.78a	259.98 ± 14.61ab	17.70 ± 1.43b	136.66 ± 16.14c
	0.8	0.86 ± 0.11 cd	20.47 ± 0.93bc	279.75 ± 17.50a	14.25 ± 2.18ab	223.62 ± 15.93a

	2.4	$0.82 \pm 0.03c$	$19.50 \pm 3.32cd$	$266.40 \pm 17.92ab$	$14.18 \pm 0.24a$	$214.63 \pm 15.03a$
НА	0.4	$1.23 \pm 0.05ab$	$18.18 \pm 5.21abc$	$315.78 \pm 18.59ab$	$15.47 \pm 4.14ab$	$229.19 \pm 31.33a$
	1.2	$1.02 \pm 0.02ae$	$14.88 \pm 1.93ab$	$317.82 \pm 60.45ab$	$8.15 \pm 1.41d$	$225.91 \pm 24.90a$

*здесь и далее в таблицах указано среднее значение и стандартное отклонение при $n = 3$;

¹- разные буквы в пределах одного столбца означают достоверные различия при $p = 0.05$ по критерию Фишера.

Добавка флексома (FL 1.8) в загрязненные ТМ образцы агродерново-подзолистой почвы приводила к снижению содержания водорастворимых форм (ВР) Zn на 27%; доступных для растений форм Zn (ДР) на 28%, Pb на 39%; обменных форм (ОК) Zn на 44%, Pb на 57%. Эффект от меньшей дозы флексома (0.6) на эти показатели был выражен слабее.

Лигногумат (LG 2.3) снижал содержание водорастворимых форм Zn на 41%; доступных для растений форм Zn - на 21%, Pb на 51%; обменных форм Zn на 42%, Pb на 32%, в меньшей дозе (0.8) лигногумат оказывал аналогичное, но менее выраженное воздействие.

Гуминовые кислоты (НА) понижали содержание водорастворимых форм Zn на 23%; доступных для растений форм Zn на 40%, Pb на 72%; обменных форм Zn на 31%, Pb на 29%.

Реакция растений

Гуминовые продукты образцах АДПП значительно снижали фитотоксический эффект солей Pb и Zn в 1.5 – 2 раза (рис. 1).

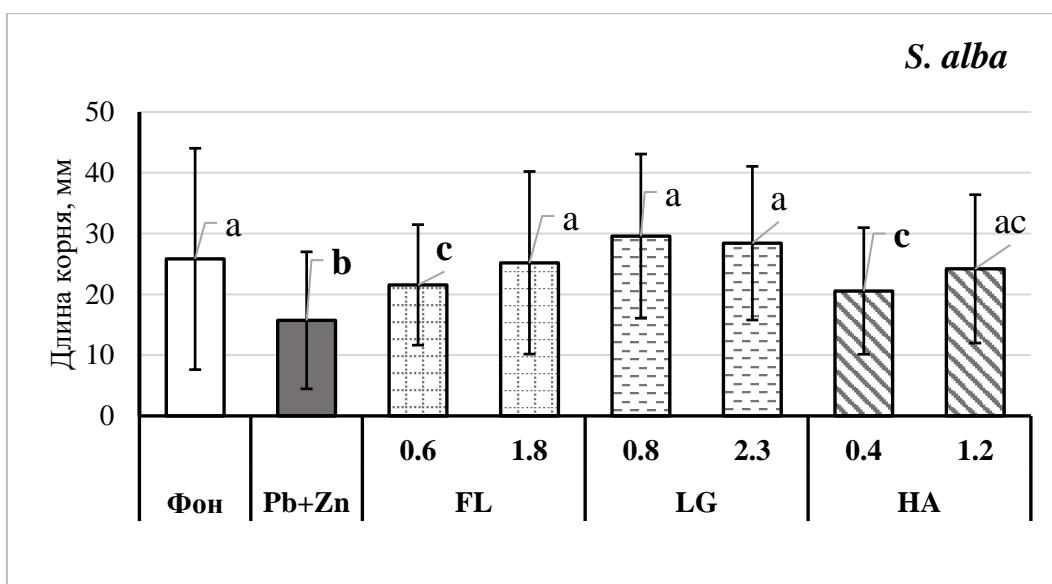


Рисунок 1 - Влияние гуминовых продуктов (г/кг) на длину корней проростков *S. alba*

Даны средние значения ($n=90$), планка погрешностей отражает стандартные отклонения от среднего; здесь и далее, обозначенные разными буквами варианты различаются достоверно по критерию Фишера

Достоверный детоксицирующий эффект по показателю длины корней установлен для ГП в следующих дозах (г/кг): FL 1.8, LG 0.8 и 2.3 и НА 1.2.

Микробиологическая активность почв

Обнаружена высокая вариабельность отклика почвенного микробиома на добавление ГП в почву с ТМ (рис. 2).

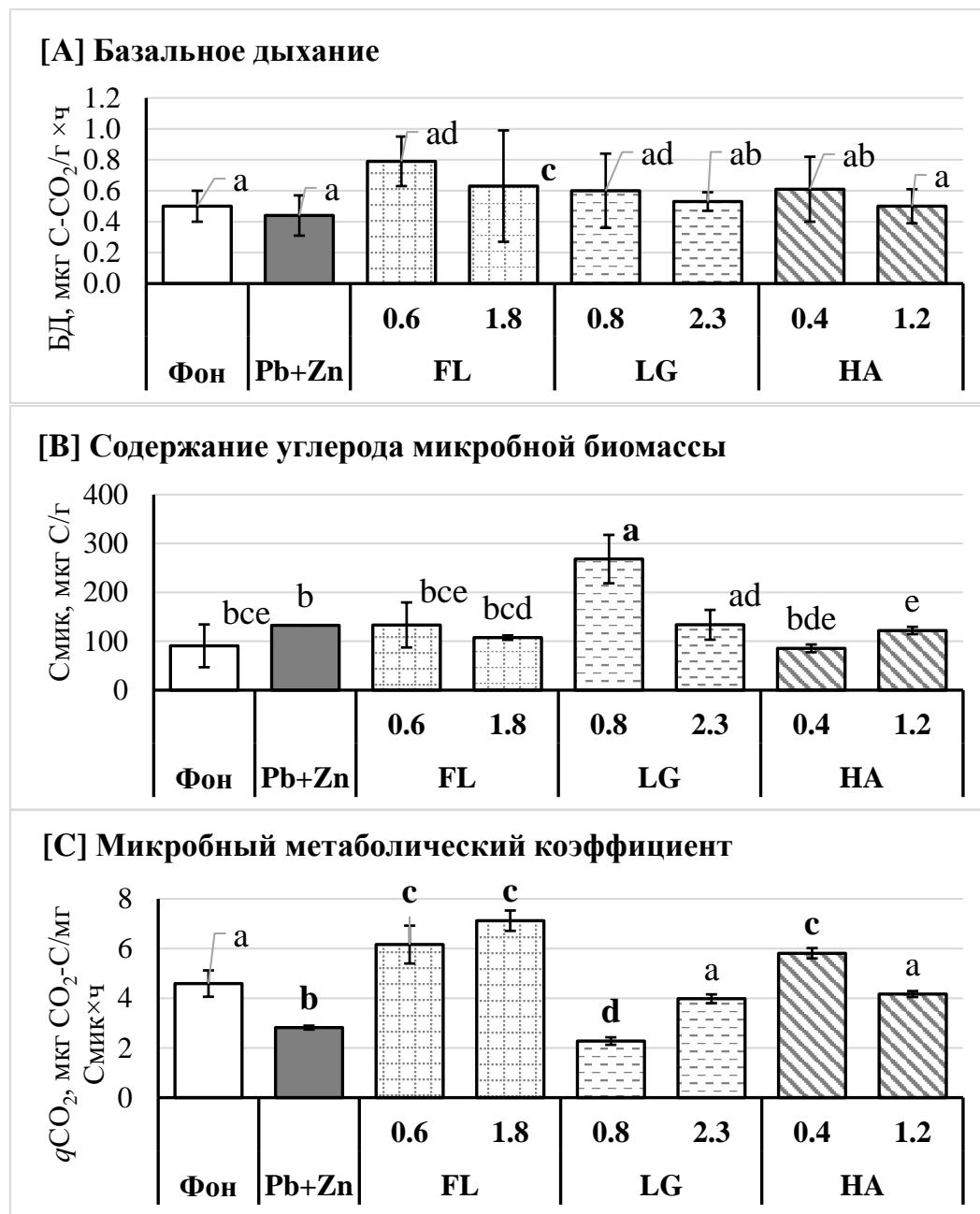


Рисунок 2 – Влияние гуминовых продуктов (г/кг) на микробиологические характеристики агродерново-подзолистой почвы (*n*=3)

Лигногумат (0.8) увеличивал С_{мик} в 3 раза относительно образца без ТМ и без ГП (фон). Поскольку показатели БД не изменились, то увеличение С_{мик} привело к снижению *qCO₂*, высокие значения которого являются маркером стрессового состояния микробиоты. FL (0.6 и 1.8) и HA (0.4) достоверно увеличивали *qCO₂*, хотя на показатель С_{мик} не влияли. Установлено снижение негативного эффекта солей Pb и Zn на активность пероксидазы при применении LG в обеих дозах, как и общей

активности гидролаз при 2.3 г/кг. Препараты НА и FL положительно повлияли на активность фосфатазы в почве с ТМ.

В целом, исследованные ГП оказали положительное воздействие на экологическое состояние АДПП, наибольшие изменения обнаружены по химическим и экотоксикологическим параметрам. Лучшие ремедиационные свойства показали флексом и очищенные гуминовые кислоты.

3.2 Влияние гуминовых продуктов на экологическое состояние аллювиально-луговой почвы (АЛП), загрязненной промышленными выбросами

Подвижность ТМ в АЛП

Содержание подвижных форм ТМ в образцах АЛП, обработанных ремедиантами, представлено в таблице 2.

Таблица 2 – Влияние лигногумата (г/кг) и биоугля (%) на содержание тяжелых металлов в аллювиально-луговой почве

ТМ, мг/кг	Форма экстракции	Вариант опыта					
		Без добавок (контроль)	LG 0.5	LG 1.0	LG 0.5 + BC 5	BC 0.5	BC 5.0
Cd	BP _{H2O}	0.10±0.02a*	0.08±0.02a	0.10±0.03a	0.11±0.01a	0.07±0.01a	0.06±0.03a
	ДР _{CaCl2}	0.30±0.02a	0.23±0.04a	0.16±0.03a	0.09±0.00a	0.25±0.01a	0.14±0.01a
Cu	BP _{H2O}	1.65±0.30d	0.89±0.24c	0.51±0.06a	0.82±0.07c	0.52±0.08a	0.40±0.03a
	ДР _{CaCl2}	0.53±0.06a	0.25±0.06ab	0.16±0.01b	0.14±0.01b	0.16±0.01ab	0.14±0.01b
Pb	BP _{H2O}	0.90±0.50c	0.25±0.03a	0.22±0.05a	0.70±0.14b	0.31±0.11a	0.20±0.01a
	ДР _{CaCl2}	0.10±0.02a	0.05±0.00a	0.05±0.00a	0.05±0.00a	0.05±0.00a	0.05±0.00a
Zn	BP _{H2O}	8.04±2.16a	6.32±1.47a	7.97±2.96a	6.99±0.64a	5.72±0.82a	4.40±3.09a
	ДР _{CaCl2}	10.22±0.15a	7.15±1.71a	5.55±0.18a	2.23±0.16a	7.92±0.38a	3.10±0.24a

*Здесь и далее: разные буквы в пределах одной строки означают достоверные различия при $p=0.05$ по критерию Фишера ($n=3$)

Лигногумат (0.5 и 1.0) в АЛП снижал содержание водорастворимых форм Cu на 46 и 70%, Pb на 75%, Zn на 21 и 50% соответственно дозам. Содержание Cd в доступной для растений форме снизилось на 23 и 45%, Cu на 50 и 70%, Pb на 50%, Zn на 30 и 50%, в соответствии с увеличением дозы LG.

Добавление биоугля (0.5 и 5) в АЛП снижало содержание Cd в водорастворимой форме на 30 и 40%, Cu на 70 и 75%, Pb на 65 и 80%, Zn 20 и 45% соответственно дозам. Содержание доступных для растений (ДР) форм Cd снизилось на 17 и 53%, Cu на 70 и 74%, Pb на 50%, Zn на 23 и 70% в соответствии с увеличением дозы внесения BC.

При совместном применении LG (0.5) и BC (5.0) наблюдалось большее снижение содержания доступных для растений форм ТМ, чем при раздельном использовании аналогичных доз ГП.

Биотестирование на гидробионтах

Токсический эффект для гидробионтов оценивали по выживаемости раков *D. magna* в водном экстракте из образцов почв (рис. 3).

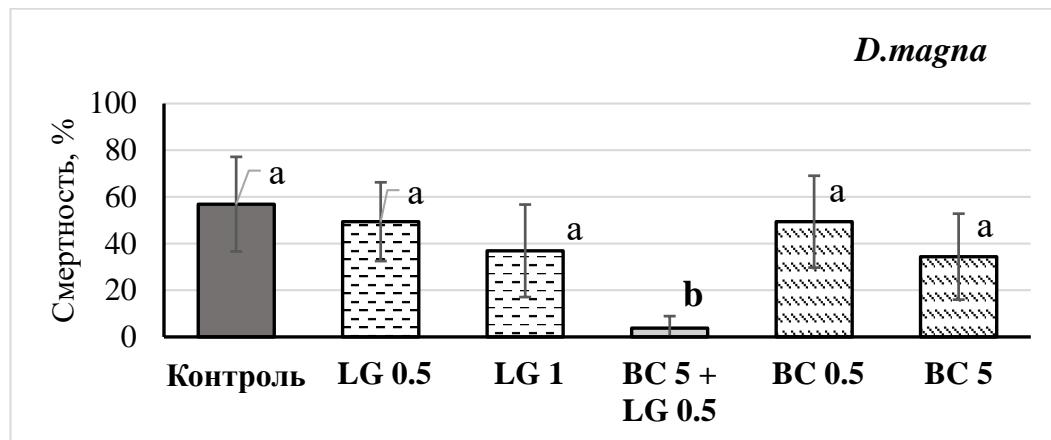


Рисунок 3 – Влияние лигногумата (LG, г/кг) и биоугля (BC, %) на смертность дафний в водных экстрактах образцов аллювиально-луговой почвы

Внесение лигногумата (1.0) и биоугля (5.0) снижало токсичность водных вытяжек из АЛП на 20 и 22.5%, соответственно. При совместном применении LG и BC токсический эффект практически исчезал, смертность ракообразных – 3.8 %, соответствовала градации нетоксичности образца согласно методам биотестирования.

Реакция растений

ГП в образцах АЛП значимо снизили фитотоксический эффект (рис. 4).

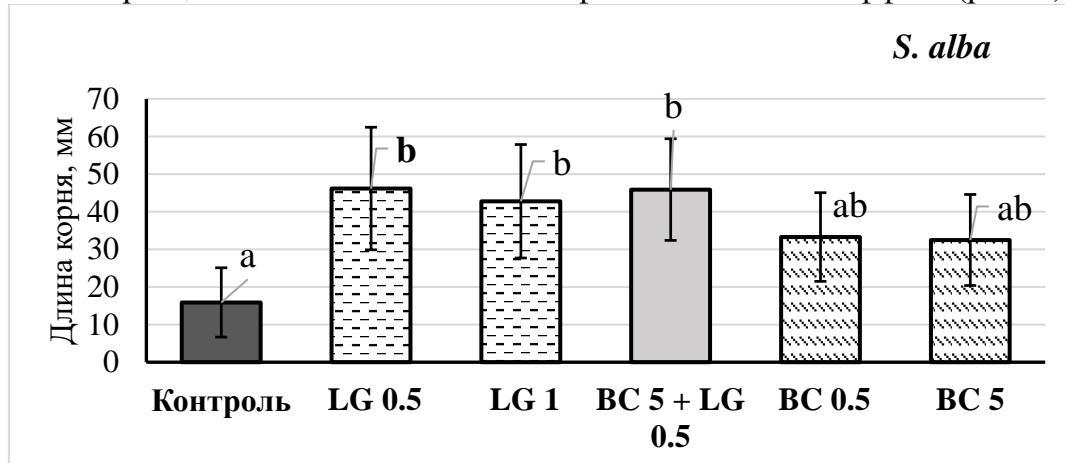


Рисунок 4 – Влияние добавок лигногумата (г/кг) и биоугля (%) на длину корней проростков *S. alba* в аллювиально-луговой почве

Лигногумат стимулировал рост корней *S. alba* в 3 раза, биоуголь – в 2 раза во всех испытанных дозах. При совместном применении BC и LG длина корня в 3 раза больше, чем в контрольном образце (почва с ТМ без ГП).

Микробиологическая активность

Функциональная характеристика микробиома в разных вариантах опыта дана по показателям эмиссии CO₂ (табл. 3).

Таблица 3 – Влияние обработки лигногуматом (г/кг) и биоуглем (%) на микробиологические характеристики аллювиально-луговой почвы

Вариант опыта	БД, мкг С-СО ₂ /г×мл×ч	C _{мик} , мкг С/г	qCO ₂ , мкг CO ₂ -C/мг C _{мик} ×ч
Без добавок (контроль)	217±2	51.2±1.4	4.25±0.21
LG 0.5	248±2*	58.4±1.6*	4.24±0.21
LG 1.0	289±23*	56.9±1.8*	4.85±0.39
LG 0.5 + BC 5	238±14*	55.0±3.1*	4.32±0.22
BC 0.5	239±4*	48.4±0.4*	4.94±0.25*
BC 5.0	190±3*	44.7±2.5*	4.26±0.21

* достоверное отличие ($p = 0.05$) от контроля

Эффект биоугля на БД зависел от дозы применения: наблюдалось увеличение БД при меньшей из испытанных доз и снижение при большей. В варианте с BC 0.5 значимо (на 16%) возрастал qCO₂. Лигногумат улучшал функционирование почвенного микробиома: увеличивал БД и C_{мик} относительно таковых показателей в АЛП без добавок ГП (контроль).

Представление об изменении экологического состояния АДПП и АЛП под влиянием лигногумата дает графическое построение частных индексов состояния (ИСх, ИСт, ИСб) по методологии ТРИАД (рис. 5.)

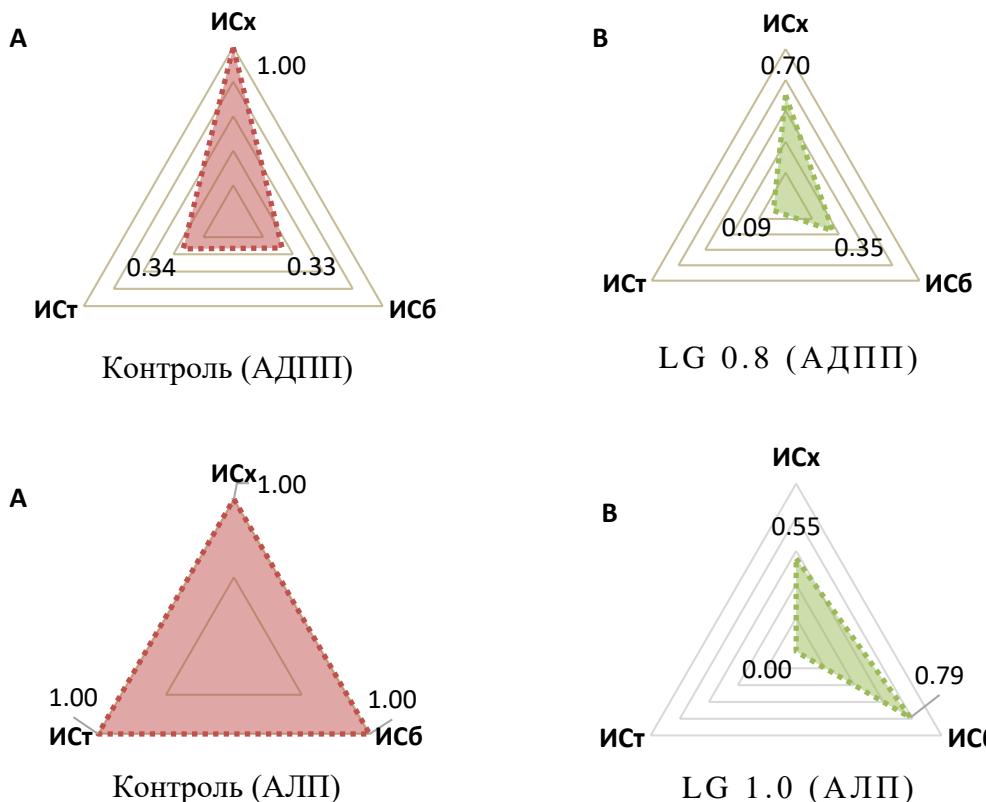


Рисунок 5 – Графическое отображение результатов оценки экологического состояния загрязненных ТМ образцов агродерново-подзолистой и аллювиально-луговой почвы до (А) и после (В) обработки лигногуматом (г/кг)

Положительное воздействие LG на экологическое состояние почв определяется, в первую очередь благодаря иммобилизации ТМ (снижение ИСх), что уменьшает риски загрязнения сопредельных сред, и снижению экотоксичности (ИСт) загрязненных ТМ почвенных образцов.

3.3 Влияние гуминовых продуктов на экологическое состояние искусственной стандартной почвы (ИСП), загрязненной тяжелыми металлами

Внесение сульфата меди в образцы стандартной почвы привело к изменению её химических, экотоксикологических и биоиндикационных свойств. Содержание Cu в доступной для растений форме (экстракция в ААБ) составило 90-100% от общего количества, внесенного в начале опыта.

Добавка соли меди увеличивала общую численность КОЕ микромицетов в 2-4 раза (с 5 до 11 и 20 тыс. КОЕ/г), снижала число видов на 33% (с 12 до 8); повышала разнообразие (индекс Шеннона – Н, от 2.24 до 2.47) в меньшей и незначительно снижала Н до 2.18 в большей дозе применения. Повышала смертность цериодифний в водном экстракте на 30-80, инфузорий на 98-100, прирост микроводорослей ингибировался на 90-100% по сравнению с ИСП без меди. В фитотестах отмечено стимулирующее влияние меньшей концентрации меди: при 264 мг/кг накопление фитомассы возросло с 0.21 до 0.68 г/сосуд.

Индекс экологического состояния (ИС) стандартной почвы, загрязнённой сульфатом меди, был высоким (0.65 - 0.69).

Подвижность ТМ в ИСП

ГП существенно снижали содержание доступных для растений форм ТМ в образцах с Cu 264 мг/кг, однако, при дозе 528 мг/кг достоверного влияния ГП не обнаружено (рис. 6).

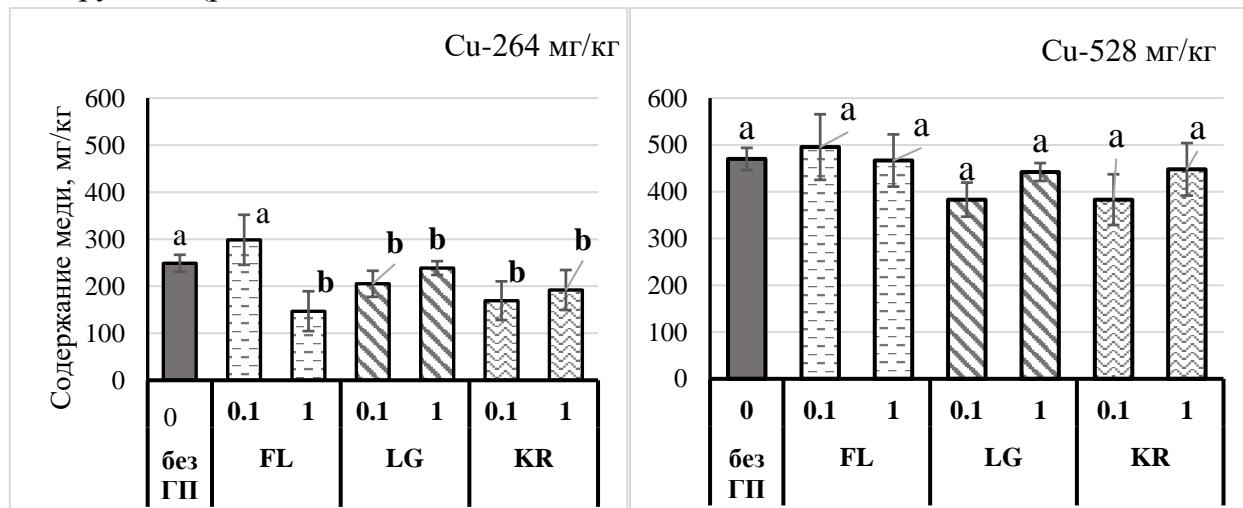


Рисунок 6 – Влияние гуминовых продуктов (г/кг) на содержание Cu (в доступной для растений форме) в образцах стандартной почвы при 2 ОДК (слева) и 4 ОДК меди (справа)

Флексом (FL 1) значимо снижал содержание Cu в доступной для растений форме (на 40%), лигногумат - на 20%, угольный киргизский гумат на 32%.

Реакция растений

Влияние ГП на фитомассу газонной травы зависело от уровня загрязнения стандартной почвы (табл. 4).

Таблица 4 – Влияние гуминовых продуктов (г/кг) на накопление зеленой фитомассы (г/сосуд) в стандартной почве

Cu, мг/кг	Без ГП	FL		LG		KR	
		0.1	1.0	0.1	1.0	0.1	1.0
264	0.68±0.08b	0.52±0.01c	0.11±0.05d	0.22±0.03e	0.30±0.05f	0.37±0.01f	0.15±0.02a
528	0.21±0.04a	0.81±0.13b	1.68±0.26c	0.27±0.04a	0.37±0.02d	0.10±0.03e	0.21±0.01a
Контроль (ИСП без добавок Cu и ГП)							0.20±0.03a

Медь в дозе 2 ОДК (264 мг/кг) стимулировала рост газонной травы, вызывая явление гормезиса. Влияние ГП проявилось в снижении этого эффекта, при этом в больших дозах – в большей степени. Добавление ГП к почве, содержащей 4 ОДК Cu, в основном стимулировало накопление фитомассы, наибольший эффект проявился при воздействии флексома.

При биотестировании на гидробионтах в экстрактах из почвенных образцов, загрязненных медью, установлено положительное воздействие флексома (с FL 1 выживаемость инфузорий возросла с 2 до 54%), однако полного снижения токсичности не установлено.

Структура сообщества микромицетов

Под действием сульфата меди и флексома заметно изменились структурные показатели почвенного микробиома. Численность КОЕ микромицетов в образцах с Cu увеличилась в 2-4 раза. Добавление FL к образцам привело к еще большему росту численности КОЕ грибов на фоне 2 ОДК меди, но не изменило, а в отдельных вариантах даже снизило этот показатель на фоне 4 ОДК (табл. 5). Среди культивируемых видов микромицетов в ИСП доминировали представители pp. *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Penicillium*.

Таблица 5 – Влияние меди (мг/кг) и флексома (г/кг) на структурные характеристики сообществ культивируемых грибов в образцах стандартной почвы

Вариант опыта						
Cu 0	Cu 264			Cu 528		
FL0	FL 0	FL 0.1	FL1	FL 0	FL 0.1	FL 1
Общая численность видов, N						
12	8	11	11	11	11	8
Численность КОЕ, тыс. КОЕ/г						
5.0±1.7	11±4	45±39	32±14	20±14	20±6	6±3
Индекс Шеннона, H						
2.24	2.47	2.23	2.3	2.18	2.16	2.03

Видовое богатство (N) микромицетов в стандартной почве было невысоким, можно говорить о некотором снижении N при действии 2 ОДК меди, и его возрастании практически до фоновых значений после обработки FL. Однако, при высоких дозах Cu и FL число видов сократилось на 30 %.

Индекс Шеннона (H) свидетельствует о снижении разнообразия под действием 4 ОДК Cu, в то время как Cu при 2 ОДК очевидно стимулировала покоящиеся формы грибов. Обработка FL привела к возвращению значения H на уровень с фона (исходный образец ИСП). При высоком содержании Cu разнообразие снизилось, а добавление FL на фоне 4 ОДК меди не привело к восстановлению показателя разнообразия.

Результаты проведенного на образцах стандартной почвы исследования показали наличие ремедиационного потенциала флексома (FL1.0), что проявилось в снижении подвижности ТМ, улучшении условий развития растений, уменьшении экотоксичности для гидробионтов водных экстрактов.

3.4 Индекс ремедиации как мера оценки гуминовых продуктов

С целью обобщения полученных данных рассчитан индекс ремедиации, который дает возможность оценить способность ГП восстанавливать нарушения экологических функций почв, вызванные химическим загрязнением.

В образцах АДПП, загрязненной солями ТМ, показан высокий ремедиационный потенциал ГП (рис. 7).

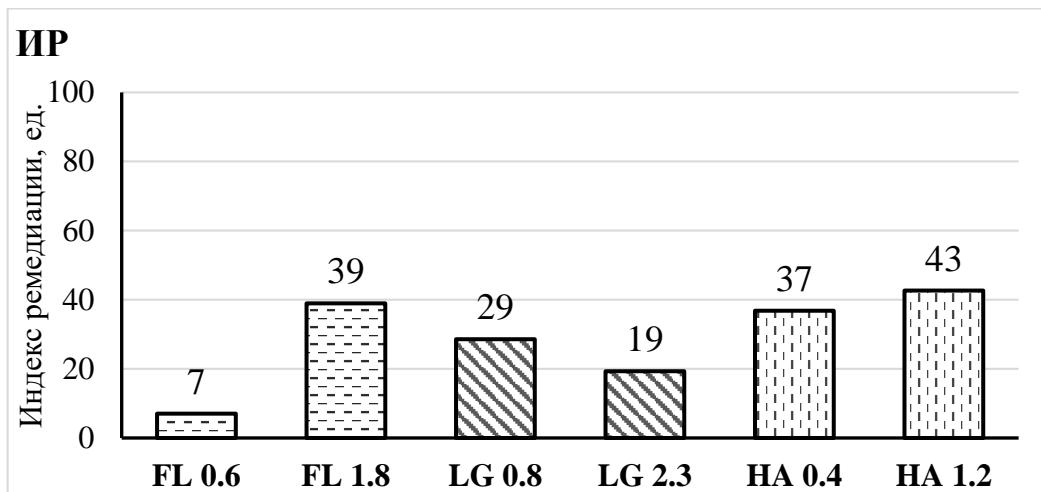


Рисунок 7 – Индекс ремедиации (ИР) гуминовых продуктов, рассчитанный по изменению характеристик агродерново-подзолистой почвы

Наибольший ремедиационный потенциал выявлен у очищенных гуминовых кислот (НА) – ИР = 43. Высокое значение ИР = 39 показал и FL 1.8, LG 0.8 - несколько ниже ИР = 29, FL и LG в меньших из исследованных доз ИР < 20.

В образцах АЛП, подверженных многолетнему техногенному загрязнению высокими дозами ТМ, обработка детоксикантами способствовала улучшению почвенных параметров (рис. 8).

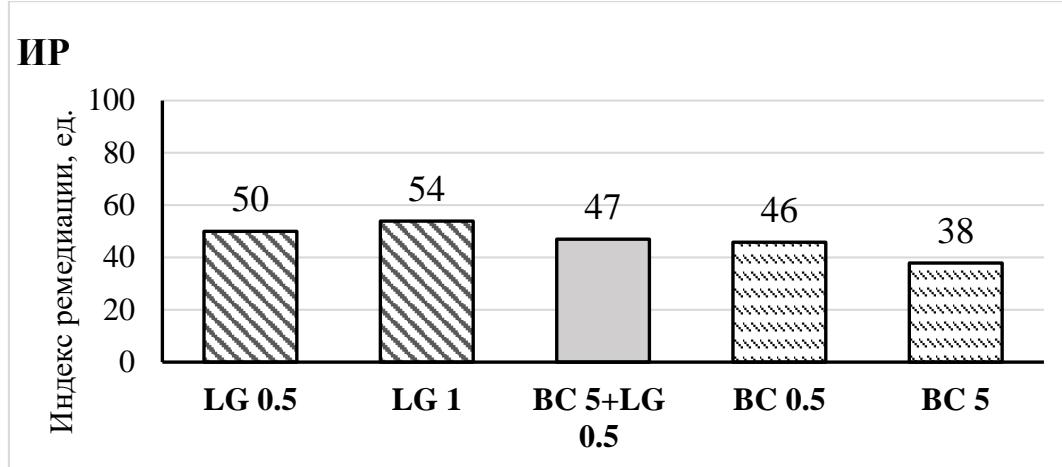


Рисунок 8 – Индекс ремедиации лигногумата и биоугля в образцах аллювиально-луговой почвы

Наибольшую ремедиационную способность проявил LG 1 ИР = 54. При совместном применении LG и BC ИР = 47. В образцах ИСП при внесении FL 1 ИР = 23 (рис. 9).

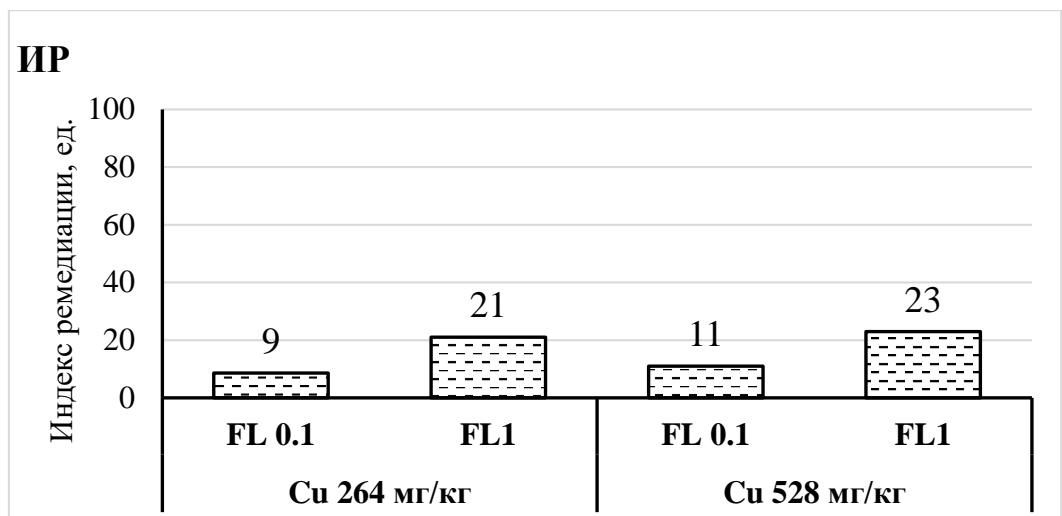


Рисунок 9 – Индекс ремедиации флексома в искусственной стандартной почве

Для расчёта ИР использовали значения почвенных показателей, существенно отличающиеся от контроля (на 20% и более). При оценке действия ГП в АДПП учитывали содержание Zn и Pb в доступной для растений и обменной формах; активность базального дыхания, содержание С микробной биомассы; активность ферментов (пероксидаза, кислая фосфатаза, гидролазы); фитотестирование аппликатным способом (*S. alba*), биотестирование на гидробионтах (*C. affinis*, *S. quadricauda*). В АЛП – содержание Zn, Pb, Cd, Cu в ВР и ДР формах; БД и С_{мик}; кислая фосфатаза; *S. alba* аппликатным способом, биотестирование (*D. magna*). В ИСП – содержание Cu в ДР форме; N видов микромицетов, численность КОЕ, коэффициент Съеренсена-Чекановского; биотестирование (*C. affinis*, *S. quadricauda*, *P. caudatum*), фитотестирование (зеленая биомасса).

Корреляционным анализом показана тесная связь ИР с изменением подвижности ТМ, активностью почвенных ферментов, и экотоксикологическими параметрами (смертность гидробионтов и фитотестирование в остром опыте).

Пространственное распределение образцов и взаимосвязь ИР с содержанием ТМ и биотическими характеристиками почв показано с помощью проекции векторов в координатах главных компонент (рис. 10).

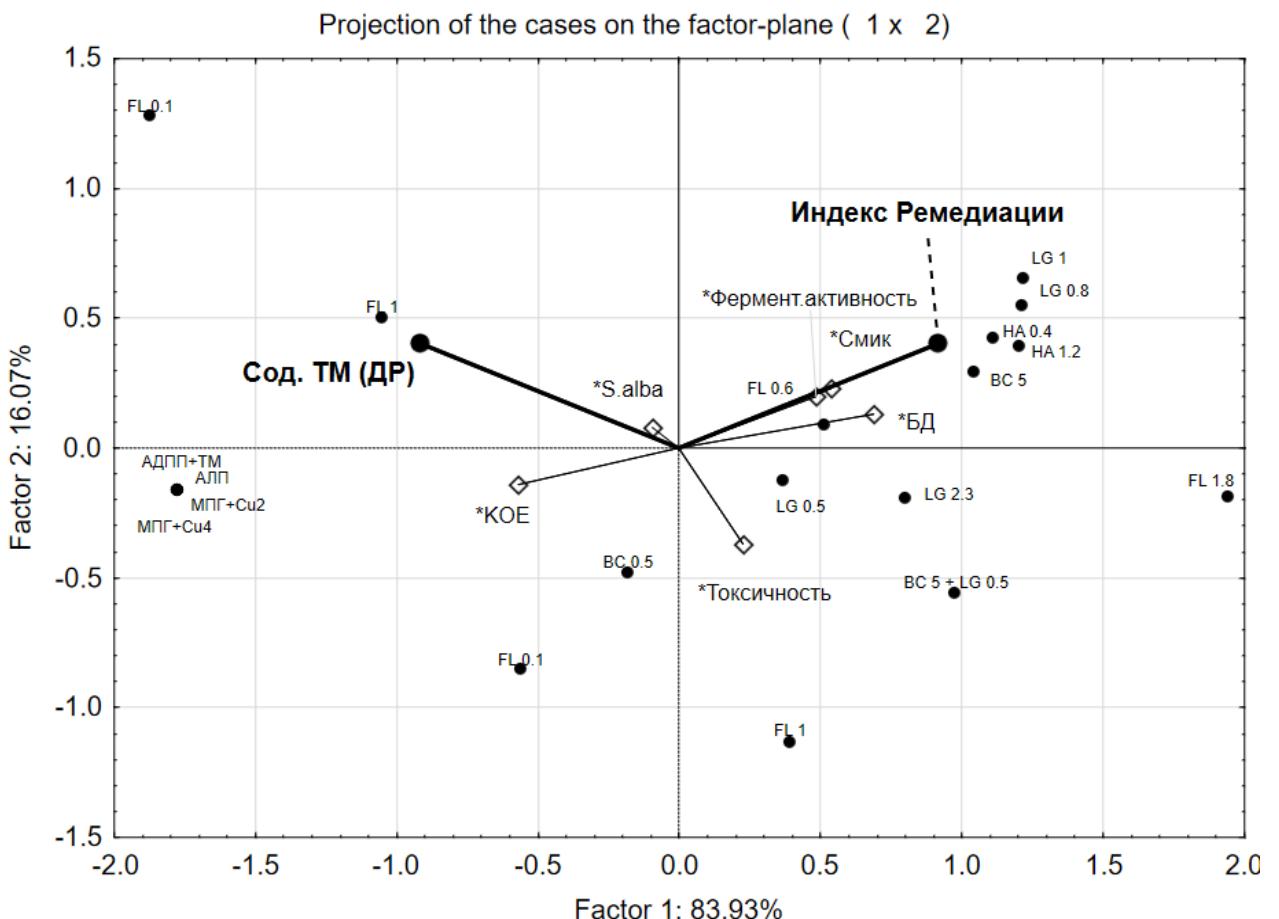


Рисунок 10 – Проекция показателей почв, загрязненных тяжелыми металлами, до и после обработки ГП на 1 и 2 главные компоненты

Векторы респирометрических характеристик и ферментативной активности имеют общее направление и почти совпадают с направлением вектора ИР, что подчеркивает значимость их в оценке ремедиационной активности ГП в отношении почв, загрязненных ТМ. Образцы почв, обработанные ГП, преимущественно локализуются на графике в одной области, вблизи вектора ИР, что свидетельствует об их большом ремедиационном потенциале.

Результаты проведенного исследования показывают, что на ремедиационную активность ГП воздействует комплекс факторов, включающих как почвенные характеристики, так и свойства самих ГП. Для оценки приоритетности влияния факторов, влияющих на ИР проведен анализ с использованием MANOVA. Установлена достоверная зависимость наблюдаемых переменных (химических, биоиндикационных и токсикологических откликов) от изучаемых факторов и ее

снижение в ряду: тип почвы (0.06) > вид загрязнения ТМ (0.14) > гуминовый продукт (сырьевой источник) > доза ГП (0.22) – в скобках лямбда-распределения Уилкиса, чем меньше ее значение, тем теснее связь переменных с фактором.

Таким образом, в первую очередь, наблюдаемые отклики и, как следствие, способность ГП к ремедиации определяются свойствами самой почвы, во вторую, - видом и количеством ТМ, а затем видом и дозой ГП. В связи с этим, стандартизовав почвенные свойства и дозу/вид загрязняющего вещества, мы можем проводить сравнительную оценку производимых гуминовых продуктов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено исследование ремедиационной способности гуминовых продуктов на образцах трех почв – агродерново-подзолистой, аллювиально-луговой и стандартной (в качестве референтной), подвергшихся загрязнению как в результате техногенной деятельности в природных условиях, так и в экспериментальных лабораторных условиях. Для всех почв показано изменение экологического состояния в категорию меньшей нарушенности (Пукальчик и др., 2015).

Проанализированы важные показатели, обеспечивающие устойчивое функционирование загрязненных тяжелыми металлами почв, их изменение при воздействии гуминовых продуктов, к которым относятся следующие: переход ТМ в сопредельные среды, обеспечение роста и развития высших растений, структурные и функциональные характеристики почвенного микробиома. Даны сравнительная оценка гуминовых продуктов в отношении их способности изменять почвенные характеристики по значениям индекса ремедиации – ИР.

Предложена методика расчета интегрального показателя ремедиационной эффективности гуминовых продуктов, которая включает химические, экотоксикологические и биоиндикационные почвенные показатели. Для определения степени ремедиационной активности ГП можно предложить градации, соответствующие кратности превышения измеряемых значений в опытном варианте над таковыми в контроле, и при значении ИР < 20 – определяют отсутствие способности к ремедиации загрязненной почвы, при значении 20 < ИР < 50 – среднюю активность, при значении 50 < ИР < 80 – высокую активность и при значении ИР > 80 – очень высокую активность.

Для оценки качества гуминовых продуктов, рекомендуемых для детоксикации почв, загрязненных тяжелыми металлами, целесообразно использовать индекс ремедиации - ИР, имеющий тесную связь с изменением подвижности ТМ, и экотоксикологическими показателями. Алгоритм первичной оценки гуминовых продуктов с целью сертификации должен включать исследования почвенных свойств по трем направлениям:

- химические – изменение подвижности ТМ (доступная для растений фракция, результат экстракции в ацетатно-аммонийном буфере);
 - биоиндикационные – респирометрические характеристики (анализ активности микробиома);
 - экотоксикологические – выживаемость гидробионтов и фитоэффект на рост корней проростков высших растений.

Универсальной почвенной матрицей для первичной оценки гуминовых продуктов может служить стандартная искусственная почва (по ISO 11268-2). Она является удобной в применении, постоянный состав обеспечивает воспроизводимые данные, измерения биологических и химических ее характеристик можно проводить круглогодично в контролируемых условиях. Для применения ГП на практике необходим выбор доз внесения в зависимости от степени загрязнения почв и природных почвенных характеристик.

ВЫВОДЫ

1. Гуминовые продукты (лигногумат, флексом, очищенные гуминовые кислоты, киргизский угольный) вызывают изменения химических, биоиндикационных и экотоксикологических свойств почв, загрязненных тяжелыми металлами, способствуя восстановлению изученных химических и биотических параметров на 23-100% в естественных почвах.

2. Экологическое состояние естественных почв, загрязненных тяжелыми металлами, судя по рассчитанному основе методологии ТРИАД индексу состояния (ИС) под воздействием гуминовых продуктов изменилось: агродерново-подзолистая почва из категории «нарушенная» перешла в категорию «слабо нарушенная» (0.48 до 0.27), аллювиально-луговая «сильно-нарушенная» в «нарушенная» (1.0 до 0.46).

3. Охарактеризован ремедиационный потенциал гуминовых продуктов в исследованных почвах. В частности, лигногумат снижает фитотоксичность тяжелых металлов в 2-3 раза; содержание водорастворимых и доступных для растений форм тяжелых металлов (%) – на 50-75 в аллювиально-луговой почве 40-50 в агродерново-подзолистой; до 20 – в искусственной стандартной почве (по ISO 11268-2); содержание углерода микробной биомассы в агродерново-подзолистой почве увеличивается в 3 раза, в сильно загрязненной аллювиально-луговой почве - на 14%.

4. Эффективность гуминовых продуктов можно ранжировать по значению индексов ремедиации. Так, в агродерново-подзолистой почве снижение эффективности наблюдалось в ряду (ИР): очищенные гуминовые кислоты (43) > флексом (39) > лигногумат (29).

5. Определена процедура расчета индекса ремедиации ИР как количественной характеристики гуминовых продуктов, необходимой для их сертификации, которая основана на свертывании информации об изменении показателей, обеспечивающих устойчивое функционирование почвенных ценозов. В программу сертификации целесообразно включать измерение следующих показателей почв до и после применения ремедиантов: анализ доступной для растений фракции токсикантов (экстракция ТМ ацетатно-аммонийным буфером); биоиндикацию базального дыхания и углерода микробной биомассы, биотестирование экологической токсичности по выживаемости тест-культур гидробионтов в почвенной вытяжке и по развитию проростков высших растений в почве.

**Список работ, опубликованных М.И. Пановой (Акуловой)
по теме диссертации**

**Научные статьи, опубликованные в журналах Scopus, WoS, RSCI, а также в
изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по
специальности 03.02.08 – Экология**

1. Pukalchik M., **Panova M.**, Karpuhin M., Yakimenko O., Kydralieva K., Terekhova V. Using humic products as amendments to restore Zn and Pb polluted soil: a case study using rapid screening phytotest endpoint // Journal of Soils and Sediments. — 2018. — V. 18. — № 3. — P. 750-761. IF=2,669.
2. **Panova M.I.**, Pukalchik M.A., Uchanov P.V., Terekhova V.A. Influence of Lead Nitrate and Acetate Applied to Sod-Podzolic Soil on its Bioindicative Parameters // Biology Bulletin. — 2018. — V.45. — № 10. — P. 1293-1300. IF=0,379.
3. Pukalchik M., Mercl F., **Panova M.**, Břendová K., Terekhova V., Tlustoš P. The improvement of multi-contaminated sandy loam soil chemical and biological properties by the biochar, wood ash, and humic substances amendments // Environmental Pollution. — 2017. — I. 229C. — P. 516-524. IF=4,358.
4. Пукальчик М.А., **Панова М.И.**, Терехова В.А., Якименко О.С., Федосеева Е.В. Действие гуминовых препаратов на активность почвенных ферментов в модельном опыте // Агрохимия. — 2017. — № 8. — С. 84-91. IF=0,642.
5. Терехова В.А., Иванова А.Е., **Акулова М.И.**, Пукальчик М.А., Федосеева Е.В., Якименко О.С., Шитиков В.К. Динамика структуры сообществ микроскопических грибов в почвах при химическом загрязнении и внесении гуминовых веществ // Агрохимия. — 2016. — № 4. — С. 85-91. IF=0,568.
6. Пукальчик М.А., Терехова В.А., Якименко О.С., **Акулова М.И.**. Сравнение ремедиационных эффектов биочара и лигногумата на почвы при полиметаллическом загрязнении // Теоретическая и прикладная экология. — 2016. — № 2. — С. 79-85. IF=0,258.
7. Кыдралиева К.А., Жоробекова Ш.Ж., Топильская О.М., **Акулова М.И.**, Терехова В.А. Экспериментальная характеристика ремедиационных свойств гуминовых препаратов разного генезиса по фону загрязнения почв медью // Теоретическая и прикладная экология. — 2015. — № 2. — С. 74-79. IF=0,261.
8. Pukalchik M.A., Terekhova V.A., Yakimenko O.S., Kydralieva K.A., **Akulova M.I.**. Triad Method for Assessing the Remediation Effectof Humic Preparations on Urbanozems // Eurasian Soil Science. — 2015. — V. 48. — № 6. — P. 654-663. IF=0,740.