

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДНЫХ ФАКТОРОВ НА РАЗВИТИЕ ПОЧВЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ И ЕЁ УЧАСТИЕ В ВОССТАНОВЛЕНИИ ПЛОДОРОДИЯ ТЕХНОГЕННО-НАРУШЕННЫХ ЗЕМЕЛЬ

INFLUENCE OF NATURAL FACTORS ON DEVELOPMENT OF A SOIL MICROFLORA AND ITS PARTICIPATION IN INCREASE IN FERTILITY OF THE TECHNOGENIC BROKEN LANDS

L. Erofeevskaia

Summary. Influence of natural factors on microbes the of soils of Yakutia is studied. The analysis of biological activity of soil ecosystems in the conditions of oil spill is carried out. It is established, the leading factors affecting on biological activity of soils and processes of its self-cleaning from naphtha are temperature, reaction of the soil environment, air oxygen access, moisture exchange. It is established that naphtha suppresses development of bacteria fixing nitrogen of the atmosphere and microorganisms destroying cellulose. Stimulates body height of sour bacteria and pathogenic mold fungi. The importation of biological products with simultaneous crops of the zoned grades of a pyreynik of Siberian (*Elymus sibiricus*) and a herd grass of meadow (*Phleum pratense*) is preferable to reduction of the deadlines of rehabilitation skirted lands. High performance of native microorganisms of the oil products destroying naphtha to transformation in climatic conditions of Far North is shown.

Keywords: petropollution, microorganisms, destruction, recultivation, phytotoxicity, naphtha, biological products.

Ерофеевская Лариса Анатольевна

*Научный сотрудник, ФГБУН Институт проблем нефти и газа
Сибирского отделения Российской академии наук
ipro@ipng.usn.ru*

Аннотация. Изучено влияние природных факторов на микробиоценоз мерзлотных почв Якутии. Проведен анализ биологической активности почвенных экосистем в условиях нефтяного разлива. Установлено, ведущими факторами, оказывающими влияние на биологическую активность почв и процессы её самоочищения от нефти являются температура, реакция почвенной среды, доступ кислорода воздуха, влагообмен. Установлено, что нефть подавляет развитие азотфиксирующих и целлюлозолитических микроорганизмов. Стимулирует рост гнилостных бактерий и патогенных плесневых грибов. Для сокращения сроков реабилитации нарушенных земель предпочтительно внесение биопрепаратов с одновременным посевом районированных сортов пырейника сибирского (*Elymus sibiricus*) и тимофеевки луговой (*Phleum pratense*). Показана высокая эффективность аборигенных углеводородокисляющих микроорганизмов к трансформации нефтепродуктов в природно-климатических условиях Крайнего Севера.

Ключевые слова: нефтезагрязнение, углеводородокисляющие микроорганизмы, деструкция, рекультивация, фитотоксичность, нефть, биопрепараты.

На современном этапе развития нефтедобывающей и перерабатывающей промышленности, разработка эффективных и экологически безопасных методов реабилитации нарушенных земель приобретает актуальное значение. Необходимость такого рода исследований связана с участившимися за последние годы аварийными разливами нефти и нефтепродуктов (НП). Так, только за последние пять лет на территории республики произошло более 130 аварий с попаданием нефтяных загрязнений в окружающую среду.

Основными факторами отрицательного воздействия нефтяного загрязнения экосистем являются токсическое действие углеводородов нефти на биологические объекты и изменение физико-химических свойств почвы [1, С. 121–150; 2, С. 59–64.]. В результате обволакивания почвенных частиц нефтью происходит нарушение водного и воздушного режимов, нарушается почвенный гомеостаз. Развивается токсикоз и дисбактериоз почв,

что приводит к угнетению развития корневой системы растений, нарушению функций репродуктивных органов, фотосинтеза и дыхания. Возрастающий в составе гумуса нерастворимый остаток ухудшает плодородие почв. Что наносит ощутимый экономический ущерб земледелию.

В настоящее время довольно подробно изучаются процессы регенерации биоценозов на аварийных территориях, в результате деструкции нефтепродуктов (НП) аборигенными углеводородокисляющими микроорганизмами (УОМ). Апробированы биологические способы, в основу которых положены активация метаболической активности естественной микрофлоры и внесение в почву специально разработанных промышленных биопрепаратов [3, С. 391–394; 4, С. 1023–1026.].

Установлено, что вследствие длительного периода адаптации активность специально внесенных

в мерзлотные почвы популяций микроорганизмов, входящих в состав биопрепаратов, выпускаемых промышленностью, быстро снижается вплоть до их исчезновения. В результате эффективность обработки почв нефтеструктурами, не адаптированными к суровым природно-климатическим условиям Якутии становится мало эффективной или сводится к нулю.

Эти обстоятельства делают крайне востребованными научные исследования по выделению и изучению штаммов аборигенных УОМ, способных к активной деградации нефти и НП при положительных низких температурах.

Целью настоящей работы являлось изучение влияния физических, геохимических и агрохимических факторов на развитие аборигенной нефтеокисляющей микрофлоры и возможности её применения в процессах биологической биоремедиации и реабилитации нарушенных земель в условиях Якутии.

Объектами для исследований служили фоновые и нефтезагрязненные образцы почв, отобранные с аварийных территорий нефтегазового комплекса (НГК) Якутии.

Для достижения цели были поставлены задачи:

Изучить биологическую активность фоновых и нефтезагрязненных мерзлотных почв.

1. Исследовать влияние физических, геохимических и агрохимических факторов на развитие микрофлоры, участвующей в повышении почвенного плодородия.
2. Из объектов окружающей среды выделить ассоциации УОМ, пригодные для эффективной очистки нефтезагрязненных почв при низких положительных температурах.
3. Провести лабораторно-полевые эксперименты по очистке почв от нефти биопрепаратами на основе аборигенных УОМ.
4. Определить эффективность деградации нефтяных углеводородов до, и после проведения микробиологической обработки загрязненных почв.

Материалы и методы исследований

Образцы нефтезагрязненных почв отбирали на глубине 0–10 см, 10–20 см, в некоторых точках — 40, 60, 100 см, исходя из того, чтобы каждый образец представлял собой часть почвы, типичной для генетических горизонтов.

Для характеристики природного регионального фона были изучены контрольные пробы почв, не ис-

пытывающие на себе нефтяного воздействия, отобранные в удалении от загрязненных объектов на 500 и 1000 м.

Культивирование и определение нефтеокисляющей активности УОМ осуществляли методом жидких накопительных культур в мезофильном и психрофильном режимах на минеральной среде Мюнца [5, С. 1024–1030]. В качестве источника углеводорода использовали нефть Талаканского месторождения, с содержанием 0,82% парафиновых и 12,4% смолистых веществ [6, С. 221–229].

Посевы инкубировали в термостатированных качалочных установках «УВМТ-12–250». Рост УОМ оценивали методом предельных разведений с последующим подсчетом выросших колоний.

Натурные эксперименты по самоочищению мерзлотных почв от нефти и НП проводили в условиях открытой экосистемы в опытных участках, разбитых на аварийных площадках НГК Якутии.

Контроль за процессами очистки почв от нефтезагрязнений в процессе биологической деградации проводили, руководствуясь РД 39–0147098–90 Инструкция по контролю за состоянием почв на объектах предприятий Миннефтегазпрома.

Экспериментальная часть

В качестве примера в настоящей работе приведены результаты экспериментальных исследований, проведенных на мерзлотной лугово-суглинистой почве в условиях Центральной Якутии.

На контрольной площадке отбора проб сделана четыре прикопки глубиной 80 см. Верхний слой почвы уплотнен, имеет обилие корней травянистых растений. На горизонте 0–10 см профиль темно-серый, легкосуглинистый, сухой, при растирании пылит. От HCl не вскипает. Горизонт 10–20 см буровато-серый, плотный, легкосуглинистый с обилием корневых волосков. От HCl не вскипает. На глубине 20–80 см светлосерый, уплотненный, слегка влажный, среднесуглинистый, корневые волоски в незначительном количестве. Для горизонта 0–10 см характерны низкое и среднее содержание гумуса (4–8%), не высокая влажность (20–30%), средняя и слабая засоленность (0,3–2,25), тип засоленности хлоридно-сульфатный, щелочная реакция среды (7,74–8,53).

По данным геохимических исследований, выход НП перед проведением экспериментальных работ составил от 64207 до 186079 мг/кг, что соответствует очень

Таблица 1. Пейзаж выделенных культур.

Выделенная микрофлора	Нефтезагрязненные почвы				Чистые (фоновые) почвы	
	T-I	T-III	T-IV	T-V	T-VI	T-VII
	N62o01.392' E129o44.267'	N60o54.067' E132o03.060'	N60o54.063' E132o03.046'	N60o54.028' E132o03.033'	N60o54.186' E132o02.754'	N60o54.113' E132o03.434'
Micrococcus	+	+	+	+	+	+
Acinetobacter	-	+	+	-	+	+
Pseudomonas	-	+	+	-	-	-
Bacillus	+	+	+	+	+	+
Clostridium	+	+	+	+	-	-
Escherichiae	+	+	-	-	-	-
Klebsiella	+	-	+	+	+	+
Citrobacter	-	+	+	+	-	-
Proteus	+	+	+	+	-	-
Aspergillus	+	+	+	+	+	+
Penicillium	-	-	-	-	+	+
Fusarium	+	+	-	-	-	+
Candida	-	-	-	+	+	+
Actinomyces	-	-	-	-	+	+
Azotobacter	-	-	-	-	+	+
Cellulomonas	-	-	-	-	+	+

высокому уровню загрязнения. На дату постановки эксперимента (17 июня) уровень мерзлого грунта отмечен на глубине 30–38 см от поверхности.

Близкое залегание мерзлоты к органогенному горизонту, отрицательно повлияло на развитии полезной почвенной микрофлоры и задерживало начало вегетации, которая и без того в течение всего периода проведения экспериментальных работ проходила вяло.

По средним показателям температура почвенного горизонта на данной территории, в течение 3-х вегетационных сезонов, на глубине 20 см, составляла в среднем +8°C; на глубине 10 см +11 + 16°C.

Продолжительность благоприятных дней с оптимальной температурой, для развития наиболее распространенных в природе групп мезофильных УОМ, в районе исследований зафиксирована в течение 78 дней в 1 год проведения полевых работ (май — 6; июнь — 24; июль — 25; август — 23; сентябрь — 0 дней); на 2 год — также 78 дней (май — 3; июнь — 24; июль — 27; август — 18; сентябрь — 6 дней); на 3 год — 71 день (май — 5; июнь — 17; июль — 26; август — 21; сентябрь — 2 дня), что характеризует короткий вегетационный период данной местности (на юге он равен 120–130 суток), оказывающий значительное влияние на скорость микробиологических процессов и биологической активности почв.

На способность почвы поглощать солнечное тепло оказало влияние и уровень содержания влаги, который на протяжении всего периода исследований был недостаточно высоким и составлял 14–58% (на глубине 20 см), в разных точках отбора проб. Тогда, как для успешного развития большинства известных групп УОМ, оптимальная влажность почвы должна составлять не менее 60%.

Наиболее засушливым был 2-й год экспериментальных работ, когда уровень влажности на глубине 10 см был минимально 10,6% и максимально — 21,3%.

Немаловажную роль в развитии аборигенной нефтеокисляющей микрофлоры сыграл pH почвенного раствора. В то время, как оптимальным для развития УОМ и других полезных сапрофитных микроорганизмов считается pH 6,5–7,2, в почвах экспериментальных участков pH составил 7,7–8,5. Сильно щелочная среда, недостаток подвижного фосфора и других микроэлементов оказали негативное влияние на развитие многих бактерий и микроскопических грибов, участвующих в очистке почв от НП.

Учитывая влияние физических факторов, можно сделать вывод о том, что внесение в нефтезагрязненные почвы на данной территории, промышленных биопрепаратов, содержащих мезофильные группы УОМ, будет малоэффективным. Для сокращения сроков нефтеокис-

ления и достижения фоновых показателей концентрации углеводов в почвах на загрязнённой площади требуются биопрепараты, содержащие предпочтительно психрофильную или психротолерантную микрофлору, способную к метаболизму и деструкции НП при температуре +4+20°C.

Изучение изменения структуры микробного ценоза мерзлотных почв под влиянием разных агротехнических приемов (минеральные удобрения, фитомелиорация, применение сорбентов и биопрепаратов, окисляющих углеводороды нефти) устанавливали поэтапно:

- ◆ в исходной почве до проведения биоремедиации;
- ◆ в период наибольшей метаболической активности внесённых в нефтезагрязнённые почвы УОМ;
- ◆ в конце вегетационного периода.

По результатам лабораторного исследования установлено, что нефтяной разлив оказал влияние на снижение биологической активности почв и грунтов аварийной территории. Было отмечено, что нефть подавляет развитие азотфиксаторов и целлюлозолитиков. Стимулирует рост гнилостных бактерий, черной и дымчатой плесени; неферментирующих бактерий родов *Pseudomonas* и *Acinetobacter* и микрофлоры, ассимилирующей в субстрат сероводород. Микрококки и споровые бактерии хорошо размножались как в нефтезагрязнённых почвах, так и в субстратах, не испытывающих на себе нефтяного воздействия (таблица 1).

В течение первых 2-х лет после загрязнения из почв экспериментальных участков выделены энтеробактерии родов: *Escherichiae*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*. Что свидетельствует о толерантности энтеробактерий к нефтезагрязнению. Следует отметить, что эта группа микроорганизмов очень часто встречается в открытых экосистемах Якутии и является фактором, формирующим состояние здоровья населения [7, с. 38; 8, с. 39].

К началу 2-го вегетационного периода, по мере деструкции нефтезагрязнения, в почвах экспериментальных участков еще более увеличилась численность микромицетов и неферментирующих бактерий и сократилось видовое разнообразие энтеробактерий, появились целлюлозолитические грибы.

Количество нитрифицирующих бактерий, на протяжении всего вегетационного периода, было ниже на 2–3 порядка, чем в фоновых пробах, и составляла в точках T-I; T-II; T-III; T-IV не более 7000 и в точках T-V; T-VI; T-VII не более 50000 клеток на 1г абсолютно сухого веса (АСВ) почвы.

Микрофлора, потребляющая минеральные формы азота при посеве на крахмал-аммиачный агар практически не изменилась и была на одном уровне до и после проведения биорекультивации. Представители данной группы на территории нефтебазы отнесены к условным патогенам *Clostridium perfringens*, титр которых составлял 0,001–1,0 на 1 г почвы в разных контрольных точках.

Микробиологический анализ, проведенный спустя 45 суток после первого внесения в нефтезагрязнённую почву УОМ, показал сокращение численности аммонификаторов. Уменьшение их числа, после внесения биопрепаратов, вероятно, было связано с тем, что внесённая микрофлора обладала антагонистическими свойствами по отношению к гнилостным бактериям, накопившимся в почвах к началу проведения биоремедиации в результате нарушения водно-воздушного режима. Снижение численности гнилостных бактерий привело не только к сокращению количества аммонифицирующих бактерий, но также к усилению деструкции нефтепродуктов и к оздоровлению почв опытных участков.

Интенсивный рост на нефтезагрязнённом субстрате показали культуры почвенных бацилл, псевдомонад и аспергилл. Было выявлено, что на 14-е сутки биомасса бактериальных культур псевдомонад увеличивалась на 2–3 порядка по сравнению с исходной, а биомасса почвенных бацилл — на 1 порядок.

Изучение влияния pH среды на накопление биомассы показало, что оптимальной для наращивания биомассы, выделенных из почв аварийного объекта аборигенных УОМ является pH=7,0. Биомасса микроорганизмов при этом составила до 1·107КОЕ/мл. Тогда как при pH=6,0 биомасса УОМ составила до 1·104КОЕ/мл и при pH=8,0 — до 1·105КОЕ/мл.

Изучение влияния температурного режима на накопление биомассы УОМ показало, что наиболее оптимальной температурой для почвенных бацилл является +30°C, количество клеток за 7 суток роста при этом увеличилось в 100 раз, а для культуры псевдомонад +20°C, количество клеток при этом увеличилось за 7 суток в 7 раз. Лимитирующей оказалась температура ниже +7°C и выше +42°C.

В целом, лабораторно-полевые исследования показали, что УОМ, выделенные из почв нефтебазы обладают высокой активностью к нефти. Эта активность усиливается, когда в процессе проведения рекультивационных работ производится минеральная подкормка азотфосфорными удобрениями и, путём рыхления, обеспечивается в почву доступ кислорода воздуха.

До и после проведения экспериментальных работ, очищаемые от НП почвы были протестированы на фитотоксичность. Токсическое влияние биопрепаратов и нефтепродуктов на растения оценивали биотестом с помощью тест-растений: пшеница (*Triticum aestivum* L.) сорт «Приленская-19» и овёс обыкновенный (*Avena sativa*).

Установлено, что остаточное количество НП в почвах аварийного участка подавляло всхожесть пшеницы и овса. Наблюдалось также подавление роста корневой системы и зелёной части проростков.

Всходы семян в загрязнённых нефтью образцах составили 0–44%, тогда как в контрольных «чистых» образцах этот показатель был равен 82–96%.

После проведения 1-го этапа биоремедиационных мероприятий токсичность снизилась, всхожесть повысилась с максимального значения 44% до 80%.

С целью интенсификации процессов биodeградации нефти была проведена пробная фиторекультивация опытного участка семенами районированного сорта травянистых растений: пырейника сибирского (*Clinelymus sibiricus* L.) и тимофеевка луговая (*Phleum pratense* L.). Посев трав проводили из расчёта 10 г семян на 1 м² нефтезагрязнённой почвы.

Через год после проведения экспериментальных работ высота растений достигала 20–30 см. Еще через год в опытных участках был зафиксирован густой травостой высотой до 80 см. В почве сформировался зрелый дерн с хорошо развитыми, плотно переплетёнными корневищами.

Таким образом, районированные сорта пырейника сибирского (*Elymus sibiricus*) и тимофеевка луговой (*Phleum pratense*) — нефтеустойчивые и быстронакапливающие вегетативную массу растения и могут рассматриваться как потенциальные фиторемедиаторы нефтезагрязнённых почв, в природно-климатических условиях Якутии.

С целью определения изменений, которые произошли с нефтью в процессе окислительной деструкции под действием микробных сообществ, образцы почв опытных делян, до проведения биоремедиации и по окончании полевого сезона, были экстрагированы на остаточное содержание в них НП.

В результате микробиологической обработки почв, деструкция нефти составила 77,59–97,41%. В то время, как в естественных условиях деструкция нефти в контрольном участке без внесения биопрепаратов составила 6,69%.

Выводы

1. По результатам лабораторного исследования установлено, что компоненты нефти подавляют биологическую активность мерзлотных почв. Сдерживают развитие азотфиксаторов и целлюлозолитиков. Стимулируют рост гнилостных бактерий, черной и дымчатой плесеней и микрофлоры, ассимилирующей в субстрат сероводород.

2. Углеводородокисляющие микроорганизмы, выделенные из нефтезагрязнённых почв Якутии, обладают высокой активностью к трансформации нефтепродуктов. Этот эффект усиливается, когда в процессе проведения рекультивационных работ производится минеральная подкормка в расчетных дозах и рыхление, обеспечивающие в почву доступ кислорода воздуха.

3. Установлена высокая эффективность восстановительных работ при внесении УОМ и одновременном посеве районированных травянистых растений: пырейника сибирского (*Elymus sibiricus*) и тимофеевки луговой (*Phleum pratense*). Растения проявили устойчивость к нефтезагрязнению, быстро накапливали вегетативную массу и могут рассматриваться как потенциальные фиторемедиаторы нефтезагрязнённых мерзлотных почв.

4. В результате биоремедиации почв с применением аборигенных УОМ степень деградации загрязнения за 2 вегетационных периодов составляет до 77,59–97,41%.

5. Использованный микробиологический метод очистки нефтезагрязнённых земель в почвенно-климатических условиях Якутии имеет преимущество перед другими, так как основан на использовании местных микроорганизмов, адаптированных к существованию в почвах конкретного региона.

6. Исследования по разработке биопрепаратов на основе аборигенных УОМ, показали, что данный метод является перспективным для проведения биорекультивации нефтезагрязнённых мерзлотных почв на различных объектах нефтегазового комплекса.

Работа проведена при финансировании Государственного контракта № 611 «Разработка технологии обезвреживания разливов нефти и нефтепродуктов на основе использования местных сорбентов, активированных микроорганизмами — нефтеструктурами».

Автор выражает благодарность коллективам ОАО «Саханефтегазсбыт» и лаборатории геохимии каустобиолитов ИПНГ СО РАН за содействие в успешном проведении лабораторных и полевых работ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гузев В. С. Роль почвенной микробиоты в рекультивации нефтезагрязненных почв / В. С. Гузев, С. В. Левин, Г. И. Селецкий и др. // Микроорганизмы и охрана почв. М.: Изд-во МГУ, 1989. — С. 121–150.
2. Халимов Э. М. Экологические и микробиологические аспекты повреждающего действия нефти на свойства почвы / Э. М. Халимов, С. В. Левин, В. С. Гузев // Вестн. МГУ. Сер. 17. 1996. № 2. — С. 59–64.
3. Киреева Н. А., Григориади А. С., Хайбулина Е. Ф. Ассоциации углеводородокисляющих микроорганизмов для биоремедиации нефтезагрязненных почв // Вестник Башкирского университета, 2009. — т. 14. — № 2. — С. 391–394.
4. Киреева Н. А., Водопьянов В. В., Григориади А. С., Новоселова Е. И., Багаутдинова Г. Г., Гареева А. Р., Лобастова Е. Ю. Эффективность применения биопрепаратов для восстановления плодородия техногенно-загрязненных почв // Известия Самарского научного центра Российской академии наук, 2010. — Т. 12. — № 1(4). — С. 1023–1026.
5. Керстен Д. К. Морфологические и культуральные свойства индикаторных микроорганизмов нефтегазовой съемки // Микробиология, 1963, № 5. — С. 1024–1030.
6. Зуева И. Н., Чалая О. Н., Лифшиц С. Х., Глязнецова Ю. С. Особенности загрязнения почв нефтепродуктами на объектах их хранения. Мат. Междунар. научно-практич. конф. «Прикладная экология Севера. Опыт проведенных исследований, современное состояние и перспективы». 20–21 марта 2003 г. Якутск. — 2003. — С. 221–229.
7. Ерофеевская Л. А. Санитарно-экологическая оценка почв экосистемы г. Якутска // Якутский медицинский журнал. ЯНЦ СО РАМН, 2007. — Вып.2(18). — с. 48.
8. Ерофеевская Л. А., Чернявский В. Ф., Антонов Н. А., Литвинова Л. Н. Методологический и методический подходы при микробиологических исследованиях снежных покровов в северных широтах // Якутский медицинский журнал. ЯНЦ СО РАМН, 2007. — Вып.2(18). — с. 39.

© Ерофеевская Лариса Анатольевна (ipog@ipng.ysn.ru)

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»

