

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Тольяттинский государственный университет»
Институт химии и инженерной экологии

Кафедра «Рациональное природопользование и ресурсосбережение»

18.04.01 Химическая технология

(код и наименование направления подготовки)

Экобиотехнология

(направленность)

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

на тему: **Проблема антропогенного зафосфачивания почв
и возможность их микробиологической ремедиации**

Студент

Е.А. Михайлюк

(И.О. Фамилия)

(личная подпись)

Научный
руководитель

Р.С. Галиев

(И.О. Фамилия)

(личная подпись)

Руководитель программы

д.т.н., доцент, С.В. Афанасьев

(ученая степень, звание, И.О. Фамилия)

(личная подпись)

« ____ » _____ 2017г.

Допустить к защите

Заведующий кафедрой

к.п.н., доцент, М.В. Кравцова

(ученая степень, звание, И.О. Фамилия)

(личная подпись)

« ____ » _____ 2017г.

Тольятти 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ПРОБЛЕМЕ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВ СОЕДИНЕНИЯМИ ФОСФОРА И СПОСОБАМ ИХ ВОССТАНОВЛЕНИЯ	10
1.1 Краткая история изучения фосфатного режима почв	10
1.2 Методы изучения фосфатного режима почв	13
1.3 Изменение фосфатного состояния почв под влиянием природных факторов	15
1.4 Изменение фосфатного состояния почв под влиянием антропогенных факторов	19
1.4.1 Источники техногенного загрязнения почв соединениями фосфора	19
1.4.2 Изменение фосфатного фонда почв при внесении фосфорных удобрений.	22
1.5 Связь фосфатного фонда почв с тяжелыми металлами	24
1.6 Деградация почв в результате антропогенного воздействия	27
1.7 Оценка глубины трансформации свойств почв при аномально высоком содержании фосфора	30
1.8 Методы биологической ремедиации антропогенно-зафосфаченных почв	40
1.8.1 Микроорганизмы-деструкторы соединений фосфора	43
1.8.2 Механизмы микробиологической деструкции соединений фосфора	46
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	48
2.1 Материал исследований	48
2.2 Методы исследований	50
2.2.1 Метод отбора проб	50
2.2.2 Методы микробиологического анализа почв	51

2.2.3 Методы химического анализа почв	57
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	60
ВЫВОДЫ	79
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	80
ПРИЛОЖЕНИЕ	91

ВВЕДЕНИЕ

Почвы являются аккумуляторами вредных веществ из атмосферы, сточных вод, бытовых и промышленных отходов. Биогеохимическим индикатором состояния почвенно-растительного покрова наряду с содержанием в нем техногенных поллютантов (нефтепродукты, тяжелые металлы) является и сбалансированное содержание биогенных элементов, таких как азот, калий, фосфор.

Фосфор – необходимый элемент питания, обеспечивающий энергетические процессы в клетках растений. Проблеме дефицита фосфорного питания растений и способам оптимального внесения фосфорных удобрений в почву посвящены многочисленные экспериментальные исследования и обзоры. Проблема избытка фосфора в почвах изучена очень слабо.

При экологическом мониторинге почв традиционно не устанавливается верхняя пороговая граница по запасу подвижных форм фосфора. Вместе с тем, анализ литературы по экологическим аспектам проблемы избыточного содержания фосфора свидетельствует о возможных сдвигах в функционировании почвенной системы. Нарушение ионного баланса при высоком содержании фосфорных соединений может ухудшать питание растений, усиливать токсичность почвы.

Антропогенным источником фосфора в городах служат выбросы промышленных предприятий, обогащенные крупно пылеватыми фракциями с высоким содержанием фосфатов, поверхностные стоки. Поступление соединений фосфора на поверхность почв возможно так же из промышленных и твердых бытовых отходов. В агропромышленных комплексах к зафосфачиванию почв может приводить длительное применение больших доз фосфорных удобрений.

В настоящее время в России функционирует 19 заводов по производству фосфорных удобрений и других соединений фосфора,

оказывающих негативное воздействие на окружающую среду в виде поступления в составляющие ландшафтов растворимых соединений фосфора, образованием значительного количества отходов и вредных выбросов. По данным исследований, существует проблема развития техногенных аномалий тяжелых металлов вокруг заводов по производству фосфорных удобрений.

Другим глобальным последствием зафосфачивания почв является эвтрофикация водных объектов. Соединения фосфора из загрязненных почв попадают в грунтовые и поверхностные воды. Эта проблема особо остро стоит для г.о. Тольятти.

Для ремедиации загрязненных территорий биологические технологии являются наиболее предпочтительными вследствие своей экологической безопасности, низкой себестоимости работ и достаточно высокой эффективности, что было неоднократно продемонстрировано при решении различных экологических задач. Поэтому очень важно изучение влияния загрязнителей на почвенную микрофлору. Данные исследования позволяют разрабатывать и внедрять в практику эффективные технологии биоремедиации почв.

Актуальность темы обусловлена следующим:

1. Согласно требованиям нормативно-правовой базы, окружающая среда не должна оказывать вредное воздействие на человека.
2. Увеличение антропогенной нагрузки на окружающую среду в результате загрязнения почв соединениями фосфора.
3. Избыточное содержание фосфора в почвах повышает их токсичность, влияет на накопление в них тяжелых металлов, приводит к эвтрофикации водоемов.
4. Проблема антропогенного зафосфачивания почв и связанные с ним изменения функционирования почвенной системы изучены слабо.
5. Исследование влияния повышенного содержания соединений фосфора на почвенную микрофлору необходимо для разработки наиболее

эффективных методов биоремедиации почвы.

Проблема исследования: необходимость снижения техногенной нагрузки на окружающую среду г.о. Тольятти за счет биоремедиации почв, загрязненных фосфорными соединениями на территории закрытого предприятия ОАО «Фосфор».

Цель диссертации: снижение уровня антропогенной нагрузки на окружающую среду за счет микробиологического восстановления почв, загрязненных фосфорными соединениями.

Объект исследования: почвы с территории ОАО «Фосфор», на которых расположены бывшие склады хранения ортофосфорной кислоты и гидрофосфата натрия.

Предмет исследования: процесс микробиологического восстановления почв, загрязненных фосфорными соединениями.

В соответствии с намеченной целью были поставлены следующие **задачи:**

1. Проанализировать состояние изученности проблемы антропогенного зафосфачивания почв.

2. Провести анализ существующих перспективных методов восстановления техногенно загрязненных почв.

3. Оценить экологическое состояние почвы с территории закрытого предприятия ОАО «Фосфор» по данным химического и микробиологического анализа почв.

4. На основе проведенных исследований разработать рекомендации по микробиологической ремедиации почв, загрязненных фосфорными соединениями.

Теоретической и методологической основой исследования послужили труды отечественных и зарубежных ученых по вопросам влияния аномально высоких концентраций биогенных элементов в почвах на почвенные микроорганизмы и изучению их микробной деструкции. Основу данного исследования составляют комплексный анализ и системный подход

в изучении рассматриваемой темы.

При проведении исследования и изложении материала были применены общенаучные методы: теоретико-методологический анализ литературных источников, эмпирические методы исследования в форме наблюдения, эксперимента, описания, измерения и сравнительно-сопоставительного анализа.

Применение указанных методов, а также анализ фактического материала позволил обеспечить объективность полученных выводов и результатов.

Научная новизна:

Впервые проведено исследование химического и микробиологического состояния почвы с территории прекратившего деятельность крупнейшего фосфорперерабатывающего предприятия бывшего СССР. Выявлены почвенные микроорганизмы, представляющие интерес для их использования в биотехнологиях по восстановлению антропогенно-загрязненных почв.

Теоретическая и практическая значимость выполнения проекта:

Результаты проведенного научного исследования имеют значение для оценки функционирования почвенной системы в условиях повышенной антропогенной нагрузки и возможности микробиологической ремедиации техногенно загрязненных почв.

Исследования в перспективе могут быть использованы в разработке эффективных биотехнологий по восстановлению загрязненных почв городов, агропромышленных комплексов, территорий химических предприятий.

Апробация работы.

Основные положения диссертационной работы были представлены на студенческой научно-практической конференции Волжского университета имени В.Н. Татищева в 2016 году.

Защищаемые положения:

1. Оценка экологического состояния почвы с территории закрытого

предприятия ОАО «Фосфор» по данным химического и микробиологического анализа.

2. Микробиологическая ремедиация почв, загрязненных соединениями фосфора.

Состояние изученности выбранной темы:

Исследования по содержанию фосфора и трансформации его соединений в почве имеют более чем вековую историю. Впервые по этому вопросу опубликованы материалы Вэй (Way, 1850), в России - П.А. Косычева (1881), К.К. Гедройца (1909), несколько позже А.В. Соколова, Ф.В. Чирикова, П.Г. Адерикина (1941, 1970), Д.А. Аскинази (1941), П.А. Дмитриенко (1948), И.Н. Чумаченко (1971), Ю.И. Касицкого (1982) и многих других ученых. Однако фундаментальные вопросы поведения фосфора в почвенной системе (миграция, мобилизация микроорганизмами и концентрация фосфора в почвах и растениях) все еще изучены недостаточно, многие теоретические и практические вопросы не решены.

Впервые понятие «зафосфачивание» почв было выдвинуто А.В. Соколовым в 1958г. при исследовании обогащенности почв подвижными фосфатами в результате длительного внесения фосфорных удобрений. Однако следует отметить, что до недавнего времени подавляющее большинство экспериментальных исследований и научных трудов было посвящено проблеме дефицита фосфорного питания растений и способам оптимального внесения фосфорных удобрений в почву. Проблема избытка фосфора в почвах, находящихся под антропогенной нагрузкой, изучена очень слабо.

Современными исследованиями, связанными с влиянием аномально высоких концентраций фосфора и его соединений на почвенную биоту и способностью почв к микробиологической ремедиации занимаются ученые В.А. Терехова, В.И. Титова, Л.Д. Варламова, Л.Ф. Попова, результаты их трудов нашли отражение в данной работе.

Структура диссертации обусловлена логикой и последовательностью изложения результатов решения задач исследования. Диссертация состоит из

введения, трех глав, заключения, библиографического списка, включающего 94 наименования. Объем работы составляет 90 страниц машинописного текста, содержит 13 рисунков, 9 таблиц, 2 приложения.

Научные статьи и материалы научных конференций:

1. Михайлюк Е.А. Проблема антропогенного зафосфачивания почв и возможность их микробиологической ремедиации // Материалы студенческих научно-практических конференций. – Тольятти: Волжский университет им. В.Н.Татищева, 2016. С. 147-150.

ГЛАВА 1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ПРОБЛЕМЕ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВ СОЕДИНЕНИЯМИ ФОСФОРА И СПОСОБАМ ИХ ВОССТАНОВЛЕНИЯ

1.1 Краткая история изучения фосфатного режима почв

На долю фосфора приходится 0,08% веса земной коры. По распространенности он занимает 13 место среди всех элементов.

Фосфор открыт Брандтом в 1669 году, его элементарную природу установил Лавуазье. Известно более 200 различных минералов, содержащих фосфор, из которых главнейшие: фторапатит CaPO_4 , трифилит $\text{Li}(\text{Fe},\text{Mn})\text{PO}_4$, фосфорит $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ [78].

По количеству реакций и форм, в виде которых находится в почве, фосфор является уникальным элементом. Исследования по трансформации его соединений имеют более чем вековую историю. Впервые по этому вопросу опубликованы материалы Вэй (Way, 1850), в России — П.А. Косычева (1881), К.К. Гедройца (1909), несколько позже А.В. Соколова, Ф.В. Чирикова, П.Г. Адерикина (1941, 1970), Д.А. Аскинази (1941), П.А. Дмитриенко (1948), И.Н. Чумаченко (1971), Ю.И. Касицкого, Б.С. Носко и многих, многих ученых, как в нашей стране, так и за ее пределами [1, 12, 34].

Вэй (Way, 1852) установлена поглотительная способность почв в отношении фосфатов. Варингтон (Warington, 1880) пытаясь найти причину поглощения фосфорной кислоты, установил, что в поглощении ее играют роль полуторные окислы (R_2O_3). Шумахер (Schumacher, 1867) и Эйхорн (Eichhorn, 1875) установили, что фосфорная кислота может поглощаться в почве гуминовой кислотой и ее солями [1, 35].

П.А. Костычев (1881) также отмечал, что поглощение фосфорной кислоты почвой происходит за счет извести. К.К. Гедройц (1918) поглощение фосфорной кислоты объяснял способностью ее образовывать труднорастворимые фосфаты с основаниями солей почвенного раствора [43].

Фосфор был обнаружен во всех органах зеленых растений: стеблях, корнях, листьях, но больше всего его в плодах и семенах. Растения накапливают фосфор и снабжают им животных и человека. Отсюда и возник всевозрастающий интерес к познанию химизма фосфора почвы и растений [80]. А.Л. Курсанов (1923) большое внимание уделил синтезу органических фосфатов корнями растений. Было установлено, что фосфор из двухзамещенного фосфата натрия в первые минуты после поглощения корнями на 30% превращается в органические вещества [34].

Во Всероссийском научно-исследовательском институте агрохимии имени Д.Н. Прянишникова (ВИУА) была проведена серия лабораторных и вегетационных опытов по оценке методов определения подвижных фосфатов в основных типах почв. С помощью радиоактивной метки Р и химических методов изучены запасы доступных фосфатов в основных типах почв и их подвижность, установлены взаимосвязи между их показателями.

Глубокие теоретические исследования (Чириков (1956), Мачигин (1952), Карпинский (1958), Кирсанов (1930)) позволили установить, что при рассмотрении минеральной части находящихся в почвенном растворе веществ их следует расчленить на анионы и катионы. Эти исследования позволили разработать методы определения доступного растениям фосфора [80].

Позже были разработаны различные методы определения подвижности питательных элементов почвы. Так, Н.П. Карпинским совместно с В.П. Замятиной для характеристики степени подвижности почвенных фосфатов (их уровня), в качестве показателя предложено количество фосфат-ионов в солевой вытяжке (0,03н K_2SO_4) [78].

Н.П. Карпинским, Н.М. Глазуновой, Л.П. Похлебкиной, М.Р. Наконечной установлены виды соединений почвенных фосфатов по величинам растворимости, разработано понятие о равновесии между фосфатами почвы и солевыми растворами, определены скорость перехода фосфат-ионов из почвы в раствор. Работы П.Г. Найдина (1953), С.С. Сигаркина (1956), Н.К. Болябо (1956), Л.С. Любарской (1961), И.Н. Чумаченко (1965) были посвящены

изучению изменения плодородия почв, их агрохимических свойств под действием фосфорных удобрений при длительном их применении [78].

Б.Г. Карноуховым (1946) было установлено, что фосфор поглощается в разных генетических горизонтах в различной степени, что связано с характером распределения карбонатов кальция. В сильнокарбонатных горизонтах (глубже 50 см) P_2O_5 поглощается значительно больше, чем в поверхностных слоях. И.С. Грабовским (1940) изучена динамика водорастворимых фосфатов в черноземах на парах и под культурами. Отмечено максимальное накопление фосфатов в поверхностном горизонте в весенний период. А.Г. Куделиной, А.С. Ивченко (1970) дана характеристика почв по содержанию валовых форм N, P, K [34].

Фракционный состав минеральных фосфатов черноземов Нижнего Дона изучены И.А. Полтавской, В.Д. Коваленко (1983). Установлено, что минеральные соединения фосфора представлены в основном фосфатами кальция различной основности, затем — фосфатами железа и алюминия. При этом содержание наиболее растворимых, кислых фосфатов Ca и Mg (одноосновных фосфатов Ca и Mg) в верхнем горизонте чернозема южного невысокое (5,2-12,6 мг $P_2O_5/100$ г) [78].

И.М. Шапошниковой, А.В. Лабынцевым (1998) на основании многолетних исследований изучен фосфатный режим обыкновенного мицелярно-карбонатного чернозема, динамика подвижных фосфатов и их распределение по горизонтам чернозема.

Впервые понятие «зафосфачивание» почв было выдвинуто А.В. Соколовым в 1958 г. при исследовании обогащенности почв подвижными фосфатами в результате длительного внесения фосфорных удобрений. Однако следует отметить, что до недавнего времени подавляющее большинство экспериментальных исследований и научных трудов было посвящено проблеме дефицита фосфорного питания растений и способам оптимального внесения фосфорных удобрений в почву. Проблема избытка фосфора в почвах, находящихся под антропогенной нагрузкой, изучена слабо [75].

Современными исследованиями, связанными с влиянием аномально

высоких концентраций фосфора и его соединений на почвенную биоту и способностью почв к микробиологической ремедиации занимаются ученые В.А. Терехова, В.И. Титова, Л.Д. Варламова, Л.Ф. Попова, А.Ю. Кудеярова, М.И. Макаров, И.Н. Чумаченко и др.

1.2 Методы изучения фосфатного режима почв

Фосфатный режим почв означает способность их снабжать растения фосфором. Растения поглощают фосфор в основном в форме ортофосфатов, содержащихся непосредственно в почвенном растворе. Большое количество форм фосфора в почве явилось причиной появления огромного количества методов определения и принципов интерпретации полученных результатов для характеристики фосфатного режима почв [44]. При изучении фосфорного режима почв определяют следующие показатели: содержание валового фосфора, общее содержание минеральных и органических фосфатов, минеральные формы фосфатов, подвижные соединения фосфатов, степень подвижности фосфатов, потенциальная буферная способность почв в отношении фосфатов [4].

Метод определения P_2O_5 в почве должен соответствовать этой почве. То, что конкретный метод является стандартным для данной почвы, к сожалению, не совсем гарантирует от ошибки, которая может достигать 100-500% и более. Такие свойства почв, как гранулометрический состав, количество соединений типа апатита, значения рН почвенного раствора в большинстве случаев влияют не столько на реальную обеспеченность почв фосфором, сколько на результаты количественного определения P_2O_5 при их химическом анализе. Большинство существующих методик совершенно недостаточно учитывают это влияние. Использование конкретного метода для анализа конкретной почвы, без учета ее генетических особенностей, ведет к нарушению важнейшего принципа любого исследования - принципа единственного различия. В результате картина часто искажена, поскольку знания о фосфатном состоянии почв во многом таковы, насколько это позволяют используемые методы [77].

При отборе образца почвы, его подготовке и проведении анализа необходимо строго придерживаться ГОСТов или прописей. При этом получаемые значения обязательно должны находиться в пределах допустимых отклонений от аттестованного значения стандартного образца почвы.

Среди методов определения минеральных фосфатов почвы широкое распространение получили методы Чирикова, Кирсанова, Чанга-Джексона и Гинзбург-Лебедевой. Они основаны на последовательной обработке навески почвы растворителями, каждый из которых извлекает определенные фракции минеральных фосфатов. Последний позволяет выделить наряду с фосфатами алюминия, железа три отдельные фракции фосфатов кальция, различающиеся по основности и степени окристаллизованности, а следовательно, по растворимости и доступности растениям. Метод позволяет извлечь 70-80% валового фосфора [80].

Идентификации индивидуальных органофосфатов в почвах посвящены многочисленные экспериментальные исследования. В результате в почве были обнаружены фосфолипиды, нуклеиновые кислоты, инозитолфосфаты, фосфопротеины и др. Количество обнаруженных соединений сильно варьирует, что может быть связано как с факторами почвообразования, так и с различиями в методических подходах. Присутствие атомов фосфора в любом соединении в почве можно обнаружить с помощью рентгеновского эмиссионного или пламенного спектра, инфракрасной спектроскопии, масс-спектрометрии. Применение метода ядерного магнитного резонанса для ядра фосфора в почвоведении открыло новые возможности в исследовании природы фосфора гумусовых соединений почвы. Этот прямой инструментальный метод значительно упростил процедуру идентификации отдельных групп органофосфатов, а иногда и отдельных индивидуальных соединений [39, 40].

Последующие исследования показали, что ^{31}P ЯМР может успешно использоваться для количественного определения минеральных и органических форм соединений фосфора в почвах формирующихся в разных экологических условиях, а также для оценки трансформации цикла фосфора

под воздействием антропогенных факторов [41].

Важной характеристикой состояния почвенных фосфатов является величина запасов подвижных его форм [80]. При оценке доступности почвенных фосфатов принято определять следующие показатели:

- 1) интенсивность - это степень подвижности почвенных фосфатов, выражаемая концентрацией фосфат-ионов в водных и слабосолевых вытяжках;
- 2) емкость показывает количественные единицы подвижного фосфора, способного переходить из твердой фазы в раствор;
- 3) скорость перехода фосфатов из твердой фазы в раствор, т.е. оценка фосфора при многократном экстрагировании солевыми растворами;
- 4) буферная емкость почв выражает способность почв противостоять изменению величины интенсивности при внесении фосфорсодержащих удобрений или выноса фосфора растениями из почвы или выноса фосфора растениями из почвы и удобрений [78].

Таким образом, методы определения обеспеченности почв фосфором основаны на анализе различного рода вытяжек. Однако, они часто оказываются недостаточно информативными, т.к. не позволяют учесть особенности почв, связанные с закреплением элементов. В последние годы для оценки фосфатного состояния почв стали определять термодинамические методы, позволяющие получать наиболее точные характеристики [80].

1.3 Изменение фосфатного состояния почв под влиянием природных факторов

Участвуя в общем круговороте химических элементов в природе, фосфор подчиняется определенным закономерностям и создает как бы свой собственный круговорот. Находясь первоначально в составе минеральной части природы, фосфор с возникновением живой материи входит в состав последней и в органической, а так же в минеральной форме закрепляется в почве. Мобилизуясь в результате химико-биологических процессов и поступая из почвы в растения при их развитии, фосфор одновременно вымывается из

некоторых почв с атмосферными осадками в грунтовые воды и выносятся из сферы почвы. Так он переходит из одной формы в другую, образуя свой круговорот в природе. В результате этого сложного процесса в большинстве почв создается дефицит в содержании фосфора [14].

Распределение продуктов выветривания горных пород на поверхности Земли происходит при участии различных природных факторов, сила которых была неодинаковой. Благодаря неравномерному распределению продуктов выветривания горных пород, а вместе с ними и фосфора на поверхности земного шара почвы, образовавшиеся впоследствии на этих породах, получили в «наследство» от материнских пород неодинаковое количество фосфора. Вследствие этого общее содержание фосфора в разных почвах сильно варьирует. Почвы, сформировавшиеся на разных породах неодинаковы по содержанию валового фосфора. Почвы глинистые значительно богаче фосфором, а суглинистые - супесчаных и песчаных [14].

Переход фосфатов в почвенный раствор из твердой фазы почвы зависит от целого ряда внешних и внутренних факторов: запаса всех форм природных фосфатов в соединениях разной степени прочности; емкости поглощения почв в отношении фосфат-ионов; условий влияющих на процесс трансформации фосфатов (температура, влажность, степень кислотности, катионный состав и т.д.); деятельности корневой системы растений и других факторов.

Процессы растворения — осаждения фосфатов зависят от многих факторов, в том числе присутствия катионов способных образовывать труднорастворимые соединения с фосфатами, а так же сорбционной способности почв. Существенную роль в сорбции фосфатов почв играет насыщенность почв ионами кальция, что особенно сильно проявляется в карбонатных почвах. Изучение сорбции фосфатов в зависимости от содержания гидроксидов железа и карбонатов показало, что роль карбонатов в сорбции фосфатов весьма мала по сравнению с гидроксидами железа, если в изучаемых почвах карбонаты обладают весьма низкой величиной удельной поверхности. Немалое значение имеет образование гуматных и гидроксильных

пленок на сорбционной поверхности, маскирующих активные центры, а так же общий уровень удельной поверхности [52]. Согласно исследованиям К.Е. Гинзбург (1981), большое влияние на сорбцию фосфатов оказывают подвижные соединения алюминия и железа, особенно аморфные, и уровень содержания органического вещества [12].

По данным различных авторов уровни содержания фосфат-ионов в почвенных растворах и почвенных вытяжках при неодинаковом составе почв контролируются различными соединениями.

По П.Н. Кошелькову (1940) органические фосфаты более подвижны и могут глубже проникать в почву. Благодаря извлечению P_2O_5 растениями из нижних горизонтов, минерализации в дальнейшем растительных остатков и слабой способности образовавшихся фосфатов к передвижению, фосфаты накапливаются в верхних горизонтах [78].

Коллоиды гумуса поглощают фосфорную кислоту химически и физически. Поглощение P_2O_5 гумусом значительно ниже, чем полуторными окислами и щелочноземельными основаниями, в связи с чем, увеличение гумуса в почве уменьшает поглотительную способность почв [40].

Оксид кремния (SiO_2) - наиболее распространенное соединение в земной коре и многих неметаллических минералах. Например, в апатитах и фосфоритах, наряду с фосфором, содержится большое количество кремния (21-28% Si). Исследованиями подтверждено, что кремний усиливает подвижность фосфора в почвах, повышает растворимость труднодоступных соединений фосфора и улучшает фосфорный обмен в растениях.

Влажность почвы оказывает сильное влияние на мобилизацию фосфорной кислоты в черноземах и с увеличением ее повышается количество водорастворимой P_2O_5 . Ее влияние усиливается тем, что при оптимальном увлажнении почв и при наличии достаточного количества тепла создаются наиболее благоприятные условия для микробиологических процессов (процессы гумификации, нитрификации, сульфуризации), в результате которых образуются кислоты, усиливающие растворимость фосфорной кислоты в почве.

Отсюда вытекает практический вывод, что накопление влаги в почве, а затем сохранение и разумное расходование будет создавать благоприятные условия для мобилизации фосфорной кислоты в черноземах и других почвах южных широт [1].

Среди факторов, являющихся специфическими для засушливых зон, оказывающих влияние на фосфатный режим почв, следует отметить высокие летние температуры, которые приводят, с одной стороны к иссушению поверхностного слоя почвы, с другой - к сильному его прогреву. Из работ К.С. Гедройца, Н.А. Лебедянцева и А.Н. Ахромейко известно, что высушивание почвы увеличивает подвижность фосфатов, органического вещества и уменьшает дисперсность почвы [80].

Температура играет роль фактора, ускоряющего или замедляющего химические и физико-химические реакции, непосредственно связанные с явлениями поглощения. Она оказывает влияние на коагуляцию и пептизацию почвенных коллоидов, имеющих прямое отношение к явлениям поглощения, и на скорость микробиологических процессов, вызывающих в данном случае ускорение или замедление процесса поглощения фосфора почвами. Согласно данным П.Г. Адерикина (1970), повышение температуры почвы ускоряет процесс поглощения фосфатов. Повышение температуры почвы в присутствии избыточного количества воды вызывает увеличение дисперсности почвы, ее пылевато-иловатых частиц. Это в свою очередь, увеличивает общую поверхность почвенных твердых частиц и их поверхностную энергию, отчего поглотительная способность возрастает [1].

На поглощение фосфорной кислоты оказывают влияние структура почвы и ее гранулометрический состав. Обыкновенный чернозем в зависимости от структурного состояния обладает различной энергией поглощения в отношении P_2O_5 . Наиболее энергично фосфаты поглощаются обыкновенным черноземом с распыленной структурой и менее энергично - с естественной нераспыленной структурой. Различные структурные фракции обыкновенного чернозема так же неодинаково энергично поглощают фосфорную кислоту. Микроструктурные

агрегаты поглощают ее в большем количестве, чем крупные структурные агрегаты. Больше всего фосфора поглощает фракция с размером агрегатов меньше 0,25мм, значительно меньше фракция с размером агрегатов 1,0-2,5мм и еще меньше - зернистая фракция с размером агрегатов 2,5-3,0мм. Таким образом, разрушение структуры искусственным путем или неправильной механической обработкой влечет за собой увеличение поглощения фосфатов почвами [41].

1.4 Изменение фосфатного состояния почв под влиянием антропогенных факторов

Концентрация фосфора в почвах — один из «наиболее твердых и устойчивых признаков, отличающих почвы от материнской горной породы» и определяющих ее основное и специфическое свойство-плодородие. Возникает необходимость изучения фосфатного состояния почв под воздействием постоянно меняющихся природных и антропогенных факторов.

Человек, вмешиваясь в природное равновесное состояние режимов почв и условий их почвообразования, может частично изменить характерные признаки каждой почвы или радикально преобразовать их. Степень этих преобразований зависит от природных свойств почв в целом или от каждого признака в отдельности, а также от интенсивности воздействия на них. Известно, что антропогенные факторы могут при сильном и долгосрочном действии привести к появлению новых подтипов и даже типов почв.

Увеличение содержания фосфора в природных объектах привело к эвтрофированию водных объектов. Установлено, что на 1кг поступившего в водоем фосфора образуется 100кг фитопланктона. Когда концентрация фосфора выше 0,01 мг/л, начинается массовое развитие водорослей [67].

1.4.1 Источники техногенного загрязнения почв соединениями фосфора

В настоящее время четко просматривается новый процесс

антропогенного происхождения – фосфотизация почв, связанный с возрастанием соединений фосфора в окружающей среде. Этот процесс протекает неравномерно и наиболее активно наблюдается на территории крупных городов и промышленных районов. При оценке загрязнения почв соединениями фосфора важно знать антропогенные и техногенные пути их поступления.

Антропогенные поступления соединений фосфора составляют значительную часть в общем балансе фосфора в почвах. По данным исследований содержание в городских почвах содержание фосфат-ионов может достигать значений близких к 6000 мг P_2O_5 /кг почвы, что свидетельствует об их антропогенном зафосфачивании [60]. При этом, специальных эколого-токсикологических исследований опасности высоких и сверхвысоких ($P_2O_5 > 700$ мг/кг) для почвенной биоты и растений крайне мало.

Антропогенным источником фосфора в городах служат выбросы промышленных предприятий, обогащенные крупно пылеватыми фракциями с высоким содержанием фосфатов, поверхностные стоки. Поступление соединений фосфора на поверхность почв возможно так же из промышленных и твердых бытовых отходов. Основные загрязнители – фосфаты щелочных металлов и аммония; $MgHPO_4$, $CaHPO_4$, $Mg_3(PO_4)_2$, $Ca_3(PO_4)_2$, $AlPO_4$, фосфориты и апатиты [52]. В агропромышленных комплексах к зафосфачиванию почв может приводить длительное применение больших доз фосфорных удобрений.

Деградация окружающей среды особенно проявляется в местах концентрации промышленных предприятий, а сами промышленные регионы превращаются в очаговые зоны глубоких изменений в литосфере и биосфере.

В России функционирует 19 заводов по производству фосфорных удобрений и других соединений фосфора. В настоящее время актуальны проблемы экологии, связанные с взаимодействием фосфорного предприятия с окружающей средой, с распространением растворимых соединений

фосфора, образованием значительного количества отходов и вредных выбросов. Как отмечено, в пятикилометровой зоне влияния предприятий, выпускающих фосфор и фосфорные удобрения, концентрация фосфора и тяжелых металлов в почвах превышают фон в 5-45 раз [15]. Под воздействием таких техногенных нагрузок на биосферу наблюдается угнетение почвенной микрофлоры и растительности. По качественному составу и вредности выбросов предприятия фосфорного производства относятся к промышленным производствам, имеющим выбросы в атмосферу газов или аспирационного воздуха, содержащие канцерогенные и ядовитые вещества.

Известно, что электротермическое производство элементарного фосфора характеризуется образованием значительного количества газообразных вредных веществ в атмосфере и неорганизованных газовыделений, составляющих 20 - 25% от их общего количества. Источники неорганизованных выбросов очень разнообразны: хранилища фосфора, открытые склады сырья, шламонакопители, отвалы и т.п. Загрязняющие компоненты те же, что и в выбросах, предусмотренных технологией. Значительно образование вредных твердых и жидких отходов и промежуточных продуктов, занимающих промплощадки и т.д. Технологические условия получения термической фосфорной кислоты также характеризуется выделением вредных испарений, сточных вод, пастообразных и твердых отходов [57]. Все это служит источником техногенного загрязнения окружающей среды.

В основе приведенных неблагоприятных с экологической точки зрения причин техногенного загрязнения окружающей среды находятся недостатки исходного сырья, технологических процессов [26].

В фосфорном производстве образуется значительное количество сточных вод. Компоненты, входящие в их состав (фосфорная кислота, тяжелые металлы), очень токсичны, обладают высокой реакционной способностью, отрицательно воздействуют на биосферу, почву, гидросферу и

др., поэтому проблемы обезвреживания, утилизации и нейтрализации сточных вод актуальны.

Газообразные выбросы фосфорного производства содержат такие вредные компоненты, как фосфин, фосфор, пентаоксид фосфора и другие соединения. Известно, что существующие способы газоочистки на фосфорных предприятиях не обеспечивают снижение вредных выбросов ниже предельно допустимой концентрации. Улавливание и утилизация газообразных отходов - важная проблема в производстве фосфора [27].

Эффективное решение экологических проблем фосфорного производства заключается в выявлении причин загрязнения среды, их анализе, создании новых безотходных технологий и аппаратов, отвечающих требованиям экологии.

1.4.2 Изменение фосфатного фонда почв при внесении фосфорных удобрений

Негативное воздействие сельскохозяйственных предприятий на почвы связано в основном с нерациональным ведением сельскохозяйственного производства. Под нерациональностью в данном случае подразумевается как чрезмерный уровень нагрузки на агроэкосистему, являющийся результатом интенсивной системы земледелия, так и недостаточный уровень вложений, связанный со снижением применения минеральных и органических удобрений, химических мелиорантов, а также ухудшением качества обработки почв в результате известных экономических проблем в сельском хозяйстве. Как избыточный, так и недостаточный уровень вложений материальных и энергетических ресурсов в агроэкосистему ведет, в конечном итоге, к деградации почв: потере гумуса, ухудшению питательного, водного и воздушного режимов и т.д. [73].

Несмотря на то, что изучение трансформации фосфора удобрений в почвах началось еще в прошлом веке, внутрипочвенный цикл этого элемента во взаимосвязи всех противоположно направленных процессов изучен весьма слабо.

Исследователи, столкнувшись сразу же с явлением сильно выраженного абиогенного закрепления почвами водорастворимых фосфатов, пришли к заключению, что трансформация их идет в сторону образования труднорастворимых минеральных соединений [34].

Наряду с этим существуют и многочисленные экспериментальные данные, о том, что применение фосфорных удобрений приводит не просто к общему обогащению почв фосфатами, но и к значительному увеличению доли их легкоподвижных фракций. Отмечаемая при этом мобилизация почвенных фосфатных запасов указывает на изменение направленности иммобилизационно-мобилизационных равновесий в удобряемых почвах. В связи с этим целесообразным является сопряженное изучение интенсивности процессов иммобилизации и мобилизации в почвах с разными типами геохимических барьеров в зависимости от уровня нагрузки их фосфатами [29].

Используемые фосфорные удобрения представлены в основном наиболее легко усваиваемыми растениями суперфосфатом (смесь $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, CaHPO_4 , $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ и CaSO_4) и двойным суперфосфатом $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, а также аммофосом (смесь $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ и $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), нитроаммофосом (смесь $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, CaHPO_4 , NH_4NO_3 , KNO_3 и KCl) и др. С фосфорными удобрениями в почву попадают многочисленные токсичные элементы, малоподвижные в почвенной среде (As, Ni, Cu, Cd, Pb, Cr, Zn,). Кроме того, в фосфорных удобрениях содержатся токсичные соединения фтора, примеси урана, радия, стронция [20]. Значительная часть фосфора кумулируется в водных объектах в результате потерь при транспортировке и хранении, из-за поверхностного стока и вымывания из почвы вследствие «выпадения» фосфора из аграрного круговорота.

При длительном применении удобрений происходит увеличение всех фосфорных соединений, но большим изменением в качественно и количественном отношении подвергается группа минеральных и органических соединений (фосфатов алюминия, железа, кальция). При внесении фосфорных удобрений в почву водорастворимые кальциевые фосфаты, как это

утверждалось многочисленными исследованиями переходят в трикальцийфосфат, фосфаты железа и алюминия [49].

Запасы органических фосфатов более стабильны. Вследствие большого увеличения минеральных фосфатов в ряде случаев наблюдается относительное уменьшение при внесении удобрений органических соединений фосфора [81].

Исследованиями А. В. Лабынцева, И.М. Шапошниковой (1999) установлено, что систематическое внесение в течение 24 лет 47.1кг фосфора с органо-минеральными удобрениями на 1га обеспечивает повышение содержания валового фосфора в пахотном слое почвы на 7%. Фракционный состав меняется в большей степени за счет увеличения фракций А1- Р и Fe - Р. Накопление фосфора в почве при равнозначных среднегодовых дозах удобрений тем больше, чем длительнее их внесение.

Это позволило А.В. Соколову (1958) выдвинуть понятие «зафосфачивание» почв, т.е. обогащение почв подвижными фосфатами в результате длительного внесения фосфорных удобрений [75].

1.5 Связь фосфатного фонда почв с тяжелыми металлами

К тяжелым металлам (ТМ) относят химические элементы с атомной массой свыше 50 а.е. (по другим источникам 40), обладающие свойствами металлов и металлоидов. Считается, что среди химических элементов тяжелые металлы являются наиболее токсичными. Согласно классификации Дж. Вуда (цит. по Ильину, 1991), к очень токсичным отнесены следующие химические элементы: Be, Co, Ni, Cu, Zn, Sn, As, Se, Te, Sb, Ag, Cd, Au, Hg, Pb, Bi, Pt. К группе тяжелых металлов отнесены Mn, Zn, Cu, Co, Mo широко известные как микроэлементы, высокая физиологическая значимость которых в процессах метаболизма не только научно доказана, но и применяется на практике, в сельском хозяйстве и медицине. Все дело в концентрации химического элемента в среде обитания: при дефиците его содержание для живых организмов он рассматривается как микроэлемент, при избытке — как тяжелый металл [52].

Избыточное содержание в среде обитания или в пище любого

химического элемента - нежелательный факт, поэтому правильнее говорить не о токсичных элементах, а о токсичных концентрациях (орлов). Среди тяжелых металлов приоритетными загрязнителями считаются ртуть, свинец кадмий, мышьяк, цинк, главным образом потому, что техногенное накопление их в окружающей среде идет высокими темпами. Эта группа веществ обладает высоким сродством к физиологически важным органическим соединениям и способна инактивировать последние. Их избыточное поступление в живые организмы нарушает процессы метаболизма, тормозит их рост и развитие [32].

Поступая в почву в больших количествах ТМ способны изменять многие ее свойства. Воздействие ТМ в первую очередь отражается на биологических и биохимических процессах в почве в результате чего может изменяться в ней содержание элементов минерального питания растений [31]. Влияние ТМ на содержание в почве фосфора и его формы изучен в настоящее время недостаточно.

Колесниковым СИ., Казеевым К.Ш., Коваленко В.Д. (1999) в условиях вегетационного опыта изучено влияние тяжелых металлов на содержание в черноземе обыкновенном карбонатном подвижных форм фосфора. Авторы отмечают, что подвижность фосфора в наибольшей степени снижал Zn [31]. Так же имеются данные о влиянии загрязнения почв цинком на увеличение активности фосфатаз, выделяемых микроорганизмами [8].

Загрязнение почва тяжелыми металлами в определенных случаях приводит к увеличению содержания доступных для растений форм азота и фосфора за счет усиления минерализации гумуса и мобилизации их из труднорастворимых минеральных форм фосфора. Действие тяжелых металлов зависит от природы самого металла, его содержания в почве, срока экспозиции.

Отсутствие прямой зависимости между содержанием тяжелых металлов в почве и ее токсичностью указывает на необходимость сопряженного изучения трансформации природных и техногенных соединений переходных металлов в связи с возможностью образования особенно токсичных для биоты продуктов. Согласно ранее проведенным исследованиям, направленность

иммобилизационно-мобилизационных равновесий для почвенных природных соединений металлов тесно связана с преобразованием органического вещества, которое может инициироваться свободными фосфат-анионами. А.Ю. Кудеяровой (1997) изучена степень иммобилизации цинка при разном уровне его содержания в серой лесной почве в связи с трансформацией почвенных гумусовых производных железа и фосфора. Показано, что фосфаты инициировали преобразование почвенных металлсодержащих соединений, тем самым способствуя увеличению степени связывания цинка. Установлено, что реакционная способность образующихся соединений и степень их токсичности для природной амилитической микрофлоры в большей мере определялись особенностями взаимодействия почвенных лигандов и гумусовой природы с орто- или пирофосфатами [34].

Взаимодействие фосфат-анионов с органо-минеральными соединениями происходит по механизму лигандных замещений [35]. Координация фосфатного лиганда к катиону переходного металла создает условия для межлигандных взаимодействий во внутренней сфере комплекса, что связано с трансформацией лигандов и изменением их реакционной способности. Наиболее характерным свойством почвы как биокостного природного образования является концентрирование фосфора в гумусе. По содержанию и реакционной способности органических соединений фосфора можно судить о степени направленности трансформации гумусовых кислот почвы, выступающих в роли макролигандов по отношению к металлам.

Естественное содержание свинца в почвах наследуется от материнских пород. Однако из-за широкомасштабного загрязнения среды свинцом большинство почв обогащено этим элементом, особенно их верхние горизонты. Хотя формы накопления свинца в разных типах почв могут существенно различаться, по ряду данных можно заключить, что РЬ ассоциируется, главным образом, с глинистыми минералами, оксидами Мп, гидроксидами Fe и Al и органическим веществом. Однако в некоторых почвах свинец может концентрироваться в частицах карбоната Са или в фосфорных конкрециях.

Растворимость свинца может быть сильно понижена известкованием. При высоких рН РЬ будет осаждаться в почве в виде гидроксида, фосфата, карбоната; эти же условия способствуют образованию свинец-органических комплексов [20].

Благоприятный режим фосфора понижает токсическое действие РЬ. Это взаимодействие - следствие особенности свинца к образованию нерастворимых фосфатов в растительных тканях и почвах.

Анионы, присутствующие в почвенном растворе (H_2PO_4^- , OH^-), могут не только уменьшать растворимость тяжелых металлов, образуя с ними осадки, но и увеличивать растворимость тяжелых металлов, связывая их в растворимые комплексы. Роль неорганических лигандов в комплексообразовании с тяжелыми металлами заметно проявляется только при высоких значениях рН, когда начинают преобладать реакции достаточно-прочных гидроксо-карбонатных комплексов тяжелых металлов [13].

Особенности трансформации оксидов тяжелых металлов обуславливаются тем, что с одной стороны следует ожидать увеличения растворимости оксидов за счет комплексообразования тяжелых металлов с неорганическими и органическими лигандами, а с другой - их растворимость может уменьшиться вследствие образования менее растворимых соединений тяжелых металлов с некоторыми анионами, например с H_2PO_4^- [13].

Практически все фосфат-ионы связываются с катионами металлов в наименее растворимые соединения тяжелых металлов — фосфаты, но значительная часть тяжелых металлов в почвах остается в составе наиболее устойчивых в воде соединений - оксидов цинка, гидроксида (карбоната, гидрокарбоната) свинца и карбоната кадмия [13].

1.6 Деградация почв в результате антропогенного воздействия

Изменение свойств и уровня плодородия почв под влиянием антропогенных воздействий в разных природных зонах и регионах имеет весьма различные темпы и направленность, которые зависят от общих

почвенно-экологических условий территории; характера и интенсивности целенаправленных воздействий на почвенный покров с учетом особенностей его использования (системы обработки почвы, удобрения, различные виды мелиоративных мероприятий); характера и интенсивности нецеленаправленных (незапланированных) воздействий на почвенный покров (загрязнение почв промышленными выбросами, подъем грунтовых вод за счет недостатков в проектировании и строительстве оросительных каналов, вторичное засоление и другие виды воздействий) [75].

В связи с этим методика оценки антропогенного воздействия на почвы должна быть адекватна сложившейся ситуации. На этапе оценки полученных результатов можно оказаться в двух различных ситуациях. Первая соответствует случаю, когда в результате антропогенного воздействия происходит истощение почв, то есть дегумификация, снижение содержания элементов питания, увеличение плотности, ухудшение физико-химических свойств и другие процессы, сопровождающие снижение почвенного плодородия. Вторая ситуация характеризуется, напротив, увеличением содержания биогенных элементов в почве до аномально высоких количеств. Если в первом случае методика оценки глубины изменений более или менее разработана, то во втором случае задачу приходится решать в условиях недостатка научной и методической информации.

Разночтения начинаются с трактовки самого термина «деградация». Наиболее распространено следующее определение: «деградация почвы – это процесс ухудшения почвенных свойств и режимов, приводящий к снижению ее природно-хозяйственной значимости» [42]. Очень близкое определение дают Е.А. Панкова и А.Ф. Новикова (2000) [55]. В иностранной литературе чаще встречается следующее определение: «деградация почвы – это ухудшение свойств почв (преимущественно антропогенное) по сравнению с предшествующим или идеальным состоянием почвы» [86. 92]. М.И. Герасимова с соавторами (2000) считают, что «деградация почвы – это

изменение в функционировании почвенной системы, и/или в составе и строении твердой фазы, и/или регуляторной функции почв, имеющее результатом отклонение от экологической нормы и ухудшение параметров, важных для функционирования биоты и человека» [11]. Последнее определение значительно расширяет границы данного термина. Так, перенасыщение агроэкосистемы биогенными элементами, например, фосфором, далеко не всегда приводит к ухудшению природно-хозяйственной значимости, но является отклонением от экологической нормы, способным привести к серьезным нарушениям.

Официальным руководством по оценке деградации являются «Методические рекомендации по выявлению деградированных и загрязненных земель», разработанные Управлением охраны почв и земельных ресурсов Минприроды России и Управлением мониторинга земель и охраны почв Роскомзема при участии специалистов МСХА, Почвенного института им. В.В. Докучаева, Всероссийского НИИ фитопатологии, МГУ им. М.В. Ломоносова [42].

Данное руководство является первым нормативным документом, направленным на методическое обеспечение мероприятий по охране земельных ресурсов. С этой позиции его необходимость очевидна. В то же время оно содержит ряд спорных положений, которые препятствуют его практическому использованию. Основными проблемными моментами руководства являются выявление деградированных земель и определение степени деградации. Так, например, среди характеристик для определения степени деградации почв фигурирует такая, как уменьшение содержания подвижного фосфора в процентах от средней степени обеспеченности, причем нигде не разъясняется, что понимается под средней обеспеченностью.

В то же время существуют альтернативные разработки по определению степени деградации почв. Особый интерес представляет собой методика, предложенная В.В. Снакиным с соавт. (1995). В качестве

критериев деградации почв предлагается использовать, в основном, изменение показателей (кратность снижения или увеличения) по отношению к исходному или принимаемому за контроль состоянию почвы. За норму или эталон почвы при этом может быть использована однотипная условно ненарушенная почва или данные предшествующих исследований [65]. В связи с этим перспективным является разработка показателей и критериев деградации для каждой почвенно-климатической зоны, что требует проведения многочисленных системных исследований для формирования базы данных, позволяющих решить эту задачу.

По мнению Е.И. Королевой (2002) фактическая устойчивость почв к деградации по фосфору, а также ее степень, может быть оценена по изменению содержания минеральных форм (фракций фосфатов, связанных с кальцием и гидроксидами алюминия и железа разной основности), а также содержанием подвижных форм, принятых в агрохимической практике [33]. Так, например, несмотря на общий отрицательный баланс фосфора в последние десять лет, содержание подвижных форм данного элемента в почвах России практически не уменьшается, а в некоторых случаях даже увеличивается [82].

1.7 Оценка глубины трансформации свойств почв при аномально высоком содержании фосфора

При экологическом мониторинге почв традиционно не устанавливается верхняя пороговая граница по запасу подвижных форм фосфора (табл. 1).

Вместе с тем, анализ литературы по экологическим аспектам проблемы избыточного содержания фосфора свидетельствует о возможных сдвигах в функционировании почвенной системы. Нарушение ионного баланса при высоком содержании фосфорных соединений может ухудшать питание растений, усиливать токсичность почвы. Повышенные концентрации фосфора в почве могут блокировать поступление в растения калия, железа,

Таблица 1 - Обеспеченность почв по содержанию фосфора

Содержание фосфора, мгP₂O₅/кг почвы	Обеспеченность почв по содержанию фосфора
<20	очень низкая
20-70	низкая
70-150	средняя
150-230	повышенная
240-350	высокая
>350	очень высокая.

цинка, меди и других важнейших элементов питания. Сообщается о специфических эффектах фосфора, которые выражаются в повышении восприимчивости растительных клеток к возбудителям инфекции, в частности, к растительным вирусам [68].

Важным ограничением существующих методов определения степени деградации почв по фосфору является то, что они ориентированы исключительно на агроистощение, то есть на условия, в которых происходит снижение содержания элементов питания и гумуса. Между тем, в настоящее время происходит суммированная, практически необратимая аккумуляция соединений фосфора в зонах с высокой плотностью населения, что ведет к накоплению аномально высоких концентраций данных элементов в почвах этих зон. Аналогичный процесс протекает в зонах индустриального животноводства и птицеводства. В почвах этих районов концентрация подвижного фосфора может достигать 3000 мг/кг, что более чем в 10 раз превышает уровень, считающийся оптимальным [24, 74].

Опасность избыточной насыщенности экосистемы биогенными элементами особенно характерно для фосфора. В настоящее время последствия данного процесса оцениваются далеко не однозначно, поскольку они не всегда сопровождаются такими явными негативными моментами, как снижение урожайности сельскохозяйственных культур, ухудшение почвенных характеристик и режимов.

Однако, на наш взгляд, аномально высокие концентрации таких

биогенных элементов, как фосфор, являются индикатором экологического неблагополучия экосистемы в целом. При этом проявление негативных последствий прослеживается на следующих уровнях.

Биосферный уровень. Сырьевая база уникальных апатитовых месторождений на Кольском полуострове может обеспечить потребности производства фосфорных удобрений до 2025г. Кроме этого, имеется 250 месторождений фосфоритов, химическая переработка которых для производства растворимых фосфорных удобрений экономически нецелесообразна, но они могут быть использованы для производства фосфоритной муки. В целом, известные ныне мировые запасы месторождений фосфатов весьма ограничены и истощатся в течение 75-100 лет [2,30].

В результате в условиях исчерпаемости природных запасов элементов, например, фосфорного сырья, в обозримом будущем может остро встать проблема обеспечения фосфором пахотных почв. При этом аномально высокая аккумуляция его на одних площадях усугубит проблему дефицита на других. Кроме того, в общем случае, чем выше содержание данного элемента в почве, тем выше его непроизводительные потери. Таким образом, очень высокое концентрирование фосфора в районах техногенных аномалий приводит к повышенным потерям его из обменного фонда биогеохимического цикла и обостряет проблему обеспеченности почв данным элементом питания на других площадях.

Проблема фосфора в окружающей среде представляет повышенный интерес еще и в связи с атомарными особенностями данного элемента. Как отмечает А.Ю. Кудеярова, среди всех технофильных элементов фосфор заслуживает особого внимания вследствие электронной структуры его атома. В реакциях координации его роль не ограничивается вхождением в состав координируемых атомных группировок (лигандов). Атом фосфора способен выступать также в качестве координационного центра, что может приводить к образованию нетипичных для естественных почв соединений. Нетипичные

для естественных наземных экосистем соединения, образующиеся в результате фосфатизации земель, могут вызывать в них изменения, направленность и потенциальную опасность которых оценить в настоящий момент сложно, так как знания о них явно недостаточны [34].

Экосистемный уровень. При оценке состояния экосистемы необходимо принимать во внимание сопредельные среды. Так, при увеличении содержания соединений фосфора в почве происходит увеличение интенсивности их выщелачивания в грунтовые воды и смыва в поверхностные воды. Результатом этих процессов является усиливающаяся эвтрофикация водоемов и ухудшение качества источников водоснабжения.

Так, известно, что подвижные соединения фосфора слабо удерживаются в поглощающем комплексе почвы и интенсивно вымываются в грунтовые воды. Состав же подземных вод очень важен для обеспечения жизнедеятельности человека, т.к. они часто являются источниками централизованного и нецентрализованного водоснабжения [75].

Популяционный (фитоценотический) уровень. В отдельных случаях наблюдается негативное влияние гипервысокого содержания биогенных элементов в почве на урожайность сельскохозяйственных культур. Так, рядом исследований установлено, что при определенном накоплении фосфора в тканях растений отмечается резкое снижение прироста биомассы [38].

Кроме того, при одностороннем обогащении почв тем или иным элементом может наблюдаться нарушение баланса элементов питания за счет антогонизма ионов, перевода дефицитных элементов в недоступное растениям состояние при воздействии элемента, находящегося в избытке и другие процессы, негативно влияющие на рост и развитие растений.

Все вышеизложенное позволяет говорить о необходимости разработки системы оценки изменений почвенных свойств под воздействием антропогенного фактора в районах с интенсивным накоплением биогенных элементов в почве, особенно фосфора.

Нормирование содержания биогенных элементов в почве является относительно новым направлением в природоохранной практике. Результатом данных работ явилась разработка предельно допустимых концентраций химических элементов и соединений, применяемых в качестве агрохимикатов. Среди таких нормативов можно назвать ПДК суперфосфата ($200 \text{ мг P}_2\text{O}_5/\text{кг}$) в почве [64].

В то же время существуют серьезные препятствия к их применению в практической работе. Это связано с тем, что при разработке нормативов по содержанию биогенных элементов в почве применялся стандартный токсикологический подход, при котором в экспериментах использовался песчаный субстрат с минимальным природным содержанием фосфора и низкой поглотительной способностью. При оценке изменения содержания подвижного фосфора в почве, на наш взгляд, целесообразно воспользоваться предложенным ранее принципом сравнения фактического содержания элемента в почве с фоновым. При этом по кратности увеличения судить о глубине воздействия и опасности данного процесса.

В литературе имеются сведения о допустимости той или иной нагрузки почв аномально высокими дозами фосфатов. Так, например, верхним допустимым уровнем нагрузки кислых почв техногенными фосфатами Ю.А. Кудеярова (1995) называет прирост общего содержания фосфора в почве по сравнению с природным на 10–30 %. Ю.И. Касицкий (1998, 1991) предложил считать содержание подвижного фосфора в дерново-подзолистых почвах выше 300 мг/кг недопустимо высоким. По мнению С.Н. Адрианова и Б.А. Сушеницы (2004) для севооборотов средней интенсивности (12-25 % пропашных культур) в дерново-подзолистых почвах при pH 5,6-6,0 оптимальное содержание подвижных фосфатов (P_2O_5 по Кирсанову) находится в пределах 160-230 мг/кг [75]. Однако, по мнению ряда других авторов, оптимальное содержание подвижных форм фосфора в дерново-подзолистой почве может лежать в интервале 300-700 мг/кг [19, 38], а по мнению И.А. Иванова (2004) может достигать 1311 мг/кг [23]. Такой

разброс значений обусловлен, прежде всего, региональными особенностями и особенностями выращиваемых культур и севооборотов.

Кроме того, при определении оптимальных значений содержания элемента почва рассматривалась исключительно как средство сельскохозяйственного производства, а не как составная часть экосистемы.

Проведенные И.В. Титовой., Е.В. Дабаховой, М.В. Дабаховым (2004) исследования и наблюдения в производственных условиях на почвах с аномально высоким содержанием подвижных форм фосфора, показали, что даже при более высоком, чем на 40%, превышении фактического содержания от верхней границы оптимального, не происходит снижения урожайности сельскохозяйственных культур, хотя, по-видимому, имеет место нарушение баланса биогенных элементов в экосистеме. В связи с этим, по мнению И.В. Титовой., Е.В. Дабаховой и М.В. Дабахова, необходимо утверждение нового подхода к землепользованию, предполагающего переход от антропоцентристского мировоззрения к природоохранному [74]. Следует учитывать, что почва должна выполнять не только заданные производственные и социальные функции, но и биосферные. Поэтому, аномальное увеличение содержания биогенного элемента в почве, даже не сопровождающееся снижением урожайности культур, необходимо трактовать как негативный процесс.

Так как увеличение содержания биогенных элементов в почве нельзя назвать деградацией, поскольку это расходится с общепринятой трактовкой этого слова, для характеристики данного негативного процесса И.В. Титова и соавторы (2004) предлагают использовать более общий термин – «техногенная трансформация», а для уточнения ведущего процесса трансформации при высокой аккумуляции фосфора в почве, связанной с антропогенной деятельностью, использовать термин «техногенная фосфатизация». При этом, по кратности увеличения содержания элемента в почве по отношению к фоновому (исходному) содержанию можно судить о степени трансформации. Учитывая наибольшую способность фосфора по

сравнению с другими биогенными элементами к аккумуляции и наибольшую напряженность, связанную с его присутствием в аномально высоких количествах в экосистеме, И.В. Титовой., Е.В. Дабаховой, М.В. Дабаховым (2004) было предложено в качестве диагностического показателя, характеризующего техногенную трансформацию почв, использовать содержание фосфора в почве, причем именно содержание его подвижных форм [74].

Градации для определения степени техногенной трансформации почвы, в частности фосфатизации, по кратности увеличения содержания подвижных форм фосфора представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Критерии техногенной фосфатизации почвы

Показатель трансформации	Степень трансформации				
	0	1	2	3	4
Кратность увеличения (содержание фосфора)	<1,5	1,5 – 2,5	2,6-5,0	5,1-10,0	>10,0

При этом по аналогии со степенью деградации почвы можно выделить следующие стадии ее трансформации:

- 0 – нетрансформированные почвы;
- 1 – слаботрансформированные почвы;
- 2 – среднетрансформированные почвы;
- 3 – сильнотрансформированные почвы;
- 4 – очень сильно трансформированные почвы.

В зависимости от степени трансформации необходимы следующие меры, позволяющие в большей или меньшей степени нормализовать обстановку в экосистеме:

1 степень (слабая трансформация) – установление источников воздействия, прогнозирование развития ситуации и осуществление

периодического контроля за динамикой диагностического показателя в почве и состоянием водоемов;

2 степень (средняя трансформация) – установление источников воздействия и разработка мероприятий, позволяющих частично снизить уровень воздействия, прогнозирование развития ситуации и осуществление постоянного контроля за динамикой диагностического показателя в почве и состоянием водоемов;

3 степень (сильная трансформация) – установление источников воздействия и их устранение, осуществление постоянного контроля за динамикой диагностического показателя в почве и состоянием водоемов;

4 степень (очень сильная трансформация) – установление источников воздействия и их устранение, разработка специальных мероприятий, позволяющих снизить непроизводительные потери фосфора из почвы, осуществление постоянного контроля за балансом фосфора в почве и состоянием водоемов.

Следует учитывать, что данные рекомендации пригодны лишь в том случае, когда конкретный источник воздействия можно идентифицировать и устранить. В основном, это касается случаев, когда источником избыточного количества фосфора в почве являются органические и минеральные удобрения, отходы производства. Если же процесс приурочен к техногенным аномалиям крупных городов, из вышеперечисленного может иметь место лишь разработка мероприятий, позволяющих снизить непроизводительные потери фосфора из почвы.

Вопрос о допустимости воздействия, то есть установлении предельного уровня содержания подвижных форм фосфора в почве, на современном этапе развития представлений о данном вопросе должен решаться методом экспертной оценки с учетом конкретных условий. В частности необходимо принимать во внимание почвенные и климатические условия, рельеф местности, ее гидрологический режим, наличие открытых водоемов и их объем, а также другие факторы.

При определении степени деградации (трансформации) почвы важным моментом является выбор фоновой почвы, по отношению к которой осуществляется оценка глубины антропогенного воздействия. Наиболее целесообразным, по нашему мнению, использовать в качестве фона образцы целинных почв (естественный фон). Этот фон может использоваться для изучения влияния всего комплекса антропогенных воздействий на исследуемую территорию без оценки вклада конкретных источников воздействия. При этом для определения естественного фона необходимо найти территорию, в наибольшей степени соответствующую по своим природным характеристикам исследуемому агроландшафту и, в то же время, не испытывающую техногенной нагрузки. Такие почвы, как правило, находятся в пределах особо охраняемых природных территорий.

Предлагаемый подход к оценке степени антропогенной трансформации почвы обладает существенным недостатком. Степень трансформации, будучи выраженной через кратность превышения фактического содержания над фоновым (оптимальным), не может служить основой комплексной количественной оценки, учитывающей и другие неблагоприятные изменения в свойствах почвы, например, увеличение содержания тяжелых металлов. Необходима система оценки, которая позволит, в конечном счете, интегрировать все показатели воедино и получить однозначную количественную оценку степени изменений, произошедших в свойствах почвы под влиянием антропогенной деятельности. Наиболее удобно результаты по отдельным показателям выражать в закрытой 100-бальной шкале, которая имеет широкое распространение и, в частности, в системе бонитировки почв [5, 54].

Для оценки степени техногенной фосфатизации почвы в 100-бальной шкале можно воспользоваться следующей формулой:

$$B = C_{\text{фон}}/C_x \cdot 100, \quad (1)$$

где:

Б – оценочный балл техногенной фосфатизации;

$C_{\text{фон}}$ – фоновое (оптимальное) содержание подвижного фосфора в почве, мг/кг;

C_x – фактическое содержание подвижного фосфора в почве, мг/кг.

Для прогнозирования развития ситуации в экосистеме и проведения конкретных мероприятий по улучшению деградированной или техногенно трансформированной, а также загрязненной почвы важно знать интенсивность протекания негативного процесса. Для характеристики скорости протекания процесса В.В. Снакин с соавторами (1992) предложил использовать величину периода деградации [65].

В заключение выше изложенного необходимо подчеркнуть:

- целесообразно рассмотреть сведения о многолетней динамике почвенных свойств, так как они позволяют более точно определить время действия деградационных процессов и показатели свойств недеградированной почвы;

- в качестве диагностического показателя, характеризующего техногенную трансформацию почвы, связанную с увеличением концентрации биогенных элементов до аномально высоких количеств, целесообразно использовать содержание подвижных форм фосфора в почве;

- оценку глубины произошедших изменений следует проводить с учетом степени деградации (техногенной трансформации) почвы, представляющей из себя оценку кратности увеличения значения рассматриваемого показателя по отношению к фоновому;

- для возможности получения интегрального показателя, характеризующего экологическое состояние почвы, результаты оценки техногенной фосфатизации целесообразно представлять в закрытой 100-балльной шкале.

1.8 Методы биологической ремедиации антропогенно-зафосфаченных почв

Развитие промышленности и рост площади городов в последнее столетие привело к полной деградации значительных площадей почвенного покрова планеты. Учитывая важную экологическую роль почвы в поддержании основных параметров биосферы и атмосферы, подобные разрушительные тенденции не могут оставаться без внимания. Неудивительно, что изучение условий устойчивого функционирования почвенных экосистем, а также поиск эффективных технологий обработки пахотных и ремедиации антропогенно-нарушенных почв становится одним из центральных направлений исследований большинства экологических научных школ. Причем в научном поиске все большее внимание начинают уделять развитию биологических методов рекультивации, основанных на использовании и стимулировании потенциала самой почвы, ее способности к самовосстановлению [84, 93].

Для ремедиации загрязненных территорий биологические технологии являются наиболее предпочтительными вследствие своей экологической безопасности, низкой себестоимости работ и достаточно высокой эффективности, что было неоднократно продемонстрировано при решении различных экологических задач [67]. Поэтому разработка и внедрение в практику эффективных технологий биоремедиации почв, загрязненных токсичными химическими соединениями, крайне актуальна.

В последние десятилетия большое распространение получили способы биоремедиации земель, при которых загрязненную почву собирают экскаватором и загружают в специальные установки различных типов, где ее перемешивают с суспензией микроорганизмов. Почву подвергают периодическому перемешиванию и рыхлению для активизации аэробных и анаэробных процессов очистки. Микроорганизмы, способные удерживать фосфаты, в частности полифосфат-аккумулирующие микроорганизмы, поглощают больше фосфора, чем обычно, и запасают его в клетках. Далее

биомассу микроорганизмов возможно использовать в сельском хозяйстве при недостатке фосфатов в почве [56].

Но наиболее перспективно направление работ, при котором очистку почвы от фосфорных загрязнений проводят на месте, без снятия грунта – «*in situ*». Главным преимуществом обработки *in situ* является то, что она позволяет обрабатывать почву без ее извлечения и транспортировки, что потенциально приводит к значительному снижению расходов. Однако обработка *in situ*, как правило, требует большего времени и имеется меньше уверенности в единообразии обработки из-за изменчивости свойств почвы и водоносного горизонта, а также потому, что эффективность процесса более трудно проверить. Технологии биовосстановления являются технологиями разрушения, целью которых является стимулирование роста микроорганизмов и использование загрязнителей в качестве источника пищи и энергии при создании благоприятной среды для микроорганизмов. В общем, это означает создание (подачу) некоторой комбинации кислорода, питательных веществ и воды, а также контроль температуры и pH [21].

При кажущейся простоте решения данной задачи возникает ряд трудностей. Во-первых, необходимо выделить технологичные (пригодные для промышленного использования и безопасные для людей) микроорганизмы; во-вторых, подобрать условия их культивирования; в-третьих, необходимо правильно выбрать время, метод и дозу внесения биодеструкторов в почву. Кроме всего вышеперечисленного, необходим контроль за интегральной токсичностью почвы с целью гарантии безопасности продуктов деструкции поллютантов и достаточной степени очистки почвы.

Самым эффективным способом поиска микроорганизмов-деструкторов является выделение микробных сообществ из природных почв, длительное время загрязняемых сельскохозяйственными удобрениями или промышленными отходами аналогичного состава. В ходе длительной, многолетней эволюции микроорганизмы, находящиеся в почве, постепенно

приспосабливаются к наличию этих токсикантов в их среде обитания [21].

Можно выделить следующие этапы естественной селекции микроорганизмов-деструкторов в почвах, длительное время загрязняемых ядохимикатами:

1. Появление некоторых микроорганизмов ферментов (оксидазного типа), защищающих микробную клетку от воздействия токсикантов.

2. Появление способности утилизировать (разлагать) эти вещества и использовать полученную энергию для обеспечения своей жизнедеятельности.

3. Постепенное генетическое закрепление признака деградирующей способности в отношении токсичных соединений (способность наследования и передачи новому поколению).

Несмотря на высокую скорость размножения микроорганизмов, эти процессы в почве занимают десятилетия.

Таким образом, методологически наиболее целесообразно исследовать образцы почв на территориях старых складов химикатов, промышленных предприятий по производству фосфорных удобрений и других соединений фосфора.

Однако даже поверхностный анализ наиболее широко используемых методов свидетельствует о доминировании формального, механистического подхода к почве при разработке данных технологий. В частности, при биоремедиации нефтезагрязненных почв технологическая схема, как правило, сводится к простому рытлению и использованию бактериальных препаратов по фону внесения весьма высоких доз минеральных удобрений [70]. Подобная практика часто приводит к еще большему ухудшению ситуации: засеянный многолетними травами участок в первый год дает дружные всходы, однако восстановления исходного фитоценоза часто так и не происходит, и в почве неизбежно запускаются механизмы ее медленной деградации. Не лучше обстоит дело и с разнообразными почвозащитными технологиями в сфере аграрного производства, основанными на применении

биологически активных органических удобрений [71].

Причина краткосрочности эффектов обусловлена отсутствием четких представлений об основных принципах функционирования микробного сообщества почвы. В последнее время формируется новое представление о популяции микроорганизмов не просто как о сумме клеток, вписанных в условия конкретной экологической ниши, а как о своеобразной надорганизменной системе, в определённом отношении аналогичной многоклеточному организму, адаптация которого к экстремальным внешним условиям представляет собой совокупность весьма сложных и специфических реакций. С теоретической и практической точек зрения чрезвычайно важно определить ключевые, экологически наиболее значимые группы микроорганизмов, запускающие данные реакции, определяющие их направленность, скорость и в конечном итоге эффективность биоремедиации [70].

1.8.1 Микроорганизмы-деструкторы соединений фосфора

В почве фосфор встречается в форме органических соединений (фитин, глицерофосфат, остатки нуклеиновых кислот и других соединений), а также в виде труднорастворимых неорганических его соединений. Содержание фосфора в органических соединениях почвы достигает 25-85% от его общего количества. От 15 до 75% фосфора почвы находится в форме труднорастворимых неорганических соединений: фосфата кальция, железа, алюминия и других металлов [35].

Несмотря на высокое общее содержание фосфора, в почвах он преимущественно находится в малоподвижных формах. Степень его использования растениями из почвы составляет лишь 3-5%.

Мобилизовать фосфор из тяжелодоступных соединений железа, алюминия и кальция способны микроорганизмы-деструкторы многих видов. Они широко распространены в агроэкосистемах. Активностью мобилизации фосфата из тяжелорастворимых соединений характеризуются

микроорганизмы родов *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Bacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, сульфатовостанавливающие бактерии рода *Desulfobacterium*, везикулярно-арбускулярные микоризные грибы [9].

Показано, что при нейтральных значений pH труднорастворимый фосфат кальция практически не растворяется. В кислом буферном растворе растворимость $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ существенно повышается со снижением pH и достигает максимальных значений при pH 5,0. Таким образом, накопление ионов фосфата в культуральной жидкости в случае роста бактерий рода *Bacillus* и *Pseudomonas* в среде, содержащей труднорастворимый фосфат кальция, обусловлено способностью данного соединения растворяться в кислой среде [17].

Вероятно, такой механизм имеет важное значение в случае роста в средах с труднорастворимыми фосфатсодержащими неорганическими соединениями азотфиксирующих микроорганизмов рода *Azotobacter* и *Agrobacterium*. Так, культивирования бактерий *A. chroococcum*, *A. vinelandii* в среде Эшби и *A. radiobacter* на гороховом отваре $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ приводит к увеличению количества клеток на 3-4 порядка. Имеющиеся в литературе данные позволяют предположить, что мобилизация фосфора из труднодоступного фосфата кальция осуществляется на поверхности клеток этих микроорганизмов и обусловлена контактным взаимодействием этого минерала с кислыми зонами гликокаликса. Это способствует растворению фосфата кальция и удовлетворению потребности бактерий в фосфорном питании [83]. Способность бактерий *Azotobacter* мобилизовать фосфор из труднодоступных неорганических соединений описаны и многими авторами.

Для улучшения фосфорного питания пшеницы предложено применять грибы *Penicillium radicum*, выделенных из ризосферы этих растений и характеризуются высокой активностью мобилизации фосфора из труднодоступных неорганических соединений. Растворение фосфорсодержащих веществ этим микроскопическим грибом авторы

связывают с секрецией ими глюконовой кислоты, что снижает pH, или с образованием хелатных соединений. Мобилизовать фосфор из труднорастворимого фосфата кальция способны микровицы рода *Trichoderma*, их фосфатмобилизующая активность составляет около 70% показателей *Bacillus megaterium* subsp [50].

В почве распространены микровицы, которые способны мобилизовать фосфор с органических соединений. Значительная роль в этом процессе принадлежит спорообразующим бактериям рода *Bacillus*. Органические соединения фосфора способны разлагать бактерии родов *Pseudomonas*, микровицы родов *Aspergillus*, *Phizopus*, *Trichotecium*, *Alternaria*, дрожжи *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*. Это достигается благодаря способности микровиц синтезировать фосфатазы [9].

Одним из наиболее распространенных природных органических источников фосфата является инозитол гексафосфат (фитин). Его содержание в почве может достигать до 50% от общего количества фосфора органических веществ. Фосфат из этих соединений микровицы мобилизуют благодаря активности фермента фитазы. Показано, что только 0,5% культураных популяций почвенных бактерий способны использовать инозитол гексафосфат как единственный источник фосфора и углерода и энергии. Такую способность имеют флюоресцентные бактерии [17].

Большинство из выделенных штаммов фосфатмобилизующих бактерий рода *Bacillus* способны расти в среде с фитином. Однако, наивысшей активностью отличаются *B. pumilus* и *B. pumilus*. Фитазы так же синтезируют микровицы различных таксономических групп: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli*, *Aspergillus terreus* и другие. Высокой фитазной активностью характеризуется микровица [36].

Способность минерализовать органические фосфорсодержащие вещества и растворять труднорастворимые неорганические его соединения

распространена среди микроскопических целлюлозоразрушающих грибов и актиномицетов. По снижению активности этих процессов целлюлозоразрушающие микроорганизмы можно разместить в такой последовательности: актиномицеты, грибы, целлюлозоразрушающие бактерии. Таким образом, это свидетельствует о важной роли целлюлозоразрушителей грибов и актиномицетов в трансформации тяжелодоступных для растений органических и неорганических соединений фосфора [17].

1.8.2 Механизмы микробиологической деструкции соединений фосфора

Выяснение механизмов поглощения и резервирования соединений фосфора клетками является одной из актуальных задач современной биохимии микроорганизмов. Изучение способности микроорганизмов к накоплению этого важного компонента представляет интерес с точки зрения понимания того, как происходит их приспособление к изменяющимся условиям окружающей среды, в том числе и к выживанию в средах с избыточным количеством фосфора.

Экспериментальный материал, собранный к настоящему времени, свидетельствует в пользу того, что накопление фосфора в клетках микроорганизмов в первую очередь связано с полифосфатами, полимерами ортофосфорной кислоты, которые обнаружены у многих микроорганизмов. Эти полимеры присутствуют в цитозоле, ядрах, периплазме, в вакуолях низших эукариот [37, 87, 89], а также в клеточной оболочке, мембранах и цитоплазме прокариот [90, 90].

Однако, в литературе известны и другие формы запасаения фосфора клетками микроорганизмов. Например, у микроскопических грибов фосфор может накапливаться в виде полимерного ортофосфата металлов [50], у некоторых бактерий роль резерва фосфата могут выполнять тейхоевые кислоты клеточной стенки [85], а у цианобактерий в качестве резерва

обнаружено накопление ортофосфатов [10, 76]. Также было показано, что некоторые бактерии, водоросли и простейшие могут накапливать пирофосфат [91, 94]. Таким образом, способы накопления фосфата могут весьма существенно отличаться у микроорганизмов, стоящих на различном уровне эволюции, а также обитающих в различных природных условиях. Знание того, в каких формах фосфат накапливается у микроорганизмов, является весьма важным с точки зрения его последующей утилизации.

Сравнительное изучение поглощения фосфата и его накопления в клетках микроорганизмов, относящихся к различным систематическим группам, представляет интерес как с точки зрения понимания эволюционных аспектов приспособления микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды обитания, так и с точки зрения поиска перспективных организмов для разработки биотехнологии очистки окружающей среды от избытка фосфатов.

В настоящее время процесс накопления фосфатов и обмен полифосфатов в наибольшей степени изучен у *Escherichia coli*, дрожжей [6] и обитающих в сточных водах бактерий рода *Acinetobacter* [6, 45, 48]. Значительное разнообразие фосфорного метаболизма у микроорганизмов делает актуальным расширение спектра объектов, у которых изучается эта проблема. Таким образом, изучение механизмов реализации способности к накоплению фосфатов у микроорганизмов, совершенно не изученных в этом отношении представляется актуальным как с точки зрения сравнительной биохимии, так и в свете решения биотехнологических задач.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Материалы исследования

Материалом для исследования последствий загрязнения фосфатами и способности почвенной микрофлоры к ремедиации послужили образцы почвы с территории ОАО «Фосфор» (ранее «Куйбышевфосфор») - предприятия химического комплекса СССР и России в городе Тольятти, функционировавшего с 1963 по 2003 год. За этот период площадь земель более 30га была загрязнена фосфорсодержащими отходами I - III классов опасности. По официальным данным, на территории «Фосфора» хранится 60 тонн угрожающих здоровью людей веществ, в том числе неутилизированные треххлористый фосфор и хлорокись фосфора. Завод являлся самым крупным предприятием в СССР по выпуску фосфора и его производных, а также единственным производителем жёлтого фосфора в РСФСР. На основе фосфора на заводе были организованы производства: фосфорных удобрений, жидких комплексных удобрений, фосфатирующих и моющих препаратов, ортофосфорной кислоты и других соединений фосфора.

Образцы почвы для лабораторных исследований отбирались с прилегающих территорий к бывшим помещениям ОАО «Фосфор» для хранения ортофосфорной кислоты и гидрофосфата натрия, расположенных по адресу: г. Тольятти, ул. Новозаводская, д.2а строение 128 (рис. 1). По типу данная почва относится к выщелочным черноземам. Точечные пробы были взяты из двух горизонтов методом конверта согласно ГОСТ 17.4.3.01-83.

При определении загрязнения почвы веществами, для которых отсутствуют ПДК или ОДК, сравнение уровней загрязнения проводится с естественными фоновыми уровнями. За фоновые содержания химических элементов и соединений в почве следует принимать их концентрации в почвах ландшафтов, не подвергающихся техногенному воздействию,

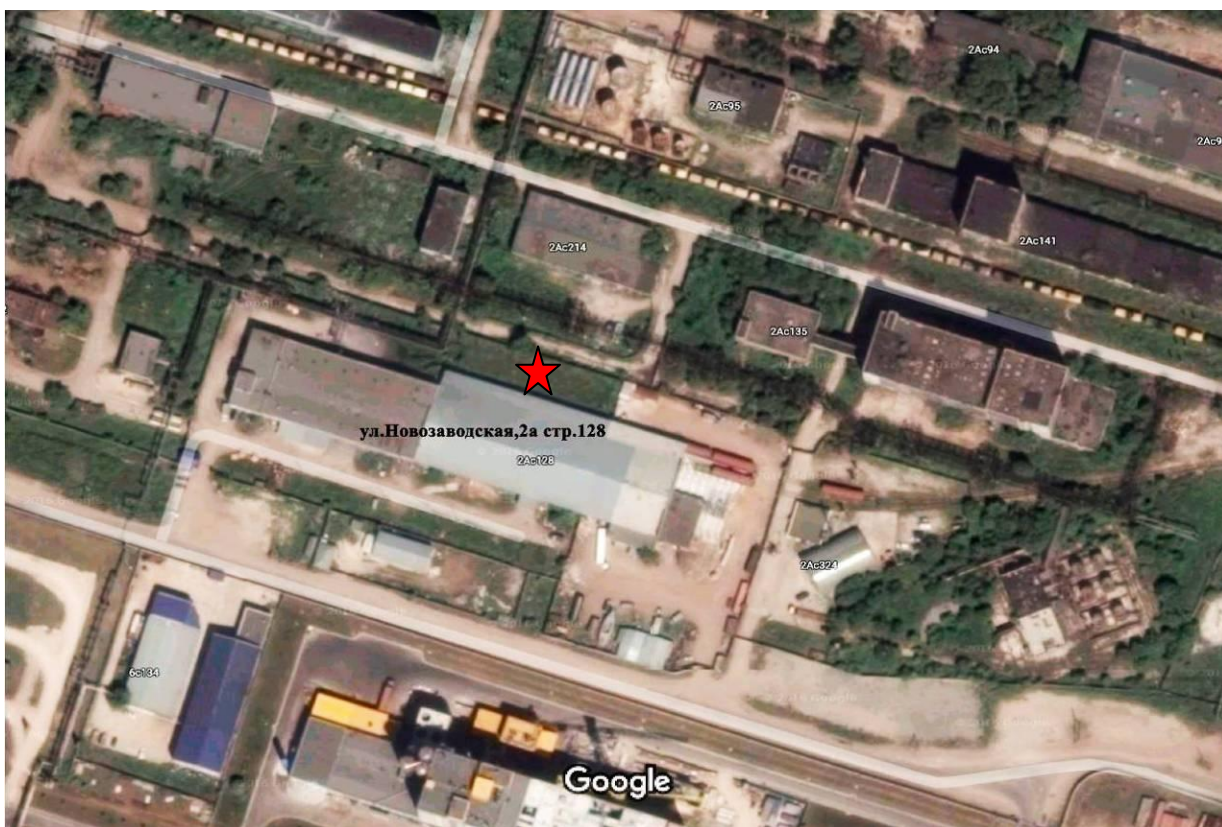


Рисунок 1 – Расположение объекта исследований (фото со спутника)



Рисунок 2 – Расположение почвы для фоновых показателей (фото со спутника)

удаленных не менее чем на 20-50км от источника выбросов, в зависимости от мощности источника. В рамках данной работы для химических и микробиологических показателей фона отбирались образцы почвы с территории национального парка «Самарская лука» северо-западнее села Бахилово (рис. 2).

По типу фоновая почва относится к остаточно-карбонатным черноземам.

2.2 Методы исследований

2.2.1 Метод отбора проб

Точечные пробы отбирают на пробной площадке из одного или нескольких слоев или горизонтов методом конверта, по диагонали или любым другим способом с таким расчетом, чтобы каждая проба представляла собой часть почвы, типичной для генетических горизонтов или слоев данного типа почвы. Количество точечных проб должно соответствовать ГОСТ 17.4.3.01-83.

Объединенную пробу составляют путем смешивания точечных проб, отобранных на одной пробной площадке. Для химического анализа объединенную пробу составляют не менее чем из пяти точечных проб, взятых с одной пробной площадки. Масса объединенной пробы должна быть не менее 1кг.

Для контроля загрязнения поверхностно распределяющимися веществами - нефть, нефтепродукты, тяжелые металлы и др. - точечные пробы отбирают послойно с глубины 0-5 и 5-20см массой не более 200г каждая.

Для бактериологического анализа с одной пробной площадки составляют 10 объединенных проб. Каждую объединенную пробу составляют из трех точечных проб массой от 200 до 250г каждая, отобранных послойно с глубины 0-5 и 5-20см.

Пробы почвы, предназначенные для бактериологического анализа, в целях предотвращения их вторичного загрязнения следует отбирать с

соблюдением условий асептики: отбирать стерильным инструментом, перемешивать на стерильной поверхности, помещать в стерильную тару.

Пробы почвы для химического анализа высушивают до воздушно-сухого состояния по ГОСТ 5180-84. Воздушно-сухие пробы хранят в матерчатых мешочках, в картонных коробках или в стеклянной таре.

Пробы почвы, предназначенные для бактериологического анализа, упаковывают в сумки-холодильники и сразу доставляют в лабораторию на анализ. При невозможности проведения анализа в течение одного дня пробы почвы хранят в холодильнике при температуре от 4 до 5°C не более 24 ч [59].

2.2.2 Методы микробиологического анализа почв

Обнаружение и количественный учет микроорганизмов в почве

Метод посева из разведений почвенных суспензий на плотные питательные среды является не единственным и не самым совершенным для количественного учета микроорганизмов в почве. Число бактерий, например, учитываемое с помощью прямого метода люминесцентного микроскопирования почвенной суспензии, в 1000 раз превышает количество бактерий, учитываемое методом посева. Однако метод посева остается одним из распространенных в практике исследования почвенных микроорганизмов вследствие того, что позволяет учитывать не только численность, но и таксономический состав комплекса почвенных микроорганизмов. Из изолированных колоний, вырастающих на чашках с питательной средой, можно выделять чистые культуры микроорганизмов для дальнейшего исследования и идентификации [63].

Подготовка посуды и материалов

Для микробиологических исследований готовили:

- 1) колбы на 250 мл со 100 мл стерильной воды;
- 2) пробирки, содержащие по 10 мл стерильной воды, для приготовления разведения;
- 3) стерильные пипетки;

- 4) стерильные шпатели;
- 5) стерильные чашки Петри;
- 6) стерильные МПА среды;
- 7) стерильная дистиллированная вода;
- 8) стерильные и обезжиренные предметные и покровные стекла;
- 9) 95%-ный этиловый спирт;
- 10) краситель Азур;
- 11) петля микробиологическая;
- 12) спиртовая горелка;
- 13) микроскоп;
- 14) эксикатор;
- 15) масло иммерсионное;
- 16) стерильные стеклянные стаканы.

Отбор и подготовка почвенного образца для микробиологического анализа

Образцы почв для проведения микробиологических исследований отбирают в стерильные пакеты. Для получения статистически достоверных результатов с пробной площади отбирают от трех до десяти образцов методом случайных проб. Микробиологический анализ проводят непосредственно после отбора образцов или хранят образцы в морозильной камере при температуре - 50°C [63].

Подготовка почвенного образца к микробиологическому анализу заключается в удалении крупных корней, разрушении почвенных агрегатов, десорбировании микроорганизмов с поверхности почвенных частиц, дезагрегировании микроколоний микроорганизмов. Для десорбции микроорганизмов и дезагрегирования микроколоний используется обработка почвенного образца ультразвуком на установке УЗДН-1 при следующем режиме: время обработки образца 4 мин., сила тока 0,44 А, частота 15 кГц.

Приготовление питательных сред и посуды для посева

Микроорганизмы, населяющие почву, различны по потребностям в

источниках питания, поэтому универсальных сред, одинаково пригодных для роста всех микроорганизмов не существует. Главными элементами, по отношению к которым проявляется разнообразие обмена веществ у микроорганизмов и которые определяют специфичность питательной среды, являются источники углерода и азота.

Для выделения бактерий из почвы используют мясопептонные среды,готавливаемые с добавлением пептона и поваренной соли к отварам и экстрактам мяса.

Разливку питательной среды лучше производить, когда среда имеет температуру около 50⁰, так как при этом на крышках чашек не образуется капель воды в результате конденсации пара. Для того, чтобы колонии на агаре не расплывались, чашки со средой подсушивают в сушильном шкафу при 60-70⁰ до появления муарового рисунка на поверхности агара или на воздухе, выдерживая их сутки после разлива среды.

Приготовление почвенных суспензий

Перед посевом влажную или сухую почвы хорошо перемешивают, высыпают на часовое стекло, предварительно протертое спиртом, освобождают от посторонних включений и крупных корней. Используют навеску в 1г после соответствующей обработки почвы растиранием или другим способом переносят ее в колбу со 100мл стерильной водопроводной воды. Готовят разведения почвенной суспензии, для чего 1мл почвенной суспензии из колбы (разведение 1:100) последовательно переносят в ряд пробирок с 10мл стерильной водопроводной воды (рис. 3).

Посев почвенной суспензии на плотные среды проводят из разведений 1:10; 1:100; 1:1000 и т.д. в зависимости от таксономической принадлежности учитываемых микроорганизмов, типа почвы, ее влажности и других факторов. Разведение подбирают таким образом, чтобы на чашке развивалось 5—200 колоний бактерий и актиномицетов и 30-50 колоний грибов.

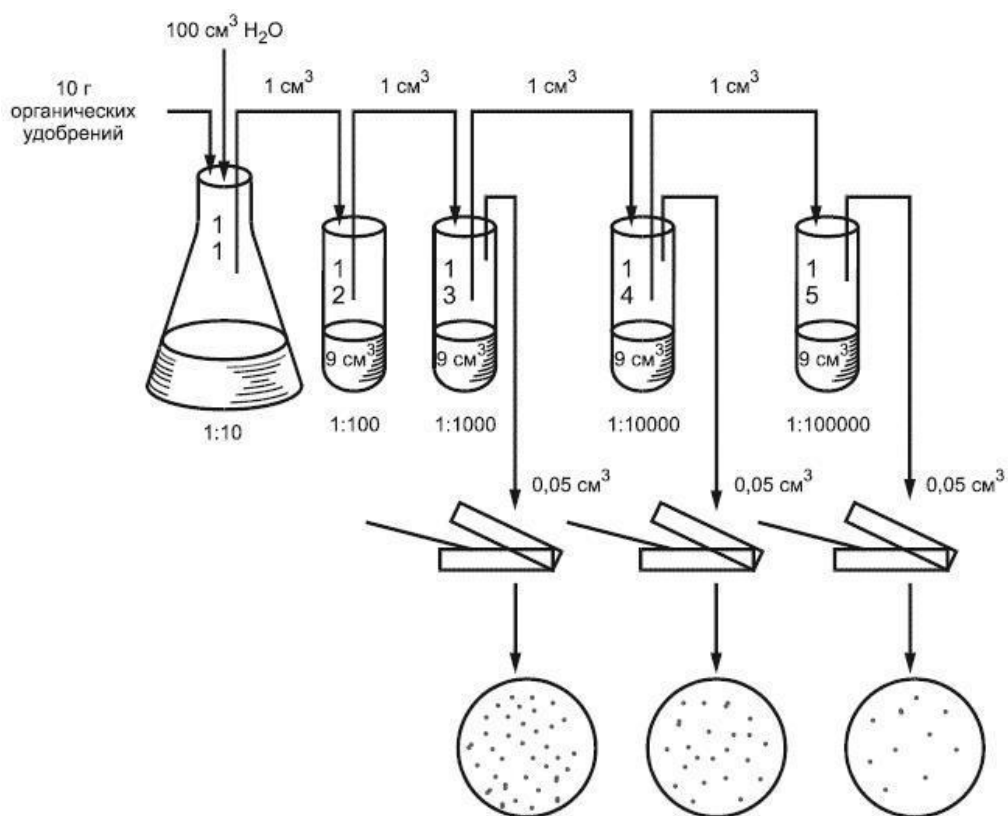


Рисунок 3 – Схема приготовления разведения почвы: 1- колбы для приготовления исходной суспензии; 2-5 - пробирки для последовательных 10-кратных разведений

При слишком густом или разреженном посеве подсчет количества микроорганизмов будет неточным. Из каждого образца почв берут не менее 3-5 повторных навесок и каждую навеску высевают на 3-5 чашек с каждой средой.

Техника посева

На поверхность застывшей подсушенной среды наносят пипеткой 1 каплю почвенной суспензии определенного разведения и с помощью стеклянного шпателя распределяют ее по всему агару. Засеянные чашки подписывают, переворачивают вверх дном и помещают в термостат при температуре 30-32°C. Сроки учета микроорганизмов зависят от состава питательной среды и таксономического состава учитываемых организмов.

Возможность биологических методов учета почвенных бактерий ограничена в том смысле, что нельзя предложить среды, обеспечивающей рост всех почвенных бактерий. В зависимости от целей исследования для учета бактерий употребляются различные питательные среды. К таким средам относится мясопептонный агар (МПА).

На МПА учитывают на 2-3 сутки роста споровые и неспоровые формы бактерий.

Подсчет количества колониобразующих единиц микроорганизмов (КОЕ) в 1г почвы

Каждая колония на чашке с питательной средой вырастает из одной колониобразующей единицы (КОЕ), которая может представлять собой бактериальную, дрожжевую клетку, спору или кусочек мицелия актиномицета или гриба. Поэтому, учитывая колонии микроорганизмов, выросшие на питательной среде, мы можем определить количество КОЕ в 1г почвы. Подсчет количества колоний на чашке проводят со дна чашки в проходящем свете. На месте подсчитанной колонии чернилами по стеклу или фломастером ставят точку. В случае использования непрозрачных сред или учета колоний актиномицетов подсчет производят с поверхности агара.

Подсчитав количество колоний на всех параллельных чашках, вычисляют среднее их число на чашке, затем делают пересчет содержания колониобразующих единиц в 1г (КОЕ/г) почвы по формуле:

$$A = B \times V \times C, \quad (2)$$

где:

A – КОЕ/г почвы;

B – среднее количество колоний на чашке;

V – разведение почвенной суспензии, из которого произведен посев;

C – количество капель в 1 мл суспензии (количество капель в пипетке на 1 мл, с помощью которой проводили посев) [63].

Обнаружение микроорганизмов, участвующих в превращениях фосфора

Для выделения из почвы микроорганизмов, обладающих способностью растворять фосфаты железа и алюминия используют следующий метод. Фосфаты железа и алюминия осаждают следующим образом. Простерилизованные через фильтр Зейца растворы Na_3PO_4 и FeCl_3 (для получения FePO_4) или AlCl_3 (для получения AlPO_4) сливают и после осаждения асептически вносят в расплавленную глюкозо-аспарагиновую среду (г/л): глюкоза - 10,0; аспарагин - 0,5; K_2HPO_4 - 0,5; агар - 20,0. Используют следующие навески (мг): $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 390; $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - 570; $\text{AlCl}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 360. Среду разливают в чашки Петри и засевают почвенной суспензией (разведения 10^4 — 10^6). Инкубируют при 28°C 3—10 суток. Вокруг колоний бактерий, актиномицетов, грибов, растворяющих фосфаты железа и алюминия, образуются зоны просветления [22].

Приготовление микробиологических мазков

Стерильной микробиологической петлей колония исследуемых микроорганизмов переносилась на предметное стекло с одной каплей стерильной воды. Полученный мазок высушивается естественным способом, затем фиксируется над пламенем спиртовой горелки. Далее производилась окраска микробиологического мазка по Грамму.

Окраска по Граму (в модификации Синева):

а) на фиксированный мазок накладывают фильтровальную бумагу, пропитанную генциан-фиолетовым, смачивают водой, окрашивают 2 минуты;

б) снимают бумагу и наносят на мазок раствор Люголя на 1 минуту, затем краситель сливают;

в) обесцвечивают мазок 96% спиртом 10-15 секунд (до исчезновения сине-фиолетовых струек);

г) промывают мазок водой;

д) докрасивают фуксином Пфейффера 30 секунд;

е) промывают мазок водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют.

По отношению к этой окраске все бактерии подразделяются на грамположительные (окрашиваются в сине-фиолетовый цвет) и грамотрицательные (окрашиваются в розово-красный цвет).

К грамположительным микроорганизмам относятся все кокки, кроме нейссерий, и палочковидные бациллы. К грамотрицательным - нейссерии, неспорообразующие бактерии, вибрионы и спириллы [62].

2.2.3 Методы химического анализа почв

Приготовление солевой вытяжки и определение ее рН

Определение рН солевой вытяжки почвы проводилось по методу ЦИНАО. Стандарт ГОСТ 26423-85 устанавливает определение РН водной вытяжке из почв для проведения почвенного, агрохимического и мелиоративного обследования угодий. Важнейшим почвенным параметром является соотношение концентраций H^+ и OH^- ионов в почвенном растворе, которые создают среду для всех биохимических процессов в растении. Эта среда характеризуется значениями РН водной вытяжки [66].

Сущность метода заключается в извлечении водорастворимых солей из почвы дистиллированной водой при отношении почвы к воде 1:5 и определения РН водной вытяжки с помощью РН — метра.

По величине щелочности почвы делятся на:

- слабощелочные (РН=7-8);
- щелочные (РН=8-9);
- сильнощелочные (РН=9-11);

По величине кислотности почвы делятся на;

- сильнокислые (РН<4.5);
- среднекислые (РН=4.6-5.0);
- слабокислые (РН=5.1-5.5);
- близкие к нейтральным (РН>5.6).

Определение подвижных соединений фосфора

Определение подвижных соединений фосфора проводилось по методу Чирикова в модификации ЦИНАО, ГОСТ 26204-91. Метод основан на извлечении подвижных соединений фосфора из почвы раствором уксусной кислоты концентрации $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,5$ моль/дм³ при отношении почвы к раствору 1:25 и последующем определении фосфора в виде синего фосфорно-молибденового комплекса на фотоэлектроколориметре.

Для вычисления точной концентрации используют среднее арифметическое значение результатов трех титрований. Точную концентрацию раствора (С), моль/дм³, вычисляют по уравнению:

$$C = \frac{C_1 \cdot V}{V_1}, \quad (3)$$

где:

C_1 - концентрация раствора гидроокиси натрия, моль/дм³;

V - объем раствора гидроокиси натрия, израсходованный на титрование, см³;

V_1 - объем раствора уксусной кислоты, отобранный для титрования, см³.

Содержание P_2O_5 в анализируемой почве определяют непосредственно по градуировочному графику. Построение градуировочного графика - по ГОСТ 29269 [61].

Допускаемые относительные отклонения от аттестованного значения стандартного образца для двусторонней доверительной вероятности $P = 0,95$ указаны в таблице 3.

Таблица 3 Допускаемые отклонения при определении подвижных соединений фосфора в почве

Массовая доля P_2O_5 в почве, млн ⁻¹	Допускаемые отклонения, %
до 50	15
св. 50	12

Определение содержания свинца в почве

Для определения содержания свинца в почве использовали метод экстракционно-фотометрического определения свинца с дитизоном. Метод основан на извлечении соединений элемента из почвы (переведении их в раствор), получении окрашенного комплекса свинца с дитизоном (карминово-красного цвета), экстракции его четыреххлористым углеродом и измерении оптической плотности экстракта. Оптимальные условия образования и экстрагирования комплекса рН 8-10 [58].

Рассчитывают содержание свинца в почве мг/кг по формуле:

$$X = \frac{C \cdot V_0}{V_1 \cdot m}, \quad (4)$$

где:

C – содержание свинца, найденное по градуировочному графику; мкг;

V_0 – исходный объем вытяжки, см³;

V_1 – объем вытяжки, взятый для определения, см³; m – навеска почвы, г.

Определение содержания меди в почве

Для определения содержания меди в почве использован метод экстракционно-фотометрического определения меди с диэтилдитиокарбаматом свинца. Определение меди в почве фотометрическим методом основано на образовании окрашенного растворимого в органических растворителях комплекса иона Cu^{2+} с диэтилдитиокарбаматом свинца [16].

Содержание меди в пробе X, мг/кг рассчитывают по формуле (4).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Данные полученные при проведении химического анализа почв представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Показатели химического анализа почв

№ п/п	Химический показатель	ПДК	Фон	ОАО «Фосфор»	Превышение, раз	
					ПДК	фон
1	рН водной вытяжки почвенного раствора, ед. рН	-	6,6	7,8	-	-
2	Содержание подвижных форм фосфора, P ₂ O ₅ мг/кг почвы	-	92	680	-	7,4
3	Содержание меди, мг/кг почвы, подвижные формы	3,0	0,6	11,7	3,9	19,5
4	Содержание свинца, мг/кг почвы, подвижные формы	6,0	3,2	50,1	8,4	15,7
5	Содержание железа, мг/кг почвы	-	4130	16450	-	4,0

Анализ образцов почв на кислотность водной вытяжки почвенного раствора показал, что почва с территории ОАО «Фосфор» относится к слабощелочным почвам, фоновая почва к слабо-кислым почвам. Антропогенные почвы более щелочные, чем природные, в поверхностных слоях загрязненных участков рН водн. обычно находится в пределах 7,3–8,3. Высокую щелочность городских и промышленных почв связывают с поступлением большого количества пыли, содержащей карбонаты кальция, который хорошо выветривается, высвобождая кальций в почву. Под действием осадков, обогащенных растворенной углекислотой, в почвах образуются бикарбонаты, которые (как гидролитически щелочные соли) способны изменять реакцию среды в щелочную сторону.

Исследование почв на степень зафосфачивания показало, что содержание подвижных форм фосфора в почве с ОАО «Фосфор» и в

фоновой почве составляет соответственно 680 и 92 P_2O_5 мг/кг почвы, превышение уровня фона составило 7,4 раз (рис. 4).

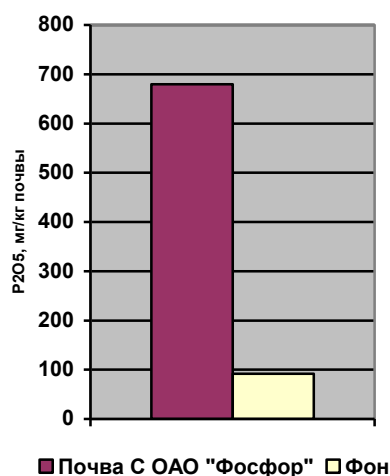


Рисунок 4 – Содержание подвижного фосфора в почве

Согласно группировке почв по содержанию подвижного фосфора, определяемого методом Чирикова, исследуемая почва относится к почвам с очень высоким содержанием подвижных форм фосфора (табл. 6)

Таблица 6 – Группировка почв по содержанию подвижного фосфора, определяемого по методам Кирсанова, Чирикова, Мачигина

№ группы	Содержание подвижного фосфора	По методу		
		Кирсанова	Чирикова	Мачигина
		P_2O_5 мг/кг почвы		
1	Очень низкое	Менее 25	Менее 20	Менее 10
2	Низкое	26-50	21-50	11-15
3	Среднее	51-100	51-100	16-30
4	Повышенное	101-150	101-150	31-45
5	Высокое	151-250	151-200	46-60
6	Очень высокое	Более 250	Более 200	Более 60

Кратность увеличения содержания фосфора в загрязненной почве по отношению к фоновому составила 7,4 раза. По 100-бальной шкале в системе

бонитировки почв [5, 54] степень техногенной фосфатизации почвы с территории ОАО «Фосфор», рассчитанная по формуле (1) равна 13,5 баллам.

Учитывая наибольшую способность фосфора по сравнению с другими биогенными элементами к аккумуляции и наибольшую напряженность, связанную с его присутствием в аномально высоких количествах в экосистеме, И.В. Титовой., Е.В. Дабаховой, М.В. Дабаховым (2004) было предложено в качестве диагностического показателя, характеризующего техногенную трансформацию почв, использовать содержание фосфора в почве, причем именно содержание его подвижных форм [74].

Таким образом, согласно градации для определения степени техногенной трансформации почвы по фосфору (фосфатизации), разработанной И.В. Титовой, Е.В. Дабаховой, М.В. Дабаховым (2004) [74], почва с территории ОАО «Фосфор» относится к сильнотрансформированным почвам.

При экологическом мониторинге техногенно-нарушенных почв традиционно не делается анализ на содержание подвижных форм фосфора. Однако, по некоторым данным, содержание фосфора в почве не должно превышать 200 мг P_2O_5 /кг почвы. Этот порог связан с тем, что повышенное содержание свободной фосфорной кислоты растворяет большое количество металлов, в том числе тяжелых, которые всегда присутствуют в почве в связанном виде в составе молекул почвенных гумусовых веществ. Фосфат-анионы способны к координации с ионами металлов с образованием различных, в том числе нетипичных для естественных почв соединений. Нетипичные для естественных наземных экосистем соединения, образующиеся в результате фосфатизации земель, могут вызывать в них изменения, направленность и потенциальную опасность которых оценить в настоящий момент сложно, так как знания о них явно недостаточны. Отмечена четко выраженная тенденция к накоплению тяжелых металлов в почвах, богатых фосфатами. Так, попадающий при химическом загрязнении в почву свинец сравнительно легко образует гидроксид в нейтральной или

щелочной среде. Если почва содержит достаточное количество растворимых фосфатов, тогда гидроксид свинца переходит в труднорастворимые фосфаты.

В результате химического анализа почв на тяжелые металлы установлен высокий уровень загрязнения почвы с территории ОАО «Фосфор» медью и свинцом, что выражается в 3,9 и 8,4 ПДК соответственно, уровень железа в исследуемой почве превышает фон в 4 раза (рис.5).

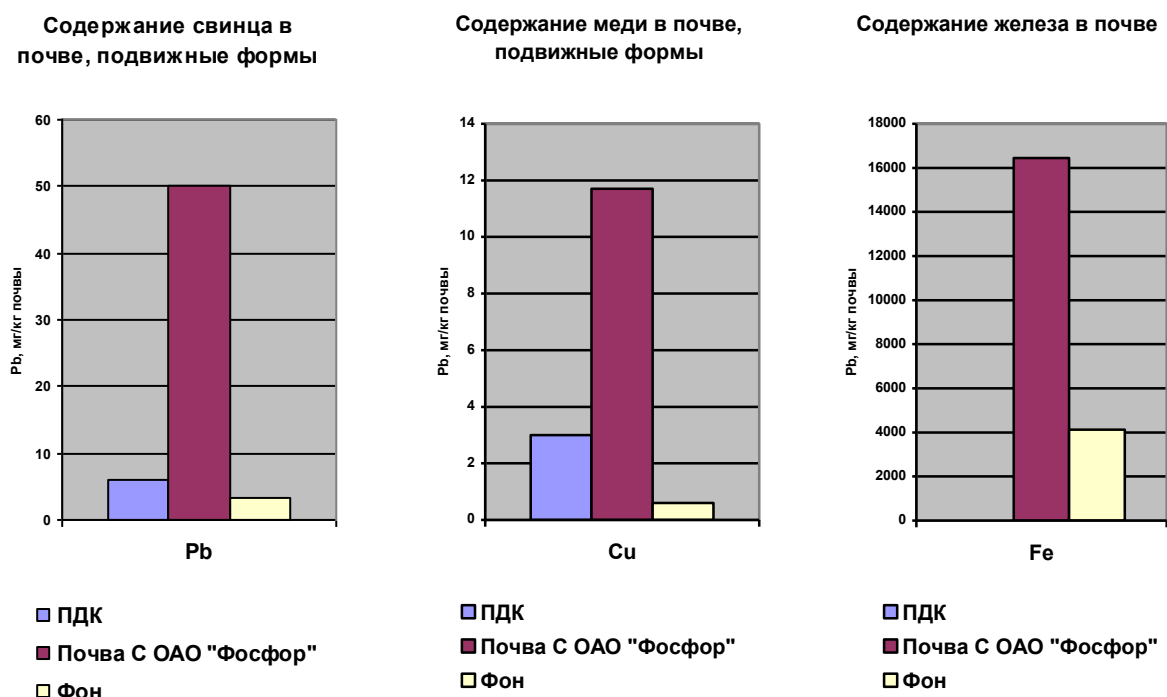


Рисунок 5 – Содержание свинца, меди, железа в почве

Распределение подвижных форм фосфора в загрязненной земле неравномерно и составляет 920 мг/кг почвы в поверхностном слое и 430 мг/кг почвы на глубине 20см, несмотря на высокую способность подвижного фосфора мигрировать в более глубокие слои почвы (табл. 7). Это может быть связано с уплотненностью почвы и присутствием тяжелых металлов.

Определение содержания катионов тяжелых металлов меди и свинца в разных горизонтах почвенного покрова ОАО «Фосфор» 0-5см и 20см показало неравномерное распределение свинца в почве 64,6 мг/кг и 35,5 мг/кг почвы соответственно, для меди зависимости концентрации от почвенного горизонта не наблюдалось. Таким образом, присутствует прямая

зависимость концентрации свинца в почве от концентрации подвижного фосфора (рис. 6).

Таблица 7 – Показатели химического анализа почв

№ п/п	Химический показатель	ПДК	Фон	ОАО «Фосфор», объединенная проба	ОАО «Фосфор»	
					глубина почвы 0-5см	глубина почвы 20см
2	Содержание подвижных форм фосфора, P ₂ O ₅ мг/кг почвы	-	92	680	430	920
3	Содержание меди, мг/кг почвы, подвижные формы	3,0	0,6	11,7	11,6	11,8
4	Содержание свинца, мг/кг почвы, подвижные формы	6,0	3,2	50,1	64,6	35,5

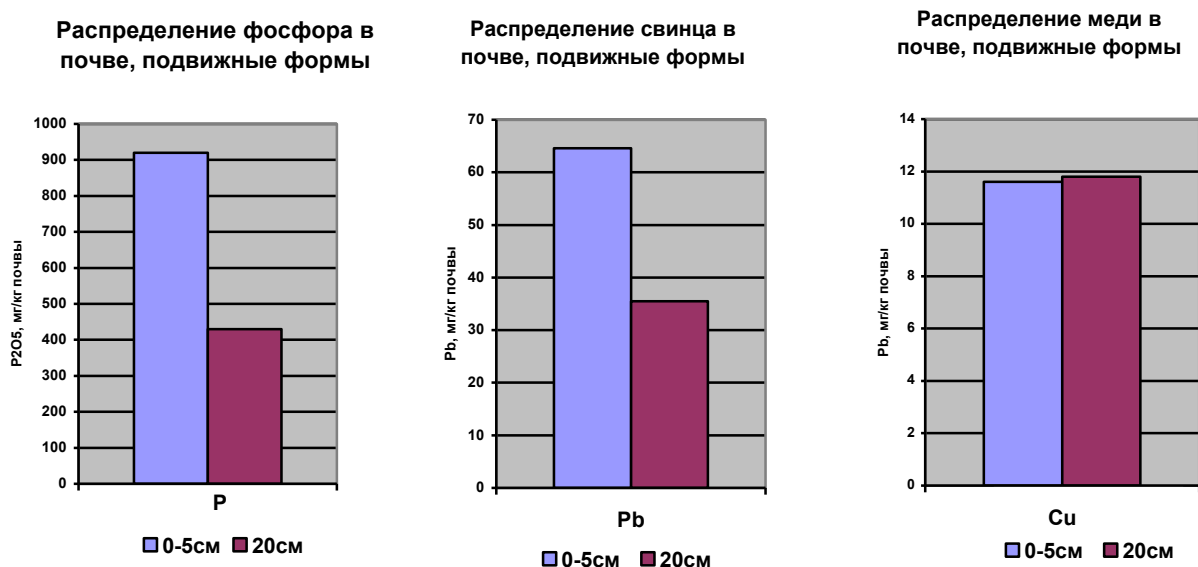


Рисунок 6 – Распределение фосфора, свинца и меди в почве

Исследование почвы на общее количество микроорганизмов проводилось в последней декаде сентября. В последней декаде сентября и октябре достигается максимальная численность почвенных микроорганизмов, что подтверждается многочисленными исследованиями. Это объясняется следующими факторами: в данный период наиболее оптимальное соотношение температуры почвы и почвенной влажности, а так

же почвенная биота наиболее обеспечена питанием в виде отмирающих однолетних растений.

В результате проведенных исследований было установлено, что общая численность микроорганизмов в почве с территории завода ОАО «Фосфор» составляет 5675,5 тысяч КОЕ на 1г абсолютно сухой почвы. Согласно шкале оценки обогащенности почвы микроорганизмами, исследуемая почва относится к почвам со средней обогащенностью, близкой к богатым почвам (табл. 8). Общая численность микроорганизмов в фоновом образце почвы составила 42029,5 тысяч КОЕ на 1г сухой почвы, данная почва относится к очень богатым микроорганизмами почвам (рис.7).

Таблица 8 – Шкала для оценки степени обогащенности почв микроорганизмами (метод посева на питательные среды) (Звягинцев, 1978)

Степень обогащенности почв	Количество бактерий на МПА		Количество бактерий на средах Эшби, Чапека, КАА	
	млн/г	млн/см ²	млн/г	млн/см ²
Очень бедная	<1	<25	<2	<50
Бедная	1-2	25-50	2-4	50-100
Средняя обогащенность	3-5	50-125	5-10	100-250
Богатая	6-10	125-250	11-20	250-500
Очень богатая	>10	>250	>20	>500

Однако по данным научных исследований антропогенные почвы отличаются от целинных формированием особых микробиологических сообществ, поэтому одного показателя общей численности микроорганизмов почв недостаточно. Один из общих принципов биологической оценки повреждений почвенной среды заключается в том, что микробная система почв при разного рода антропогенных загрязнениях реагирует сходным образом путем изменения состава активно функционирующих популяций,

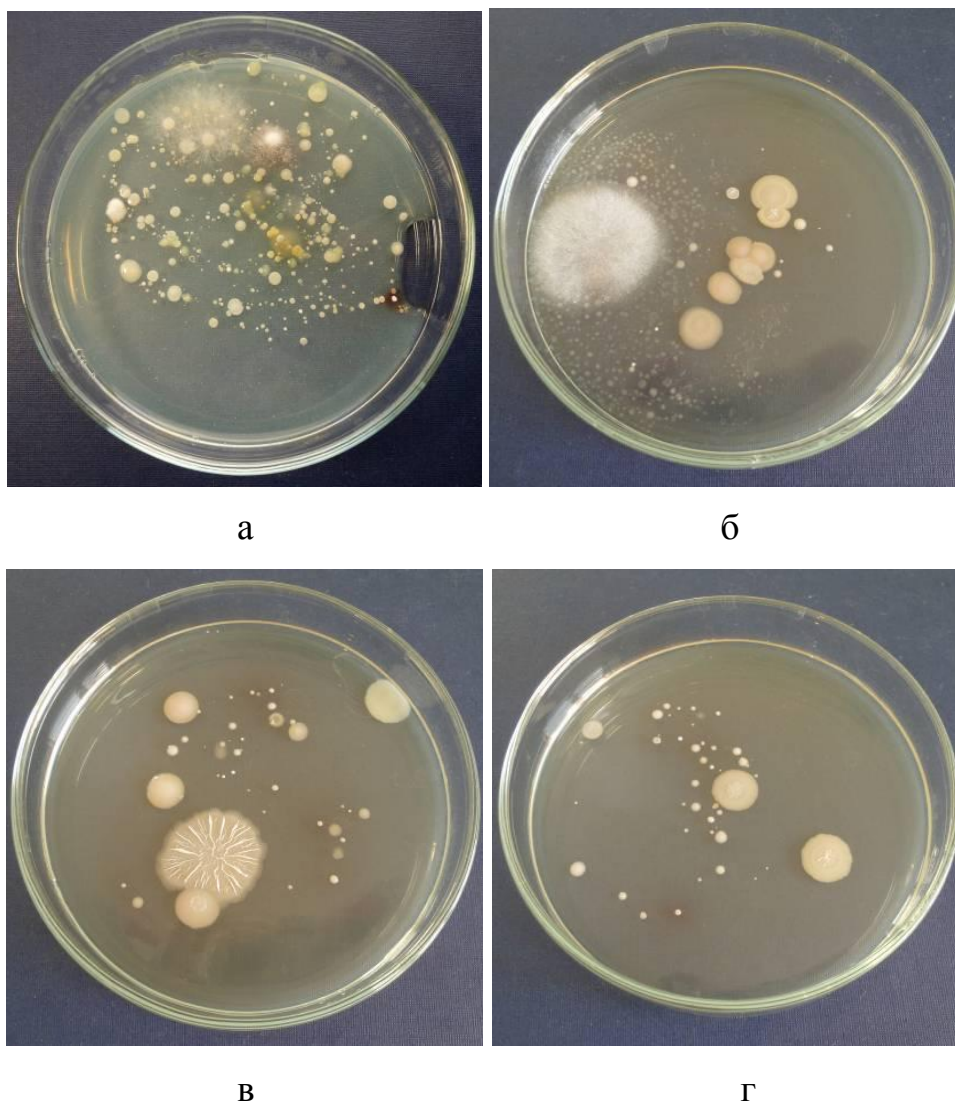


Рисунок 7 –Сравнение посевов на МПА из разведения 1:10000

а – фоновый образец, б,в,г – почва с ОАО «Фосфор»

входящих в сообщество микроорганизмов. Последовательность этих изменений при увеличении концентраций загрязнителя следующая: сохранение стабильности сообщества (зона гомеостаза) - перераспределение доминирующих популяций (зона стресса) - преимущественное развитие устойчивых популяций (зона резистентности, зона развития резистентных видов) и полное подавление развития микроорганизмов (зона репрессии). Поэтому была проведена дифференциация почвенных микроорганизмов, выращенных на МПА. Для этого были выведены чистые культуры основных представителей почвенной микрофлоры и произведено микроскопирование окрашенных по Грамму микробиологических мазков. Полученные в




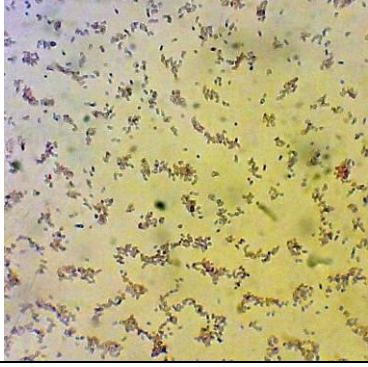
результате проведенных работ данные представлены в таблице 9.

В бактериальных комплексах городских загрязненных почв и сопряженных субстратов резко возрастает значимость бактерий, приспособленных к существованию в условиях значительных антропогенных нагрузок - это пигментированные родококки, микрококки и бациллы. В исследуемой почве в ходе микробиологического анализа были обнаружены микроорганизмы спорообразующего рода *Bacillus*, как доминирующий род – 75,7% от всей численности микроорганизмов. Этот показатель является индикатором глубины минерализации органического субстрата. В почвах с активным процессом самоочищения число бацилл относительно общей микробной обсемененности достигает 20 - 50%, в сильно загрязненных, при постоянном поступлении загрязнителя, сохраняется в пределах до 20%.

Таблица 9 – Дифференциация почвенных микроорганизмов, выращенных на МПА

№ п/п	Фото колонии	Размер, мм	Описание колонии Форма, профиль, край колонии, цвет, структура колонии	Кол-во колоний в чашке Петри	КОЕ в 1г почвы, тыс. ед.	Фото мазков, увеличение 10x40	Окраска по грамму, тип клеток	Предполагаемая таксономическая принадлежность, род
	1	2	3	4	5	6	7	8
1		25-30	Форма круглая нитевидная с выпуклым профилем и нитевидным краем. Цвет белый мутный матовый, структура нитевидная	1	141,6		Грамотрицательные разветвленные клетки мицелия без перегородок	Mucor
2		2-10	Форма круглая с изогнутым профилем и гладким краем. Цвет молочный мутный матовый, структура неоднородная	3	424,8		Грамотрицательные палочки неправильной формы, в т.ч. загнутые и кокки неправильной формы	Arthrobacter


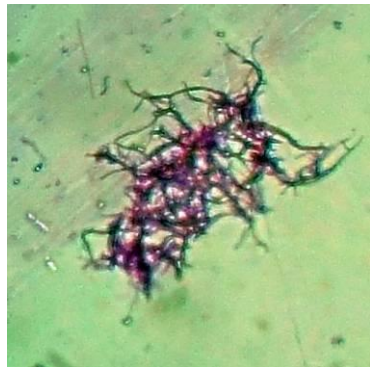
Продолжение таблицы 9

	1	2	3	4	5	6	7	8
3		20-23	Форма круглая с фестончатым краем, складчатая с плоско-бугристым профилем. Цвет молочно-кремовый матовый, структура неоднородная	1	141,6		Грамположительные прямые палочки часто в парах или цепочках и споры	Bacillus
4		4-6	Форма круглая с плоским кратерообразным профилем и с гладким краем. Цвет молочно-кремовый матовый, структура неоднородная	2	283,2		Очень слабо-грамположительные палочки одиночные или в цепочках, переходящие в кокки	Mycobacterium
5		5-6	Форма круглая с выпуклым профилем и гладким краем. Цвет молочный блестящий водянистый, структура однородная	1	141,6		Грамотрицательные мелкие кокки и клетки овальной формы	Azotobacter

Продолжение таблицы 9

	1	2	3	4	5	6	7	8
6		3-10	Форма круглая с каплевидным профилем и гладким краем. Цвет кремовый блестящий мутный, структура однородная	9	1274,3		Грамположительные длинные тонкие палочки	Bacillus
7		1-2	Форма круглая с выпуклым профилем и гладким краем Цвет молочно-кремовый матовый, структура однородная	18	2548,7		Грамположительные мелкие палочки	Bacillus
8		1-2	Форма круглая с каплевидным профилем и гладким краем. Цвет желтый блестящий непрозрачный, структура однородная	2	283,2		Грамположительные кокки в скоплениях неправильной формы, но не в цепочках	Micrococcus

Продолжение таблицы 9

	1	2	3	4	5	6	7	8
9		1	<p>Форма круглая с каплевидным профилем и гладким краем.</p> <p>Цвет кремовый матовый непрозрачный, структура однородная.</p> <p><u>Окрашивание среды в оранжевый цвет</u></p>	1	141,6		<p>Грамположительные тонкие прямые или слегка изогнутые палочки и нити с настоящим ветвлением</p>	Nocardia

В меньшем количестве в микробиологическом сообществе почвы, выделенном на МПА, присутствуют бактерии родов *Arthrobacter* (2,7%), *Mycobacterium* (5,4%), *Azotobacter* (8,1%), *Micrococcus* (5,4%). Так же были обнаружены актиномицеты рода *Nocardia* (2,7%) и микроскопические грибы рода *Mucor* 2,7%, пониженное содержание в почве которых свидетельствует о щелочности почвенного образца (рис. 8).

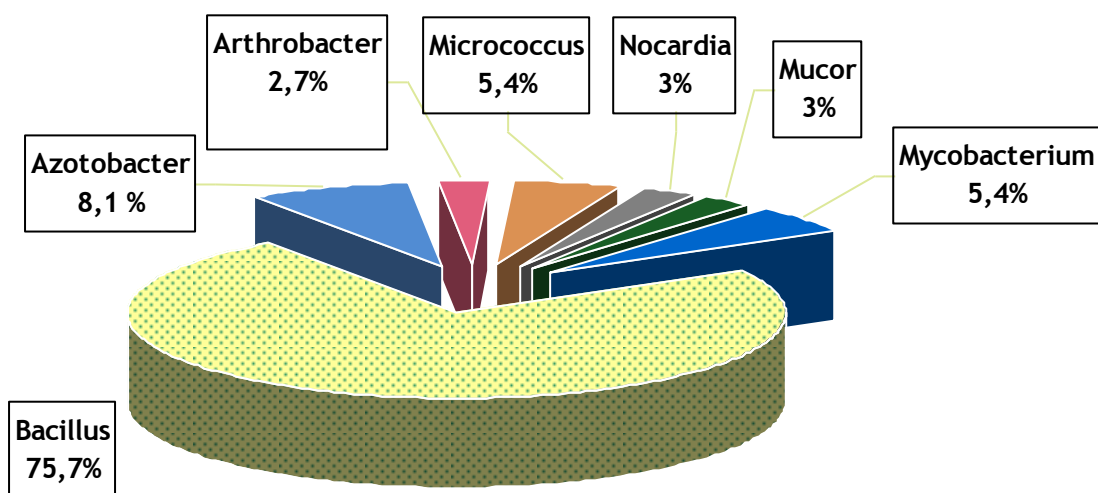


Рисунок 8 – Распределение количества микроорганизмов в почве с ОАО «Фосфор» по родам

Анализ таксономической структуры бактериальных комплексов показал, что наиболее чувствительными к загрязнению почв тяжелыми металлами и фосфатами являются аммонифицирующие и нитрифицирующие бактерии, целлюлозолитические бактерии и актиномицеты. С другой стороны, увеличивается численность фосфатрастворяющих и железоредуцирующих бактерий. С целью выявления микроорганизмов, обладающих фосфатазной активностью с отношении нерастворимых фосфатов металлов, был произведен посев почвенной микрофлоры на аспарагиновые агары с добавлением повышенных доз

фосфатов меди, железа (III) и кальция.

В результате проведенных исследований было установлено, что рост почвенных микроорганизмов наиболее активен в среде с фосфатом железа (III) (рис. 9).

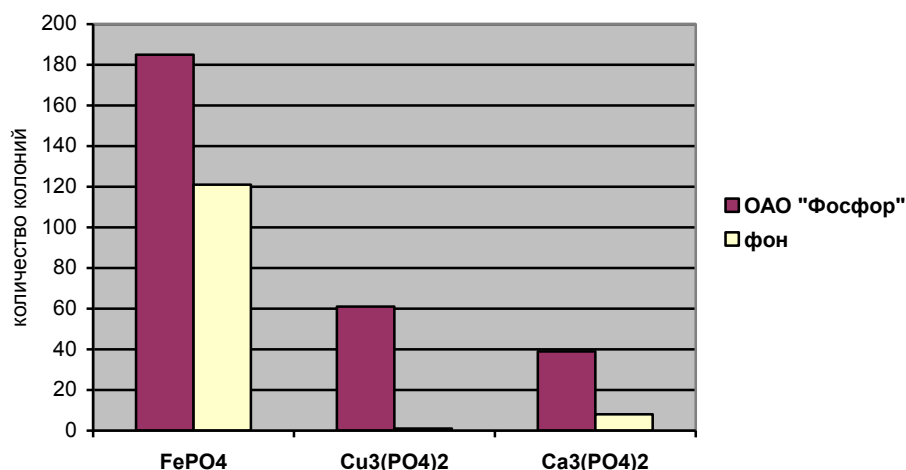
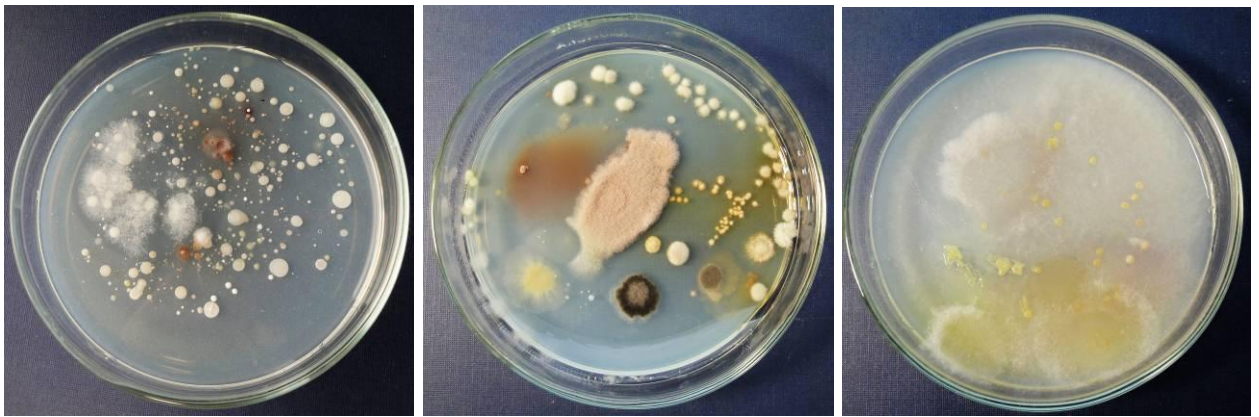


Рисунок 9 –Показатели численности микроорганизмов через 21 день роста на фосфат-содержащих средах, разведение 1:100

Лабораторные опыты показали, что способность к росту на средах с высоким содержанием фосфатов железа (III), меди и кальция значительно выше у почвенной микрофлоры образца почвы с ОАО «Фосфор», чем у фонового образца. Это свидетельствует о высокой устойчивости микроорганизмов техногенно-нарушенной почвы к такого рода загрязнителям. Динамика роста микроорганизмов на средах, содержащих FePO₄, Cu₃(PO₄)₂ и Ca₃(PO₄)₂ продемонстрирована на фотографиях, размещенных в Приложении 1.

Однако, не все виды микроорганизмов, выросших на данных средах, способны к деструкции труднорастворимых фосфатов, вокруг колоний фосфатмобилизирующих бактерий, актиномицетов, грибов, образуются зоны просветления субстрата. Микроорганизмы, способные к деструкции фосфатов железа (III), меди и кальция обнаружены только в образце почвы с ОАО «Фосфор» (рис. 10).



а

б

в

Рисунок 10 – Сравнение посевов из разведения 1:100 на фосфат-содержащих средах: а) FePO_4 , б) $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$, в) $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

Наибольшие зоны просветления до 5мм наблюдались в среде с фосфатом железа (III) вокруг смешанных колоний бактерий и колоний с мицелием, при этом вокруг отдельно произрастающих колоний бактерий просветления субстрата не наблюдалось. Это вероятно связано с тем, что мобилизация фосфора облегчается под действием кислот, выделяемых в процессе окисления органических веществ субстрата микроскопическими грибами. Микроскопирование мазков микроорганизмов-деструкторов показало принадлежность их к роду *Bacillus* и микроскопическим грибам предположительно рода *Mucor* и актиномицетам (рис. 11).

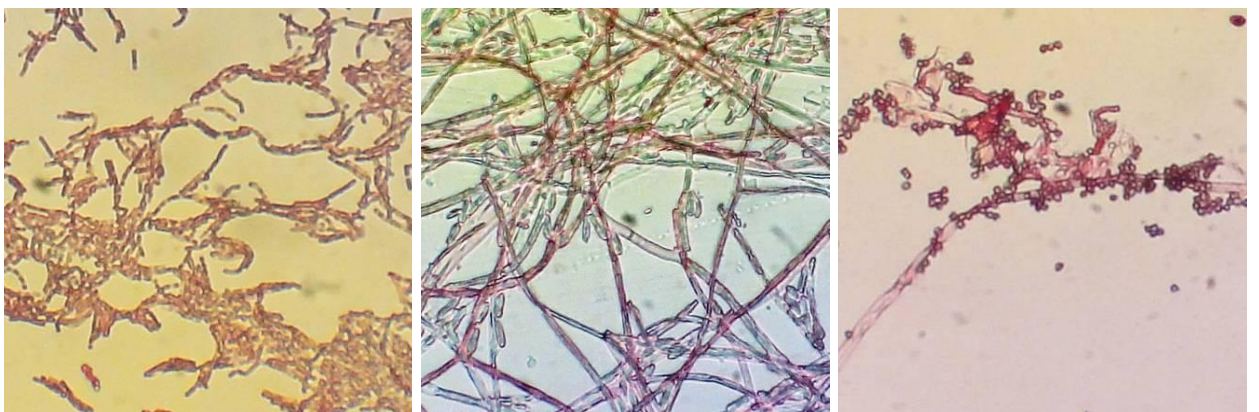


Рисунок 11 – Фотографии мазков колоний микроорганизмов, обладающих способностью к деструкции фосфата железа (III)

В результате проведенных микробиологических исследований выявлено, что на средах с фосфатом меди способны расти только представители актиномицетов и микроскопических грибов (рис. 12). Зоны просветления среды вокруг колоний не превышали 1 мм.

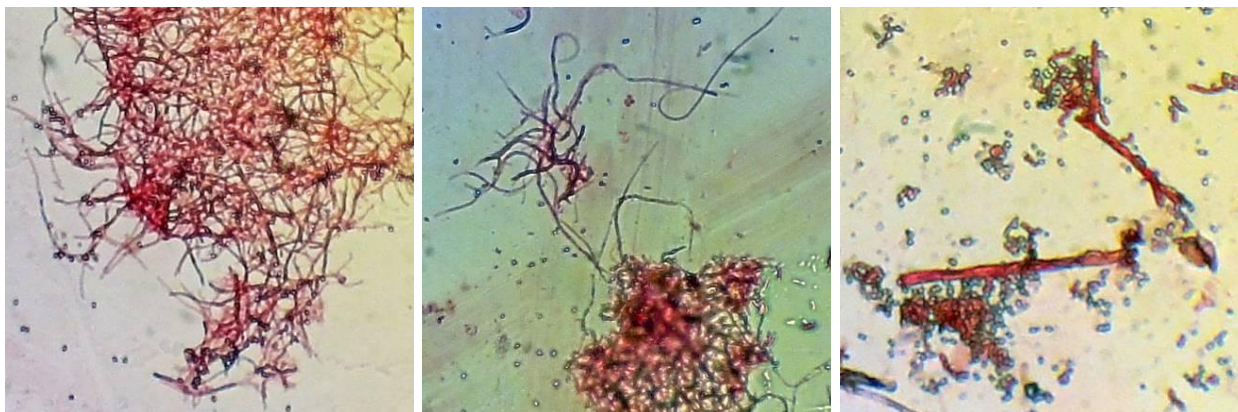


Рисунок 12 – Фотографии мазков колоний актиномицетов и микроскопических грибов, выросших на среде с фосфатом меди

Следует отметить, что актиномицеты считаются очень чувствительными микроорганизмами к различного рода почвенным загрязнениям, и большое таксономическое разнообразие этих микроорганизмов в среде, содержащей медь, говорит о выработанной устойчивости к токсическому воздействию тяжелых металлов за длительный период техногенного загрязнения почвы на территории ОАО «Фосфор».

Посев почвенной суспензии на среду, содержащую фосфат кальция, обнаружил преимущественный рост ярко-желтых круглых колоний представителей рода *Micrococcus*. Однако просветление субстрата наблюдалось лишь при совместном произрастании этих колоний с колониями микроскопических грибов (рис. 13), кислотные метаболиты которых инициируют процессы деструкции фосфата кальция.

Таким образом, деструкция отдельных минеральных соединений фосфора происходит не одинаково легко. По возрастающей трудности разложения может быть намечен следующий ряд:

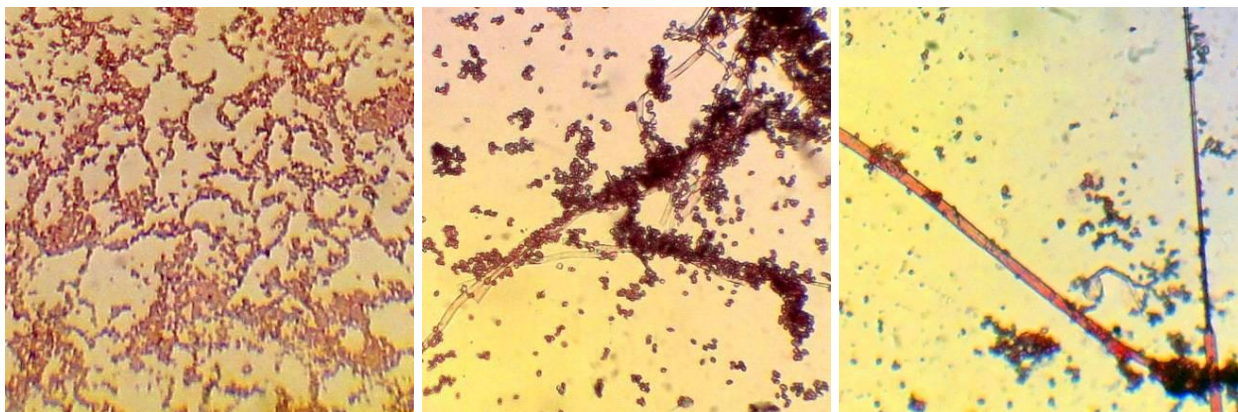
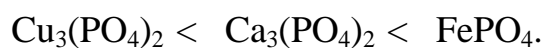


Рисунок 13 – Фотографии мазков колоний бактерий и микроскопических грибов, выросших на среде с фосфатом кальция

Присутствие в почвах, длительное время загрязняемых химикатами, микроорганизмов - деструкторов является результатом естественной селекции микроорганизмов. Поэтому методологически наиболее целесообразно исследовать образцы почв на территориях старых складов ядохимикатов, химических предприятий по производству удобрений, пестицидов и др. химикатов, таких как ОАО «Фосфор».

Итогом проделанной работы является выделение культур микроорганизмов из антропогенно-зафосфаченной почвы для дальнейших исследований с целью выведения штаммов наиболее эффективных микроорганизмов-деструкторов не только фосфатов металлов, но и других химических веществ, устойчивых к комплексным химическим загрязнениям почв. Это бактерии родов *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Azotobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia* (Приложение 2).

На сегодняшний день не остается сомнений, что биотехнологии наиболее приоритетны для восстановления антропогенно-загрязненных почв. Поэтому выявление микроорганизмов, способных к разложению различного рода химических веществ, а так же разработывание и введение в

практику новых технологий микробиологической биоремедиации почв, загрязненных токсичными химическими соединениями, крайне актуальна.

При решении данной задачи необходимо пройти следующие весьма трудоемкие этапы:

1. Выделение чистых культур микроорганизмов. Чистая культура – это популяция микроорганизмов, принадлежащих к одному виду, выращенная на жидкой или плотной питательной среде. Именно такого рода культуры следует использовать для биотехнологий и научно-исследовательских целей. Существует множество методов выделения чистых культур микроорганизмов из смешанных посевов в зависимости от целей их использования. В основе большинства которых – получение чистой культуры из одной клетки путем последовательных пересевов. Однородные культуры микроорганизмов, выделенные из разного типа почв или из одной почвы называются штаммами.

2. Следующий важный и ответственный этап микробиологического исследования – это определение таксономического положения выделенных микроорганизмов путем сравнения их свойств со свойствами известных видов представителей почвенной микрофлоры. Традиционно микроорганизмы идентифицируют, изучая их фенотипические признаки: культуральные, биохимические, морфологические, патогенные. Однако, наиболее точны и перспективны генетические способы идентификации.

3. Штаммы одного могут существенно отличаться друг от друга по способности разлагать определенные вещества и по устойчивости к воздействию агрессивной химической среды загрязненных почв. Поэтому очень важен отбор не только наиболее эффективных микроорганизмов-деструкторов, но и наиболее технологически пригодных для использования в различных биотехнологиях.

4. Необходимо выполнить ряд испытаний с целью проверки выделенных штаммов микроорганизмов и их метаболитов на безопасность для здоровья человека.

5. Подбор условий для культивирования микроорганизмов-деструкторов с учетом экономической целесообразности. Необходимо выбрать наиболее эффективный метод, время и дозировку внесения биодеструкторов в загрязненную почву.

6. Кроме всего выше перечисленного, необходимо провести контроль за интегральной токсичностью почвы с целью проверки безопасности образующихся продуктов деструкции для почвенной биоты и растительности и гарантии достаточной степени очистки загрязненной почвы.

ВЫВОДЫ

1. Высокая степень антропогенного зафосфачивания почвы с территории закрытого предприятия ОАО «Фосфор» сопряжена с высоким уровнем загрязнения тяжелыми металлами 3,9 - 8,4 ПДК и щелочностью почвенного раствора.

2. Большая численность микроорганизмов исследуемой почвы и перестройка в таксономической структуре микробиологического сообщества с доминированием спорообразующего рода *Bacillus* (75,7%) подтверждает развитие резистентности почвенной биоты к загрязнителям.

3. Обнаружена способность почвенных микроорганизмов к деструкции труднорастворимых фосфатов металлов, в том числе меди. Наибольшая фосфатазная активность установлена для бактерий рода *Bacillus*, *Micrococcus*, актиномицетов и микроскопических грибов.

4. Таксономический состав микрофлоры почвы с территории «ОАО «Фосфор» разнообразен, присутствуют бактерии родов *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Azotobacter*, *Micrococcus*, актиномицетов и микромицетов, характерные для естественных экосистем. Поэтому наиболее эффективным методом восстановления загрязненной почвы является микробиологическая ремедиация с помощью аборигенной микрофлоры почвы в комплексе с фиторемедиацией.

5. Необходимо проведение дополнительных исследований микрофлоры зафосфаченной почвы с целью выделения самых эффективных фосфат-мобилизирующих штаммов для применения в биотехнологиях микробиологической ремедиации почв.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Адерихин, П.Г. Фосфор в почвах и земледелии Центральночерноземной полосы. – Изд-во ВГУ. Воронеж, 1970. – 218 с.
2. Адрианов, С.Н. Роль фосфора в современной земледелии / С.Н. Адрианов, Б.А. Сушеница // Плодородие. – 2004. – № 3 (18). – С. 13-15.
3. Баландина, А.В., Еремеченко, О.З., Одегова, Т.Ф., Кузнецов, Д.Б. Результаты исследований по ремедиации дерново-карбонатных почв // Фундаментальные исследования. – 2013. – №10. – С. 95-99.
4. Белоусов, И.Е., Рыбцова, С.А., Кузнецов, Ю.А. Фосфатный режим лугово-черноземных почв Кубани / И.Е. Белоусов и др. // Почвоведение. – 1993. – № 2. – С.133-137.
5. Булгаков, Д.С. Агроэкологическая оценка пахотных почв / Д.С. Булгаков. – М.: Почвенный институт им. В.В. Докучаева, 2002. – 252 с.
6. Вагабов, В.М., Трилисенко, Л.В., Кулаев, И.С. Зависимость длины цепи неорганических полифосфатов от содержания ортофосфата в среде у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / М.В. Вагабов, Л.В. Трилисенко, И.С. Кулаев // Биохимия. – 2000. – 65:3: 414-20.
7. Гарабаджиу, А.В., Козлов, Г.В., Олейникова, А.А., Якшилов, Д.С. Экологические аспекты использования микроорганизмов для очистки почв от загрязнений // Промышленные и бытовые отходы: проблемы хранения, захоронения, утилизации, контроля. Сб. статей XI Международной научно-практической конференции. – Пенза, 2007. – С. 12-13.
8. Геворкян, М.Г., Вартянян, В.Т., Галстян, А.Ш., Бейлерян, М.Н. Изучение кинетики фосфатазной активности выщелоченного чернозема / М.Г. Геворкян и др. // Бюл. Жур. Армении. – 1985. – Т. 38. – № 9. – С. 757-762.
9. Генкель, П.А. Микробиология с основами вирусологии: учебное пособие / П.А. Генкель. – М. : Просвещение, 1974. – С. 193-195.

10. Герасименко, Л.М., Гончарова, И.В., Зайцева, Л.В. Влияние содержания фосфора в среде на рост и минерализацию цианобактерий / Л.М. Герасименко, И.В. Гончарова, Л.В. Зайцева // Микробиология. – 1998. – 67:2: 24954.
11. Герасимова, М.И. Деградация почв: методология и возможности картографирования / М.И. Герасимова, Н.А. Караваева, В.О. Таргульян // Почвоведение. – 2000. – №3. – С. 358-365.
12. Гинзбург, К.Е. Фосфор основных типов почв СССР. – М.: Наука. 1981. - 245 с.
13. Горбатов, В.С. Устойчивость и трансформация оксидов тяжелых металлов (Zn, Pb, Cd) в почвах / В.С. Горбатов // Почвоведение. – 1988. – №1. – С. 35-43.
14. Груздева, Л.П., Яские, А.А., Тимофеев, В.В. Почвоведение с основами геоботаники / Л.П. Груздева и др. – М.: Агротехиздат, 1991. – С. 9-33.
15. Гутенев, В.В., Денисов, В.В., Денисова, И.А., Камышев, А.П., Москаленко А.П. Промышленная экология: учебное пособие / Под ред. В.В. Денисова. – М: ИКЦ «МарТ», 2007. – С. 334-335.
16. Другов, Ю.С., Родин, А.А. Пробоподготовка в экологическом анализе. – Санкт-Петербург: Анатолия, 2002. – С. 549-550.
17. Емцев, В.Т. Микробиология: учебник для вузов / В.Т. Емцев. – М.: Дрофа, 2006. – С. 241-244.
18. Ефимов, В.Н. Трансформация фосфора минеральных удобрений в дерново-подзолистой почве / В.Н. Ефимов, Л.А. Трусова, Т. Б. Диалло // Почвоведение. – 1994. – № 10. – С. 86-92.
19. Ефремов, В.В. Основные направления химизации земледелия с учетом баланса питательных веществ и плодородия почв / В.В. Ефремов, И.А. Губанкова // Параметры плодородия основных типов почв. – М.: Агропромиздат, 1988. – С. 201-214.

20. Ефремов, Е.Н. Контроль за содержанием тяжелых металлов в удобрениях и химических мелиорантах почвы / Е.Н. Ефремов, В.В. Носиков // Влияние химизации земледелия на содержание тяжелых металлов в почвах сельскохозяйственных угодий и продукции растениеводства. – М., 1988. – С.91-100.
21. Звягинцев, Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии: Учебное пособие / Д.Г. Звягинцев. – М.: Изд-во МГУ, 1991. – 304 с.
22. Зенова, Г.М., Степанов, А.Л., Лихачева, А.А., Манучарова, Н. А. Практикум по биологии почв: Учеб. пособие / Г.М. Зенова и др. – М.: Издательство МГУ, 2002. – С. 5-11.
23. Иванов, И.А. Изменение свойств подзолистых и дерново-подзолистых почв на песчаных породах при окультуривании / И.А. Иванов, А.И. Иванов, Н.А. Цыганова // Почвоведение. – 2004. – № 4. – С. 489-499.
24. Иванов, И.А. Применение удобрений на дерново-подзолистых почвах с высокими запасами фосфора и калия / Б.С. Иванов, А.И. Иванов, Н.И. Семенова // Агрохимия. – 1996. – № 4. – С. 9-20.
25. Казеев, К.Ш., Колесников С.И., Вальков В.Ф. Биологическая диагностика и индикация почв: методология и методы исследований. / Под ред. К.Ш.Казеева. – Ростов н/Д: Изд-во РГУ, 2003. – 216 с.
26. Казов, М.Н., Казова, Р.А., Альжанов, Т.М. Термохимическая подготовка сырья для электротермического производства фосфора: монография / М.Н. Казова, Р.А. Казова, Т.М. Альжанов. – Алма-Ата: Наука, 1989. – 216 с.
27. Казова, М.Н., Казова, Р.А. Физико-химические основы переработки феррофосфора: монография / М.Н. Казова, Р.А. Казова. – Алма-Ата: Наука, 1983. – 243 с.
28. Касицкий, Ю.И. Об оптимальном содержании подвижного фосфора в почвах Нечерноземной зоны СССР / Ю.И. Касицкий // Агрохимия. – 1991. – № 6. – С.107-112.

29. Касицкий, Ю.И. Общие вопросы установления оптимального содержания подвижного фосфора в почвах / Ю.И. Касицкий // Агрохимия. – 1988. – № 10. – С.129-140.
30. Ковда, В.А. Биогеохимия почвенного покрова / В.А. Ковда. – М.: Наука, 1985. – 263 с.
31. Колесников, С.И., Коваленко, В.Д., Казеев, К.Ш., Вальков, В.Ф. Влияние зафязнения тяжелыми металлами на содержание в черноземе обыкновенном подвижных форм азота и фосфора / С.И. Колесников и др. // Агрохимия. – 1999. – К 2. – С. 73-78.
32. Колесников, СИ., Казеев, К.Ш., Вальков, В.Ф. Экологические последствия загрязнения почв тяжелыми металлами. – Ростов-на-Дону. : СКНЦ ВШ, 2000. – С. 128-141.
33. Королева, И.Е. Критерии выбора показателей устойчивости почв к агроистощению по фосфору и калию / И.Е. Королева // Устойчивость почв к естественным и антропогенным воздействиям. – М: Почвенный ин-т им. В.В.Докучаева РАСХН, 2002. – С. 38.
34. Кудеярова, А.Ю. Фосфатогенная трансформация почв / А.Ю. Кудеярова. – М.: Наука, 1995. – 285 с.
35. Кудеярова, А.Ю. Продукты взаимодействия фосфорных удобрений с почвами / А.Ю. Кудеярова // Почвоведение. – 1981. – № 9. – С. 113-121.
36. Кудеярова, А.Ю. Роль микроорганизмов в процессах трансформации фосфатов в почвах / А.Ю. Кудеярова // Агрохимия. – 1981. – №11 – С. 135-144.
37. Кулаев, И.С. Биохимия высокомолекулярных полифосфатов / И.С. Кулаев. – М.: МГУ, 1975.– 248 с.
38. Кулаковская, Т.Н. Оптимизация агрохимической системы почвенного питания растений / Т.Н. Кулаковская. – М.: Агропромиздат, 1990. – 219 с.

39. Макаров, М.И. Влияние промышленного загрязнения на содержание фосфора в гуминовых кислотах дерново-подзолистых почв / М.И. Макаров // Вестник Московского ун-та. Сер. 17. Почвоведение. – 1987. – №2. – С.31-35.
40. Макаров, М.И. Соединения фосфора в гумусовых кислотах почвы / М.И. Макаров // Почвоведение. – 1997. – № 4. – С. 458-466.
41. Макаров, М.И., Недбаев, Н.П., Курмышева, Н.А., Ефремов, В.Ф. Трансформация органических соединений фосфора при длительном использовании разных систем земледелия / М.И. Макаров и др. // Агрохимия. – 1997. – № 7. – С.5-11.
42. Методические рекомендации по выявлению деградированных и загрязненных земель – М., 1995.
43. Минеев, В.Г. История и состояние агрохимии на рубеже XXI века. Книга первая. – М.: Изд-во МГУ, 2002. – 616 с.
44. Минеев, В.Г. Экологические проблемы агрохимии. – М.:МГУ, 1988. – С.194-249.
45. Мино, Т. Селекция полифосфат-аккумулирующих бактерий для усовершенствованного биологического удаления фосфата в активированных илах при технологических процессах удаления сточных вод / Т. Мино // Биохимия. – 2000. – 65:3: 405-14.
46. Мотузова, Г.В., Безуглова, О.С. Экологический мониторинг почв / Г.В. Мотузова, О.С. Безуглова О.С. – М.: Академический Проект; Гаудеамус, 2007. — 237 с.
47. Муравьев, А.Г., Каррыев, Б.Б., Ляндзберг, А.Р. Оценка экологического состояния почвы Практическое руководство. / Под ред. к.х.н. А.Г. Муравьева. Изд. 2-е, перераб. и дополн. – СПб.: Крисмас+, 2008. – 216 с.
48. Несмеянова, М.А. Полифосфаты и ферменты полифосфатного обмена у *Escherichia coli* / М.А. Несмеянова // Биохимия. – 2000. – 65:3: 368-74.

49. Носко, Б.А., Бабынин, В.И., Юнакова, Т.А., Бурлакова, Л.Н. Изменение фракционного состава фосфатов чернозема типичного при длительном применении удобрений / Б.А. Носко и др. // Агрохимия. – 2003. – № 3. – С. 27-34.

50. Огороков, Л.А., Холоденко, В.П., Кулаев, И.С. Новое соединение - полимерный ортофосфат железа у различных грибов / Л.А. Огороков, В.П. Холоденко, И.С. Кулаев // Докл. АН СССР. – Москва, 1971. – 199:5: 1204-5.

51. Олейникова, А.А., Суржко, Л.Ф., Гарабаджиу, А.В. Микроорганизмы для биоремедиации почв, загрязненных ПАУ // Материалы пятого съезда общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. – Москва, 2008. – С.148-149.

52. Орлов, Д.С., Малинина, М.С., Мотузова, Г.В., Садовникова, Л.К., Соколова, Т.А. Химическое загрязнение почв и их охрана: Учебное пособие / Д.С. Орлов, М.С. Малинина, Г.В. Мотузова и др. – М.: Агрохимиздат, 1991. – С. 281-284, 269-271.

53. Орлов, Д.С. Горшкова, Е.И. Терская, Е.В., Салах, М.Д. Влияние гумуса, карбонатов и соединений железа на сорбцию фосфатов почвами / Д.С. Орлов и др. // Агрохимия. – 1991. – № 9. – С. 62-73.

54. Панин, А.М. Оценка сельскохозяйственных земель и использование ее результатов / А.М. Панин – Н. Новгород, 1993. – 95 с.

55. Панкова, Е.А. Деграционные почвенные процессы на сельскохозяйственных землях России / Е.А. Панкова, А.Ф. Новикова // Почвоведение. – 2000. – № 3. – С. 366-379.

56. Пат. 2531751 Российская Федерация, МПК⁷: С 02 F 3/34 С 02 F 3/30 С 02 F 1/52. Способ селективного извлечения фосфора в форме биомассы из твердых материалов. / Циммерманн Д., Дотт В. – © FindPatent.ru - патентный поиск, 2012-2016.

57. Петренко, Д. В. Влияние производства фосфорных удобрений на содержание стронция в ландшафтах : автореферат дис. канд. биол. наук : специальность 03.02.08 / Рос. гос. аграр. заоч. ун-т. – Москва, 2014. – 23 с.

58. Пименова, Е.В., Леснов, А.Е. Химические методы в агроэкологическом мониторинге почвы : Учебное пособие / Е.В. Пименова, А.Е. Леснов, ФГОУ ВПО Пермская ГСХА. – Пермь: Изд-во ФГОУ ВПО Пермская ГСХА, 2008. – С. 87-89.
59. Платонов, И.А. Практическая аналитическая химия / И.А. Платонов, Ю.С. Другов, А.А. Родин. – Самара: Порто-принт, 2015. – С. 97-98.
60. Попова, Л.Ф., Никитина, М.В. Кумуляция, миграция и трансформация фосфора в почвах города Архангельска / Л.Ф. Попова, М.В. Никитина // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 9-1. – С.70-74.
61. Прожорина, Т.И., Затулей, Е.Д. Химический анализ почв : Лабораторный практикум для вузов / Прожорина Т.И., Затулей Е.Д. – Воронеж : Воронежский гос. ун-т, 2009. – С. 3-5.
62. Прудникова, С.В., Сорокин, Н. Д., Сарматова, Н. И., Реммель, Н. Н., Выдрякова, Г. А. Микробиология с основами вирусологии : методы микробиологического исследования наземных, водных и воздушных экосистем. : лаб. практикум / С. В. Прудникова, Н. Д. Сорокин, Н. И. Сарматова и др. – Красноярск: ИПК СФУ, 2008. – С. 34-36.
63. Саруханова, Л.Е., Волина, Е.Г. Санитарно-микробиологическое исследование объектов внешней среды (почвы, воды, воздуха): Учебно-методическое пособие. – М.: РУДН, 2010. – С. 3-4.
64. Сборник методических и нормативных документов по контролю качества окружающей среды. Часть IV. Почвы. – Н. Новгород, 2000. – 221 с.
65. Снакин, В.В. Экологическая оценка состояния почв: попытка количественного подхода / В.В. Снакин, А.А. Присяжная // Изв. РАН. Сер. биол. – 1995. – № 1. – С. 105-109.
66. Спирина, В.З., Соловьева, Т.П. Агрохимические методы исследования почв, растений и удобрений : учебное пособие / В.З. Спирина, Т.П. Соловьева. – Томск: Издательский Дом Томского государственного университета, 2014. – С. 28-29.

67. Ступин, Д. Ю. Загрязнение почв и новейшие технологии их восстановления: Учебное пособие / Д.Ю. Ступин. – СПб.: Издательство «Лань», 2009. – С. 26-28, 260-261, 269-272.

68. Терехова, В.А., Домашиев, Д.Б., Каниськин, М.А., Степачев, А.В. Экотоксикологическая оценка повышенного содержания фосфора в почвогрунте по тест-реакциям растений на разных стадиях развития / В.А. Терехова и др. // Проблемы агрохимии и экологии. – 2009. – №3. – С.21–26.

69. Терещенко, Н.Н. Бактериальные удобрения: проблемы и перспективы применения / Н.Н. Терещенко // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2007. – №7. – С. 14-20.

70. Терещенко, Н.Н., Бубина, А.Б. Микробиологические критерии оценки устойчивости основных экологических функций почвы и эффективность почвозащитных технологий / Н.Н. терещенко, А.Б. Бубина // Биотехнология: состояние и перспективы развития: Материалы 4-го Московского Междунар. Конгресса. – Москва, 2007. – ч.2. – С. 116.

71. Терещенко, Н.Н., Лушников, С.В. К вопросу о рациональном применении минеральных удобрений для ускорения микробиологической деструкции нефтяных углеводородов в почве / Н.Н. Терещенко, С.В. Лушников // Контроль и реабилитация окружающей среды: Материалы IV Междунар. симпозиума. – Томск, 2004. – С. 117–118.

72. Тимофеев, М.А. Биотестирование элюатов из модельных почвогрунтов с избыточным содержанием фосфорно-калийных компонентов / М.А. Тимофеев, Т.О. Попутникова, А.П. Еськов, В.А. Терехова // Водные экосистемы, организмы, инновации: тезисы 10-й межд. конф. – Москва, 2008. – С. 137-140.

73. Титова, В.И. Оптимизация питания растений и эколого-агрохимическая оценка применения удобрений на почвах с высоким содержанием подвижных соединений фосфора: Автореф. дис. докт. с.-х. наук: Санкт-Петербургский государственный аграрный университет / В.И. Титова. – Санкт-Петербург, Пушкин, 1998. – 40 с.

74. Титова, В.И., Дабахова, Е.В., Дабахов, М.В. Рекомендации по оценке экологического состояния почв как компонента окружающей среды / Нижегородская гос. с.-х. академия. – Н. Новгород: НГСХА, Изд-во ВВАГС, 2004. – 68 с.

75. Титова, В.И., Варламова, Л.Д., Морозова, Е.В., Трифонов, А.Ю. Трансформация почвенных свойств в результате антропогенного воздействия / В.И. Титова, Л.Д. Варламова, Е.В. Морозова, А.Ю. Трифонов // Проблемы антропогенного почвообразования. Тез. докл. межд. конф. – М.: РАСХН, Почв. институт им. В.В. Докучаева РАСХН, 1997. – Т.1. – С. 203-205.

76. Тихомирова, Н.Н., Орлеанский, В.К. Моделирование фосфатоосаждения в лабораторных культурах / Н.Н. Тихомирова, В.К. Орлеанский // Литология и полезные ископаемые. 1994 – 2: 135-40.

77. Христенко, А.А. Динамика основных показателей фосфатного режима почв в процессе их экстенсивного использования / А.А. Христенко // Агрохимия. – 2003. – №2. – С.10-15.

78. Чумаченко, И.Н. Фосфор в жизни растений и плодородии почв. – М.: ЦИНАО, 2002. – 124 с.

79. Чумаченко, И.Н., Сушеница, Б.А., Беррахиль, А. Формы фосфатов в почвах, методы их определения и использование растения-ми / И.Н. Чумаченко и др. // Агрохимия, 1971. – №3. – С. 32-45.

80. Чумаченко, И.Н., Сушеница, Б.А., Алиев, Ш.А. Агрохимия фосфора и нетрадиционного минерального сырья. – М., 2001. – 290 с.

81. Шапошникова, И.М., Лабынцев, А.В. Фосфатный режим чернозема обыкновенного Ростовской области и эффективность фосфорных удобрений / И.М. Шапошникова, А.В. Лабынцев // Агрохимия. – 1998. – № 9. – С.53-57.

82. Шафран, С.А. Динамика применения удобрений и плодородие почв / С.А. Шафран // Агрохимия. – 2004. – № 1. – С. 9-17.

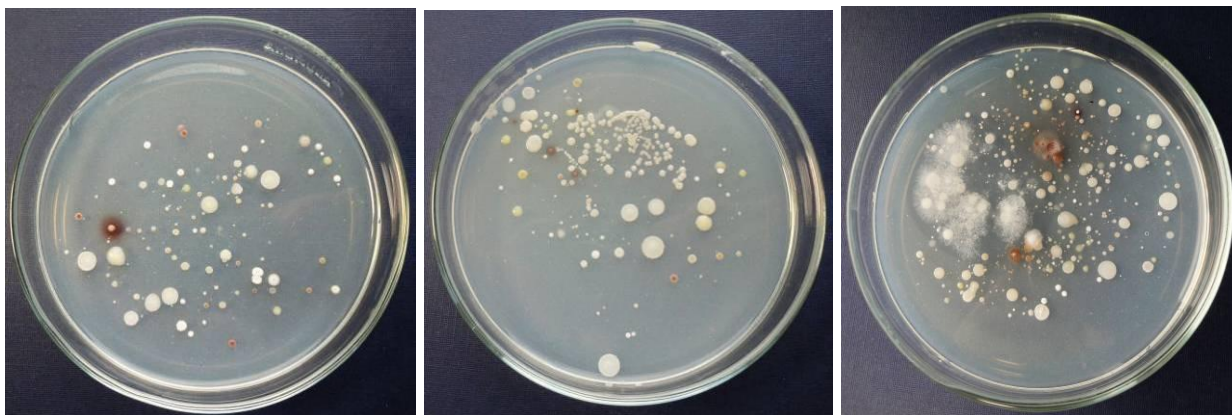
83. Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., Okon, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. – *Crit. Rev. Plant Sci.* – 2003. – P. 107-149.
84. Gallego, J.R., Loredó, J., Llamas, J.F., Vazquez, F., Sanchez, J. Bioremediation of diesel-contaminated soils: evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation / J.R. Gallego // *Biodégradation.* – 2001. – № 12. – P. 325-335.
85. Grant, W.D. Cell wall teichoic acid as a reserve phosphate source in *Bacillus subtilis* / W.D. Grant // *J. Bacteriol.* – 1979. – 137:1: 35-43.
86. Klijn, F. Environmental susceptibility to chemicals: from processes to patterns, with special reference to main characteristics and special scales. Vulnerability mapping in Europe / F. Klijn – 1991. – P. 9-17.
87. Kornberg, A. Inorganic polyphosphate, toward making a forgotten polymer unforgottable / A. Kornberg // *J. Bacteriol.* – 1995. – 117: 491-6.
88. Kornberg, A., Rao, N.N. & Ault-Rich D. Inorganic Polyphosphate: a molecule with many functions / A. Kornberg, N.N. Rao & D. Ault-Rich // *Ann Rev Biochem.* – 1999. – 68: 89-125.
89. Kulaev, I.S. & Kulakovskaya, T.V. Polyphosphate and phosphate pump / I.S. Kulaev & T.V. Kulakovskaya // *Ann. Rev. Microbiol.* – 2000. – 54: 709-34.
90. Kulaev, I.S., Vagabov, V.M. & Kulakovskaya, T.V. New aspects of inorganic polyphosphate metabolism and function / I.S. Kulaev & T.V. Kulakovskaya // *J. Bioscience and Bioengineering.* – 1999. – 88:2:111-30.
91. Lu, H.G., Zhong, L., Chang, K.P. & Docampo R. Ca²⁺ storage by acidocalcisomes from *Leishmania amazonensis* / H.G. Lu, L. Zhong, K.P. Chang & R. Docampo // *J. Biol. Chem.* – 1997. – 272: 9464-73.
92. Olderman, L.R. World Map of the Status of Human-induced Soil Degradation / L.R. Olderman, R.T.A. Hakkeling, W.G. Sombroek – *ISRIC/UNEP*, 1992.

93. Pritchard, P.H., Mueller, I.J.G., Rogers, J.C., Kremer, F.V., Glaser, J.A. Oil spill bioremediation: experiences, lessons and results from the Exxon Valdez oil spill in Alaska / P.H. Pritchard // *Biodégradation*. – 1992. – № 3. – P. 315-335.

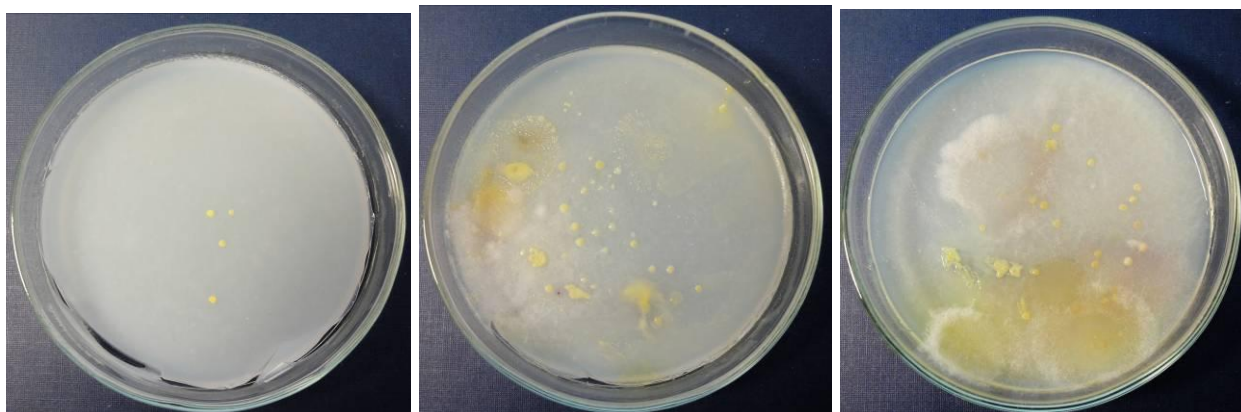
94. Vercesi, A.E. & Docampo, R. Sodium-proton exchange stimulates Ca^{2+} release from acidocalcisomes of *Trypanosoma brucei* / A.E. Vercesi & R. Docampo // *J. Biochem.* – 1996. – 315: 165-70.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

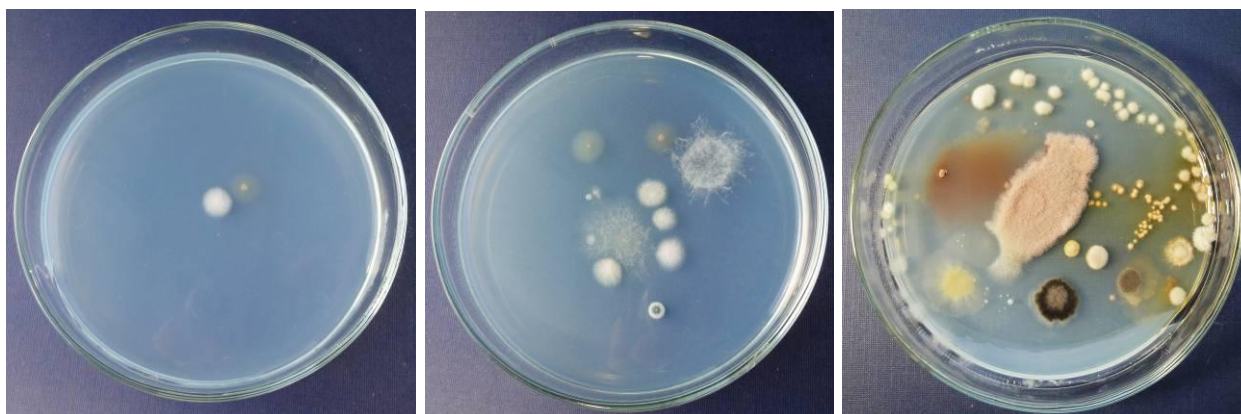
Динамика роста колоний микроорганизмов почвы с территории ОАО «Фосфор» на фосфат-содержащих средах



Фотографии посевов на аспарагиновую среду с добавлением FePO_4 на 7, 14 и 21 день роста



Фотографии посевов на аспарагиновую среду с добавлением $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ на 7, 14 и 21 день роста



Фотографии посевов на аспарагиновую среду с добавлением $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ на 7, 14 и 21 день роста

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Фотографии культур микроорганизмов, выделенных из почвы с территории ОАО «Фосфор»



род Arthrobacter



род Bacillus



род Mycobacterium



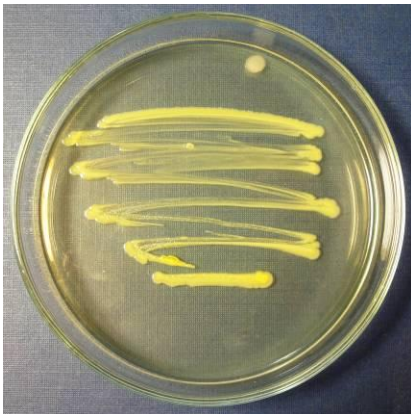
род Azotobacter



род Bacillus



род Bacillus



род Micrococcus



род Nocardia