РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЗАМАЗУЧЕННЫХ ЗЕМЕЛЬ АМГИНСКОЙ НЕФТЕБАЗЫ (ЦЕНТРАЛЬНАЯ ЯКУТИЯ)

THE RESULTS OF THE STUDY MICROBIAL ACTIVITY OF CONTAMINATED LAND AMGINSKIY TANK FARM (CENTRAL YAKUTIA)

L. Erofeevskaya

Summary. The results of microbiological studies of the soils of the emergency territory of the Amga oil depot located in the Central part of Yakutia are presented. It is established that in the course of self-restoration, soils were insufficiently cleared of hydrocarbonic pollution and are in ecological intensity. As signs of degradation of the earths serve rarity or absence of a vegetative cover, phytotoxicity, changes of physical and chemical properties of soil: formation locks soil structure, water repellency, salinity, high values pH, a lack of mobile phosphorus, nitrogen of nitrates, ammonia nitrogen, phytotoxicity.

Keywords: oil, microflora, bacteria, fungi, environmental safety, oil products, degradation, microorganisms, ecology, biological products, soil, hydrocarbonic pollution.

Ерофеевская Лариса Анатольевна
Н.с., ФГБУН Институт проблем нефти и газа Сибирского отделения РАН
lora-07.65@mail.ru

Аннотация. Представлены результаты микробиологических исследований почв аварийной территории Амгинской нефтебазы, расположенной в Центральной части Якутии. Установлено, что в процессе самовосстановления, почвы недостаточно очистились от углеводородного загрязнения и находятся в экологической напряженности. Признаками деградации земель служат изреженность или отсутствие растительного покрова, фитотоксичность, изменения физико-химических свойств почвы: образование глыбистости почвенной структуры, гидрофобность, засоленность, высокие значения pH, недостаток подвижного фосфора, азота нитратов, азота аммиака, фитотоксичность.

Ключевые слова: нефть, микрофлора, бактерии, грибы, экологическая безопасность, нефтепродукты, деградация, микроорганизмы, экология, биопрепараты, почва., углеводородное загрязнение.

Нефтегазовая отрасль Республики Саха (Якутия) развивается в условиях легко ранимой и с трудом восстанавливаемой природной среды. Проблема восстановления нарушенных экосистем в результате аварийных разливов нефти и нефтепродуктов в регионе актуальны и связаны, главным образом, с природно-климатическими условиями. Самоочищение нарушенных экосистем здесь идет не месяцы и не годы, а многие десятки лет. Причиной этому служат наличие многолетнемерзлых почвогрунтов, низкие температуры, слабая минерализация органических веществ, короткий вегетационный период, нарушение биологической активности почв.

В настоящее время одним из экологически обоснованных и наиболее эффективных методов восстановления почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами считается микробиологический метод, основанный на активации почвенных микроорганизмов, способных к утилизации нефтяных углеводородов. Для мерзлотных почв Якутии выбор нефтедеструкторов, эффективно работающих в климатических условиях севера, требует специальных исследований и мониторинга за процессами трансформации и биологической деструкции нефтезагрязнений.

Цель работы

Исследовать микробиологическую активность почв замазученных земель на территории Амгинской нефтебазы (Центральная Якутия)

Материалы и объекты исследований:

- нефтезагрязненные и условно чистые почвы и грунты;
- почвенные микроорганизмы.

Методы исследований

Пробы техногеннозагрязненных и фоновых почв отбирали на глубине 0–10 см, 10–20 см, в некоторых точках — 40, 60, 100 см, в соответствии с нормативными требованиями [1], исходя из того, чтобы каждый образец представлял собой часть почвы, типичной для генетических горизонтов.

Культивирование и определение нефтеокисляющей активности УОМ осуществляли методом жидких накопительных культур в мезофильном и психрофильном режимах на минеральной среде Мюнца [2]. Посевы инкубировали в термостатированных качалочных установках

Рис. 1. Место аварийного разлива нефти

Рис. 2. Место отбора проб почвы на микробиологические исследования

«УВМТ-12–250». Рост УОМ оценивали методом предельных разведений с последующим подсчётом 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.

Битумоиды из проб почв извлекали методом экстракции [3].

Биотестирование почвенных образцов на фитотоксичность проведено с использованием стандартной методики [4].

Исследования проведены на территориях НГК Якутии.

Результаты исследований

Экспериментальные работы по изучению микробиологической активности замазученных земель выполнены на аварийной территории Амгинской нефтебазы, расположенной в Центральной Якутии (рисунки 1; 2).

Нефтезагрязнённая площадка для проведения исследований, расположена ниже общей территории. Верхний слой представлен шлакосодержащими отходами, подсыпанными на высоту около 20 см. Опробование ручным буром показало, что нефть на данном участке проникла на глубину до 80 см. На центральной площадке нефтебазы остатки нефти пропитывали почву до глубины 20–25 см. На участке около пруда-испарителя нефтяное загрязнение проникло на глубину 15 см.

После отбора проб на микробиологические исследования, на замазученном участке выполнена опытная биологическая очистка. Опыты проводили с трёхкратным внесением в делянки с загрязненной почвой углеводородокисляющей микрофлоры (УОМ), выделенной непосредственно с замазученной территории. В деляны был добавлен привезённый чернозём и песок. В качестве органического удобрения внесён перегной 10 кг на 1 кв.м. Почва делян подкармливалась минеральным удобрением «Аммофоска». Рыхление почвы обеспечивало поступление кислорода воздуха.

Перед закладкой опытов были проведены агрохимические анализы почв.

На момент исследований почвы имели среднее содержание гумуса, щелочную реакцию среды, слабую засоленность, тип засоленности хлоридно-сульфатный (таблицы 1; 2).

Изучено влияние факторов окружающей среды на развитие почвенных микроорганизмов.

Продолжительность благоприятного вегетационного периода с оптимальной для развития наиболее

Таблица 1. Результат химического анализа водной вытяжки из почвенных образцов

№ обр.	В% от абсолютно сухой почвы							Милли — моль на 100 гр.							A	K	%
	K	HCO_3	Cl	SO_4	Ca	Mg	Na	K	HCO_3	Cl	SO_4	Ca	Mg	Na			
T-I	0,011	0,009	0,060	0,118	0,020	0,008	0,054	0,290	0,15	1,70	2,46	1,00	0,63	2,35	4,31	4,27	0,281
T-Y	0,001	0,021	0,004	0,014	0,008	0,002	0,005	0,025	0,35	0,10	0,30	0,38	0,13	0,20	0,75	0,74	0,054
T-YI	0,001	0,024	0,004	0,009	0,008	0,002	0,003	0,015	0,40	0,10	0,18	0,38	0,13	0,15	0,68	0,68	0,050
T-YII	0,001	0,020	0,003	0,014	0,008	0,002	0,005	0,025	0,33	0,08	0,30	0,38	0,13	0,20	0,71	0,74	0,052

Таблица 2. Агрохимические показатели почвенных образцов

№ образцов	Засоленность			pH водный	Гумус, %	Исследуемые показатели, мг/кг почвы			
	степень		тип			$N\text{-}NO_3$	P_2O_5	K_2O	$N\text{-}NH_4$
ГОСТ				26423–85	26213–91	26951–86	26209–91		26489–85
T-I	2,25	средняя	хлоридно-сульфатная	7,74	5,7	4,09	107	462	2,3
T-Y	0,30	слабая		8,48	4,0	3,63	43	106	10,76
T-YI	0,30	незасол.	-	8,42	5,7	5,77	23	94	6,5
T-YII	0,27	незасол.	-	8,53	7,95	7,04	43	100	9,8

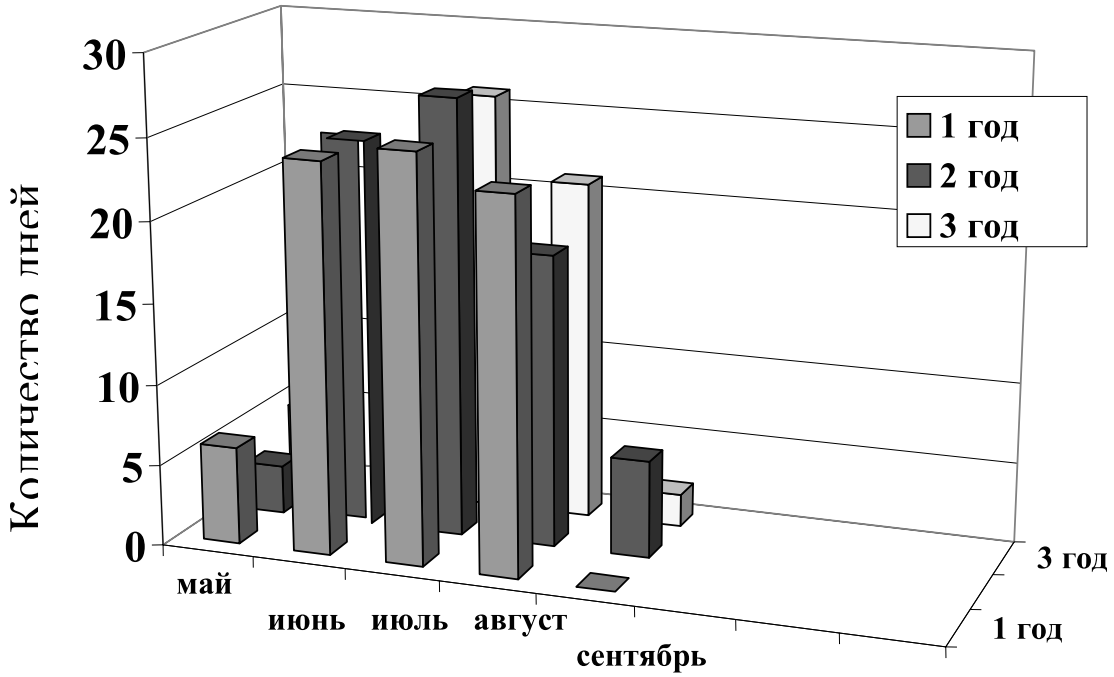

Рис. 3. Продолжительность оптимальных температур окружающей среды в районе исследований (п. Амга, Центральная Якутия)

распространённой в природе группы мезофильных микроорганизмов от +20 °С и выше, в п. Амга, в годы проведения мониторинговых исследований зафиксирована в первый год — в течение 78 дней (май — 6; июнь — 24; июль — 25; август — 23; сентябрь — 0 дней); во второй год — 78 дней (май — 3; июнь — 24; июль — 27; август — 18; сентябрь — 6 дней); в третий 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 (рисунок 3).

Близкое залегание мерзлоты к органогенному слою препятствуют прогреванию плодородного слоя почвы аварийного участка, что также отрицательно повлияло

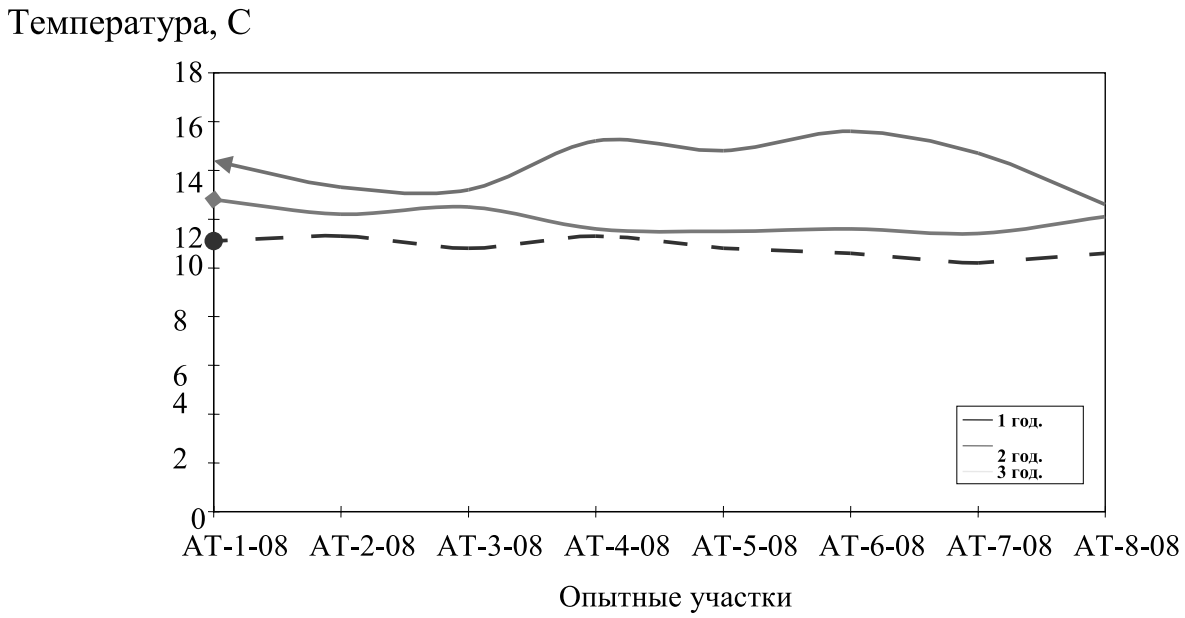

Рис. 4. График температуры почвы контрольных участков.

на развитие полезной почвенной микрофлоры и задерживало начало вегетации, которая проходила вяло.

В день первого внесения УОМ в опытные деляны (27 июня) температура почвы, на контрольных площадках, на глубине 10 см была не выше +17,5˚С; на горизонте 20 см не выше + 11,0˚С. К осени (5 сентября.) температура почвы на глубине 10 см была не выше +14,0˚С, на глубине 20 см — не выше +8,0˚С. По средним показателям температура почвенного горизонта, в течение всего периода исследований (3 года) на глубине посева семян, в опытных делянах, составляла в среднем 12,5–14,0˚С (рисунок 4).

Учитывая температурные показатели воздушной и почвенной среды, можно предположить, что внесение в нефтезагрязнённые почвы на данной территории, биопрепаратов, содержащих мезофильные УОМ (с температурным диапазоном для их развития, +20+40 °С), с целью деструкции нефти, будут практически не эффективными. В то время, как большинство известных промышленных нефтеокисляющих биопрепаратов содержат в своём составе именно мезофильную группу бактерий и грибов. Для сокращения сроков нефтеокисления и достижения фоновых показателей концентрации углеводородов в почвах на загрязнённой площади требуются биопрепараты, содержащие предпочтительно психрофильную микрофлору, способную развиваться при температурах ниже +20 °С.

На способность почвы поглощать солнечное тепло влияет уровень содержания влаги в почве: сухие почвы нагреваются значительно быстрее, чем влажные. Микроорганизмы могут жить и размножаться только при наличии в среде свободной воды.

Свыше 80% выпадающих атмосферных осадков попадает в почву. Чтобы усваивать это количество воды, почва должна обладать хорошей влагоёмкостью. Степень влагоёмкости показывает, какое количество осадков может быть поглощено, усвоено и позже использовано почвой, а какое окажется избыточным. Избыточное количество осадков и низкая влагоёмкость подвергают эрозии пахотный слой и отрицательно влияют на развитие почвенной микрофлоры.

Уровень влагоёмкости почв на протяжении всего периода исследований (3 года) был недостаточно высоким и составлял 14–58% (на глубине до 20 см), в разных точках исследований, тогда, как для успешного развития почвенной микрофлоры, в том числе УОМ, оптимальная влажность почвы должна составлять 60%.

Наиболее засушливым был второй год рекультивации, когда уровень влажности на глубине заделки семян был минимально 10,6 и максимально — 21,3%. Влажность почвенных образцов характеризовалась хаотичностью и неравномерным распределением влаги, в зависимости от расположения опытного участка (рисунок 5).

Немаловажную роль в развитии микрофлоры играет pH почвенного раствора. Оптимальным считается pH = 6,5–7,2, что не ведет к недостатку фосфора и микроэлементов в почвах. Такая реакция благоприятна для развития бактерий, обогащающих почву азотом.

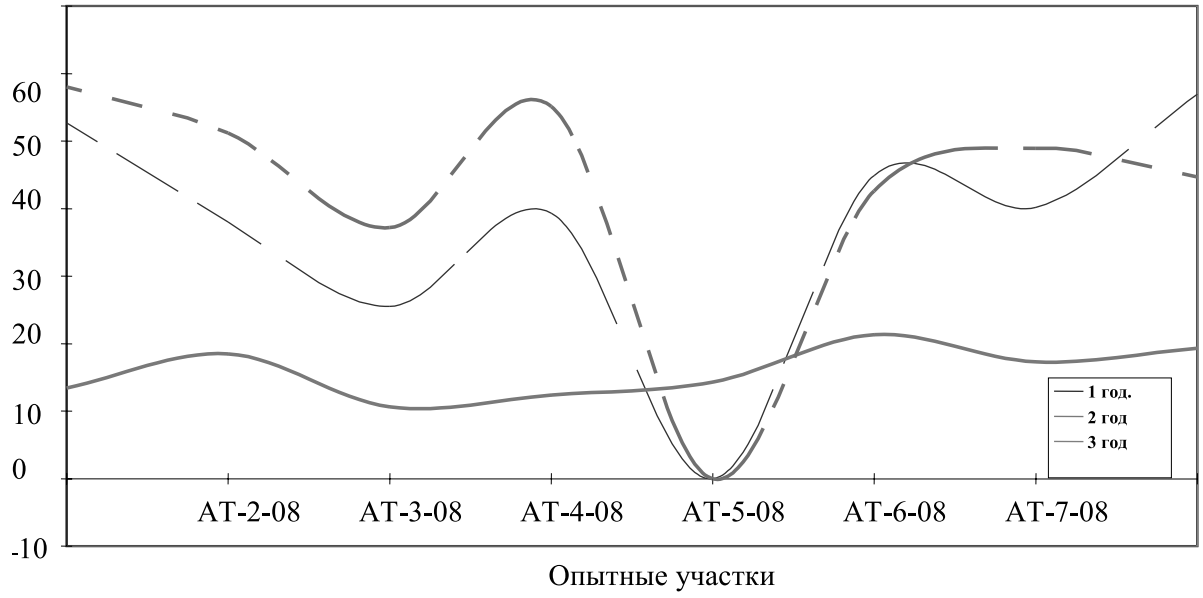

Рис. 5. График влажности почвы.

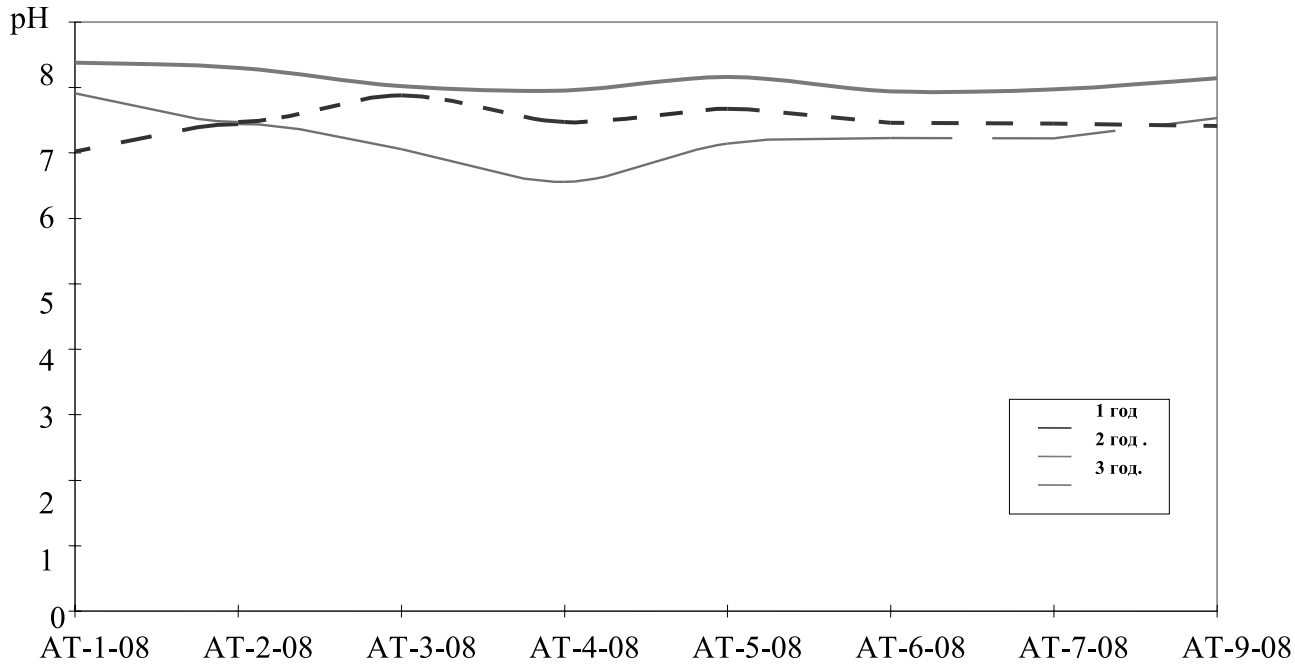

Рис. 6. Показатели pH почвенного раствора в опытных участках.

Сравнительный анализ почвенных образцов исследуемой территории показал, что pH почвенного раствора слабощелочной. Накопление УОМ в опытных делянах к началу летнего сезона следующего года сдвинул показатель насыщенности почвы водородными ионами в сторону повышения pH. По мере деструкции нефтезагрязнения, через 2 года после начала рекультивационных мероприятий pH почвенной среды составил в среднем 7,2 усл.ед. Что вполне соответствует условиям развития полезной почвенной микрофлоры (рисунок 6).

Для оценки роли почвенной микрофлоры в процессах деградации нефтезагрязнения проведены диспергирование и десорбция микробных клеток с поверхности почвенных частиц нефтезагрязнённых и фоновочистых контрольных площадок.

Таблица 3. Условия культивирования основных групп микроорганизмов

Группа микроорганизмов	Питательная среда (субстрат)	Сроки инкубации
Определение в почве общего микробного числа (ОМЧ)	МПА	t 37˚С — 24 часа
Определение в почве сапрофитных бактерий	МПА	t 30˚С — 72 часа
Определение в почве нитрифицирующих бактерий	Среда Виноградского	t 28˚С — 14 суток
Определение количества актиномицетов в почве	КАА	t 28˚С — 5 суток
Определение количества грибов в почве	Среды Сабуро, Чапека-Докса	t 24˚С — 5 суток
Определение аэробных целлюлозоразлагающих микроорганизмов	Среда Гетчинсона	t 28˚С — 20 суток
Определение аммонификаторов в почве	МПА, МПБ	t 28˚С — 10 суток
Определение токсичности почв к нефтеокисляющим микроорганизмам качественным методом	МПА	t 37˚С — 24 часа
Определение общего числа и процента почвенных бацилл	50% сусла + 50% МПА на поверхность агара Сабуро	t 37˚С — 72 часа
Определение аэробных азотфиксирующих микроорганизмов и олигонитрофильных бактерий	Среда Эшби	t 30˚С — 72 часа
Определение УОМ	Среда Мюнца	t 28˚С — 180 об/мин 14 суток

Изучение структуры микробного ценоза почвы под влиянием разных агротехнических приемов (минеральные удобрения, фитомелиорация, применение сорбентов и биопрепаратов, окисляющих УВ нефти) проводили методом посева на агаризованные среды. Аммонифицирующие микроорганизмы, способные использовать органический азот, выявляли на разбавленном 1:5 мясо-пептонном агаре (МПА); микроорганизмы, усваивающие минеральный азот — на крахмало-аммиачном агаре (КАА). Содержание олигонитрофильных микроорганизмов определяли на среде Эшби; микроскопические грибы — на средах Чапека-Докса и Сабуро. Голодный агар (ГА) с аммонийно-магниевыми солями использовали для учета нитрифицирующих бактерий (таблица 3).

Расчет численности микроорганизмов вели в колониеобразующих единицах (КОЕ/г) на 1г абсолютно сухого веса почвы (АСВ) с учетом влажности соответствующих образцов, определяемой одновременно с учетом численности микроорганизмов. Коэффициент минерализации определяли по соотношению численности микроорганизмов, усваивающих минеральный азот к количеству аммонификаторов (КАА/МПА), общую биогенность — путем определения суммарной численности микроорганизмов исследуемых доминирующих групп в течение всего вегетационного периода.

Идентификацию выделенной микрофлоры проводили методом «пёстрых биохимических рядов» при помощи общеизвестных в микробиологии систем индикаторов.

Деструкцию нефти в лабораторных условиях проводили в колбах объёмом 250 мл, в которые вводили 100 мл среды Мюнца и 1% нефти, отобранной из накопительной ёмкости Амгинской нефтебазы.

Инкубацию проводили в термостатированной качалке «УВМТ-12–250» при t 29±1С°, 180 об./мин, в течение 7–14 суток. Процессы деструкции оценивали визуально по исчезновению масляных пятен на поверхности среды и образованию эмульсии цвета молока.

Групповой состав микроорганизмов устанавливали поэтапно:

- в исходной почве до проведения биоремедиации (май);
- в период наибольшей метаболической активности внесённых в нефтезагрязнённые почвы УОМ (июнь, июль);
- в конце первого вегетационного периода (сентябрь).

По результатам лабораторного исследования в течение всего периода проведения биологической очистки в нефтезагрязнённых почвах наблюдалось преобладание бактерий, над грибными формами.

Общее количество бактерий, включающее роды *Escherichiae, Citrobacter, Klebsiella, Enterococcus, Micrococcus, Pseudomonas, Acinetobacter, Bacillus* в почвенных образцах, отобранных в мае составляло от 4·107ДО 3·109Кл/г АСВ почвы, из них УОМ — от 5·105ДО 8·106Кл/г АСВ почвы. Общее количество микроскопических грибов было незначительным —

Таблица 4. Содержание микроорганизмов в почвах опытных участков

Выделенная микрофлора	Точка отбора проб почвы, горизонт								
	I	II	III	IV	V	V	VI	VI	VII
	0–20	0–20	0–20	0–20	0–20	20–40	0–20	20–40	0–20
Micrococcus	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acinetobacter	-	-	+	+	-	-	-	+	+
Pseudomonas*	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Bacillus*	+	+	+	-	-	-	-	+	-
Escherichiae	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Klebsiella	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Citrobacter	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Aspergillus*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Дрожжи	-	-	-	-	-	+	-	+	-

*- УОМ

Таблица 5. Микробиологическая характеристика почв до внесения биопрепаратов

Точка отбора (участок)	T-I	T-II	T-III	T-IY	T-Y	T-YI	T-YII
Координаты по GPS-навигатору	N62°01.392′ E129°44.267′	N60°54.087′ E132°02.973′	N60°54.067′ E132°03.060′	N60°54.063′ E132°03.046′	N60°54.028′ E132°03.033′	N60°54.186′ E132°02.754′	N60°54.113′ E132°03.434′
Горизонт, см	0–20	0–20	0–20	0–20	0–20	0–20	0–20
pH почвы	7,98	8,02	8,00	8,00	7,85	7,85	7,02
Влажность,%	20,0	16,7	24,7	33,9	29,3	23,7	32,1
Содержание нефти в почвах,%	3,9996	0,0550	0,5224	0,1281	0	0	0
ОМЧ, кл./г АСВ	2·108	2·108	4·107	1·108	1·108	1·108	3·109
Грибы, кл./г АСВ	1·103	5·101	4·102	8·101	4·102	8·102	1·103
УОМ, кл./г АСВ	5·105	5·105	6·105	1·106	8·105	2·105	1·107

от 5·101[д]о 1·103[к]л/г АСВ почвы. Среди бактерий — нефтедеструкторов активной окисляющей способностью обладали бактерии рода *Bacillus, Pseudomonas* и грибы рода *Aspergillus* (таблица 4).

Перед обработкой опытных участков биопрепаратами численность УОМ в почвах, была ниже, чем на других участках нефтебазы. За летний сезон первого года опытных работ численность микроорганизмов-нефтедеструкторов увеличилось на 3 порядка, с 2–6 тыс. до 3–5 млн. кл/г АСВ. Однако к окончанию третьего года количество УОМ в опытных делянах снизилось (таблицы 5; 6).

Через 22 дня, после первого внесения в деляны биопрепаратов на основе УОМ, ОМЧ выросло на 2–3 порядка. Через 2 года численность почвенной микрофлоры составляла в почвах не менее 2 млрд. кл/г АСВ (таблицы 6; 7).

В качестве нефтесорбентов и носителей для УОМ, исследованы цеолит месторождения Хонгуруу (Сунтарский район, Западная Якутия) и термовспученный гидрофобизированный вермикулит месторождения Инагли (Алданский район, Южная Якутия).

Опыты показали, что полное насыщение вермикулита месторождения Инагли нефтью, в среднем, происходит в первые 3 минуты. Образцы вермикулита будучи насыщены нефтью не тонут в воде в течение 4 суток, и это свойство может сохраняться до 1 недели. Насыщение цеолита месторождения Хонгуруу нефтью происходит практически сразу после погружения образца в нефть. Через 1 минуту нефтеемкость образца достигает 0,4–0,5 г/г и не меняется в течение шести часов.

Минеральные носители, с иммобилизованной на их поверхности микрофлорой, сочетают в себе свойства нефтесорбентов и катализаторов, как для нефти и НП, так и для нефтеокисляющих микроорганизмов. При оперативном внесении на аварийную нефтезагрязненную территорию не дают распространяться загрязнению, поглощая большую часть разлившихся на почву нефтепродуктов в первые 5–10 минут. Под воздействием микроорганизмов НП подвергаются деструкции

Таблица 6. Динамика накопления микроорганизмов в опытных делянах в первый год проведения очистных мероприятий

Участок	Горизонт	Гетеротрофные бактерии, КОЕ/г АСВ			Микроскопические грибы, КОЕ/г АСВ		
		июнь	июль	сентябрь	июнь	июль	сентябрь
АТ-1–08	0–20	$4\cdot10^{6}$	$5\cdot10^{8}$	$2\cdot10^{7}$	0	$1\cdot10^{5}$	$3\cdot10^{5}$
АТ-2–08	0–20	$5\cdot10^{6}$	$1\cdot10^{9}$	$8\cdot10^{7}$	0	$6\cdot10^{5}$	$2\cdot10^{6}$
АТ-3–08	0–20	$3\cdot10^{6}$	$8\cdot10^{8}$	$3\cdot10^{8}$	0	$2\cdot10^{5}$	$1\cdot10^{5}$
АТ- 4–08	0–20	$4\cdot10^{6}$	$1\cdot10^{9}$	$5\cdot10^{8}$	0	$2\cdot10^{5}$	$1\cdot10^{5}$
АТ-5–08	0–20	$4\cdot10^{6}$	$1\cdot10^{9}$	$3\cdot10^{8}$	0	$3\cdot10^{5}$	$3\cdot10^{7*}$
АТ-6–08	0–20	$4\cdot10^{6}$	$1\cdot10^{9}$	$2\cdot10^{8}$	$2\cdot10^{3}$	$5\cdot10^{5}$	$4\cdot10^{6*}$
АТ-7–08	0–20	$3\cdot10^{6}$	$1\cdot10^{9}$	$1\cdot10^{8}$	0	0	$8\cdot10^{5*}$
АТ-8–08	0–20	$5\cdot10^{6}$	$1\cdot10^{9}$	$1\cdot10^{9}$	0	0	$2\cdot10^{5*}$

Таблица 7. Характеристика почв опытных участков (данные за 3года)

Показатели	АТ-1–08	АТ-2–08	АТ-3–08	АТ-4–08	АТ-5–08	АТ-6–08	АТ-7–08	АТ-8–08
Глубина отбора, см	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
pH почвы, июнь 1 год	7,02	7,44	7,06	6,56	7,14	7,23	7,22	7,53
pH почвы, июнь 2 год	8,38	8,30	8,02	7,95	8,16	7,94	7,97	8,17
pH почвы, июнь 3 год	7,91	7,47	7,88	7,47	7,67	7,46	7,45	7,41
Влажность,%, июнь 1 год	52,7	38,0	25,6	39,3	37,2	44,9	40,2	56,9
Влажность,%, июнь 2 год	13,4	18,5	10,6	12,4	14,3	21,3	17,3	19,3
Влажность,%, июнь 3 год	58,0	51,2	36,7	45,1	48,9	42,9	38,9	44,7
ОМЧ, кл./г АСВ, июнь 1 год	$4{,}0\cdot10^{6}$	$5{,}0\cdot10^{6}$	$3{,}0\cdot10^{6}$	$4{,}0\cdot10^{6}$	$4{,}0\cdot10^{6}$	$4{,}0\cdot10^{6}$	$3{,}0\cdot10^{6}$	$5{,}0\cdot10^{6}$
ОМЧ, кл./г АСВ, июнь 2 год	$1{,}2\cdot10^{8}$	$8{,}7\cdot10^{7}$	$5{,}4\cdot10^{7}$	$1{,}6\cdot10^{8}$	$1{,}0\cdot10^{8}$	$8{,}0\cdot10^{7}$	$9{,}1\cdot10^{7}$	$8{,}9\cdot10^{7}$
ОМЧ, кл./г АСВ, июнь 3 год	$2{,}4\cdot10^{9}$	$4{,}7\cdot10^{9}$	$1{,}8\cdot10^{10}$	$5{,}7\cdot10^{11}$	$6{,}2\cdot10^{11}$	$9{,}8\cdot10^{10}$	$5{,}2\cdot10^{11}$	$2{,}1\cdot10^{11}$
Грибы, кл./г АСВ, июнь 1 год	$2{,}0\cdot10^{5}$	$7{,}0\cdot10^{4}$	$2{,}0\cdot10^{4}$	$2{,}0\cdot10^{4}$	$5{,}0\cdot10^{4}$	$5{,}0\cdot10^{4}$	$2{,}0\cdot10^{4}$	$3{,}0\cdot10^{4}$
Грибы, кл./г АСВ, июнь 2 год	$3{,}04\cdot10^{7}$	$5{,}0\cdot10^{7}$	$1{,}9\cdot10^{7}$	$2{,}6\cdot10^{7}$	$3{,}1\cdot10^{7}$	$4{,}6\cdot10^{7}$	$2{,}61\cdot10^{7}$	$1{,}4\cdot10^{7}$
Грибы, кл./г АСВ, июнь 3 год	$4{,}1\cdot10^{5}$	$5{,}0\cdot10^{5}$	$1{,}5\cdot10^{7}$	$2{,}6\cdot10^{5}$	$1{,}1\cdot10^{7}$	$2{,}4\cdot10^{6}$	$2{,}6\cdot10^{6}$	$1{,}6\cdot10^{6}$
УОМ, кл./ г АСВ, июнь 1 год	$5{,}6\cdot10^{3}$	$5{,}4\cdot10^{3}$	$3{,}5\cdot10^{3}$	$7{,}1\cdot10^{4}$	$2{,}8\cdot10^{2}$	$2{,}4\cdot10^{2}$	$9{,}0\cdot10^{2}$	$7{,}3\cdot10^{4}$
УОМ, кл./ г АСВ, июнь 2 год	$2{,}3\cdot10^{6}$	$1{,}03\cdot10^{6}$	$5{,}1\cdot10^{6}$	$1{,}8\cdot10^{6}$	$1{,}3\cdot10^{6}$	$1{,}0\cdot10^{6}$	$1{,}16\cdot10^{6}$	$1{,}72\cdot10^{6}$
УОМ, кл./ г АСВ, июнь 3 год	$3{,}3\cdot10^{5}$	$3{,}1\cdot10^{5}$	$5{,}5\cdot10^{5}$	$2{,}1\cdot10^{5}$	$2{,}3\cdot10^{3}$	$6{,}8\cdot10^{3}$	$4{,}3\cdot10^{3}$	$2{,}6\cdot10^{5}$

в результате использования УВ нефти клетками бактерий в качестве источников питания. После завершения очистки территории от НП, микроорганизмы исчерпав питание, теряют свою жизнеспособность, а образовавшаяся биомасса подвергается биохимическому разложению активизирующейся местной сапрофитной микрофлорой.

В итоге, в почве образуется гумус, восстанавливается почвенный гомеостаз, что в свою очередь, снижает токсичность почв и подчиняется, с точки зрения экологии, обычным природным процессам.

В течение периода исследований было проведено биотестирование на семенах пшеницы (сорт «Приленская 6»), с целью определения фитотоксичности почвы. Условия проведения биотестирования указаны в таблице 8. Экспериментально установлено, что остаточное количество нефти в почвах аварийного участка в течение первой половины рекультивационных работ подавляло всхожесть пшеницы. Наблюдалось также подавление роста корневой системы и зелёной части проростка.

Всходы семян в загрязнённых нефтью образцах составили 0–44%, тогда как в контрольных «чистых» образцах этот показатель равен 92–96%. При этом, вытяжки почвенной воды оказались менее токсичны, чем сама почва. Вероятно, остаточная тяжёлая фракция нефти не способна растворяться в почвенной воде, что объясняет меньшую токсичность водных вытяжек из опытных образцов (таблицы 9; 10).

Таблица 8. Условия проведения биотестирования

Физические факторы	Условия
Качество света	Дневной свет
Температура	23–25ºС
Количество раствора	10 мл
Количество тестируемых семян	25 штук
Повторность опыта	6-ти кратная
Контроль	В качестве эталона использована дистиллированная вода.

Таблица 9. Всхожесть семян пшеницы в водной вытяжке

Время отбора проб почвы	Точка отбора	Количество тестируемых семян, шт.	Количество всхожих семян, шт.	Процент всхожести, %
июнь	АТ-1–08	25	8	32
	АТ-2–08	25	11	44
	АТ-3–08	25	4	16
	АТ-4–08	25	5	20
	АТ-5–08	25	2	8
июль	АТ-1–08	25	1	4
	АТ-2–08	25	2	8
	АТ-3–08	25	0	0
	АТ-4–08	25	4	16
	АТ-5–08	25	0	0
сентябрь	АТ-1–08	25	20	80
	АТ-2–08	25	20	80
	АТ-3–08	25	18	72
	АТ-4–08	25	20	80
	АТ-5–08	25	20	80
июнь	Контрольная «фоново-чистая» почва	25	23	92

После проведения биоремедиационных мероприятий токсичность снизилась, всхожесть повысилась с максимального значения равного 44% до 80% (таблицы 9; 10; рисунки 7–12).

С целью интенсификации процессов биодеградации нефти через год была проведена фиторекультивация опытных делян семенами районированного сорта травянистого растения Пырейник сибирский (*Elymus sibiricus*). Посев травы проводили из расчёта 10 г семян на 1 м^2 нефтезагрязнённой почвы.

Через 35 дней после высева семян появились всходы травы высотой 1–6 см. Еще через год в опытных делянах был установлен густой травостой. При обследовании территории нефтебазы установлено, что почвы за пределами опытных делян отличались по морфологическим признакам. Имели следы засоления и более тёмный цвет, по сравнению с пробами из участков, в которых была проведена биорекультивация с применением нефтеокисляющей микрофлоры. Верхняя часть профиля ржавых оттенков. На структурных гранях визуально просматривались радужные плёнки. На нижних участках территории имелись небольшие ямки и углубления, которые были заполнены водой с маслянистыми следами нефтепродуктов. Почва имела запах нефти. В то же время, опытная деляна, была покрыта сплошным «ковром» зелёной травы (рисунки 13; 14).

По результату проведённого эксперимента можно сделать заключение, что районированный сорт Пырейника Сибирского (*Elymus sibiricus*) — нефтетолерантное растение и может расти в присутствии нефти.

В качестве фитомелиоранта был также испытан овёс обыкновенный (*Avéna sátiva*) (рисунки 15–17). Растения взошли практически на всех участках, однако в начале фазы колошения, остановились в своем развитии, пожелтели и засохли. Колосья не успели сформироваться. Снижение надземной массы составило не менее 50–60% от контроля без внесения нефти. В то время, как в контрольной условно-чистой почве всхожесть овса составила не менее 80%.

Таблица 10. Всхожесть семян пшеницы в нефтезагрязнённой почве

Дата отбора проб почвы	Точка отбора	Количество тестируемых семян, шт.	Количество всхожих семян, шт.	Процент всхожести, %
Июнь	АТ-1–08	25	1	4
	АТ-2–08	25	3	12
	АТ-3–08	25	2	8
	АТ-4–08	25	2	8
	АТ-5–08	25	3	12
Июль	АТ-1–08	25	10	40
	АТ-2–08	25	11	44
	АТ-3–08	25	0	0
	АТ-4–08	25	0	0
	АТ-5–08	25	0	0
Сентябрь	АТ-1–08	25	18	72
	АТ-2–08	25	18	72
	АТ-3–08	25	19	76
	АТ-4–08	25	20	80
	АТ-5–08	25	20	80
Июнь	Контрольная «фоново-чистая» почва	25	24	96

Рис. 7. ФОН

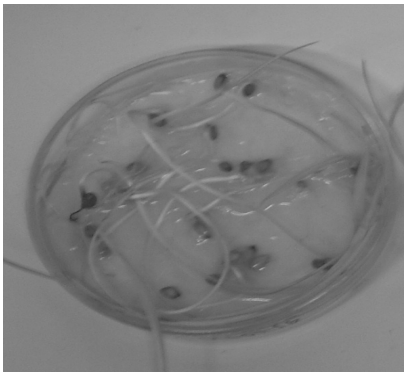

Рис. 8. Участок АТ-1–08

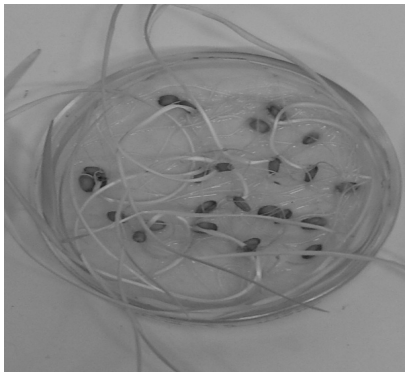

Рис. 9. Участок АТ-2–08

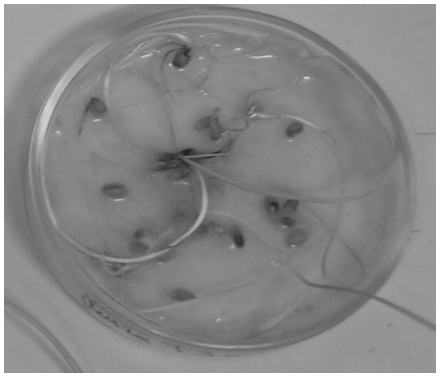

Рис. 10. Участок АТ-3–08

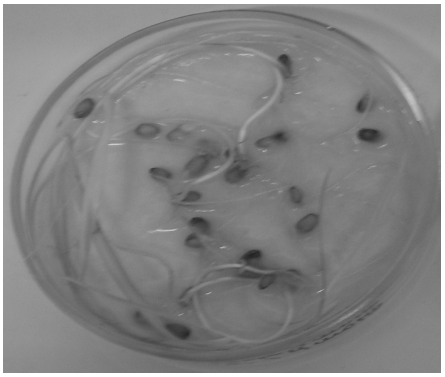

Рис. 11. Участок АТ-4–08

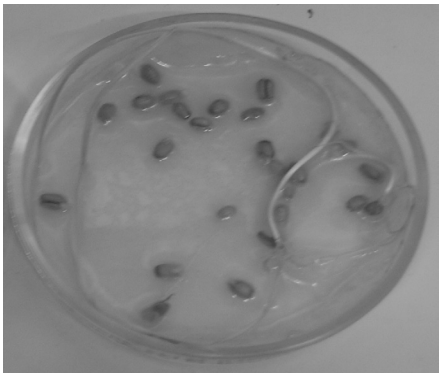

Рис. 12. Участок АТ-5–08

Таблица 11. Колонизация ризосферы пырейника сибирского

Вариант опыта	Количество микроорганизмов в почве, млн.кл/г АСВ	Количество микроорганизмов в ризосфере пырейника сибирского, млн. г/АСВ
Смесь УОМ на вермикулите	175,0	2,4
Смесь УОМ на цеолите	4,2	4,7
Смесь УОМ без сорбентов	589,1	1,8
Смесь УОМ без сорбентов	571,3	67,1
Обработка биопрепаратом на основе *Aspergillus*	624,7	2,9
Обработка биопрепаратом на основе *Bacillus*	97,8	1042,3
Обработка биопрепаратом на основе *Pseudomonas*	2,5	528,4
Промышленный биопрепарат «*Деворойл*»	2,5	21,3

Рис. 13. Результаты проведения фиторекультивации в опытной деляне

Рис. 14. Спустя год после аварии в почве, необработанной биопрепаратами всё ещё остаются следы нефтезагрязнения

Рис. 15. Новые опытные деляны для испытания овса

Рис. 16. Всходы овса в опытной деляны не достигнув фазы колошения начали сохнуть и желтеть

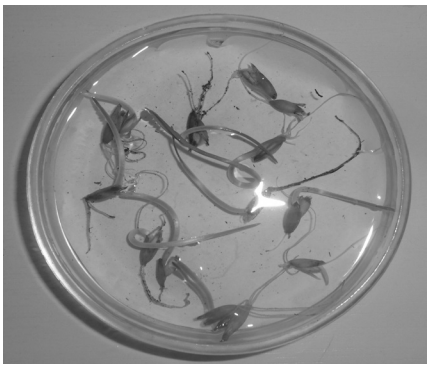

Рис. 17. Всходы овса в почвенной воде через 5 дней после постановки биотеста

Пырейник сибирский оказался более устойчивым к нефтезагрязнению, чем овёс посевной, что предполагает возможность его дальнейшего использования при фиторекультивации нефтезагрязнённых земель в условиях Якутии.

Всходы пырейника сибирского за 1,5 месяца составили не менее 90%. Растения росли весьма интенсивно, так что к следующему сезону набрали большую биомассу и приближались по этому показателю к растениям, выращенным в условно-чистых почвах. Зелёная часть проростков сочная, корневая система была развита хорошо.

Исследованиями установлено, что колонизация микроорганизмами околокорневой системы пырейника сибирского выше, чем у овса.

Численность ризосферных микроорганизмов, в т.ч. азотфисирующих, выше в опытных делянах обработанных биопрапаратами, в состав которых входили бактерии рода *Pseudomonas* и *Bacillus*, в сравнении с участками обработанными смесью углеводородокисляющих бактерий и грибов. Вероятно, здесь срабатывает эффект симбиоза и бактериофагии, что требует дополнительных исследований, поскольку в почвогрунтах, не загрязнённых нефтепродуктами, количество ризосферной микрофлоры обычно бывает выше, чем в контрольной почве (таблица 11).

В результате проведенных работ за первый летний сезон (июнь-сентябрь) деградировало от 34,4 до 76,6% нефти, что привело к существенному снижению уровня нефтезагрязнения и изменению его состава в почвах опытных участков.

Таким образом, установлено:

1. Районированный сорт травянистого растения Пырейник сибирский (*Elymus sibiricus*) — нефтеустойчивое и быстронакапливающее вегетативную массу растение и может рассматриваться как потенциальный фиторемедиатор нефтезагрязнённых мерзлотных почв.
2. Углеводородокисляющие микроорганизмы (УОМ), выделенные из почв нефтезагрязненной территории обладают высокой активностью к нефтезагрязнению. Эта активность усиливается, когда в процессе проведения реабилитационных работ производится минеральная подкормка в расчетных дозах и путём рыхления почвы обеспечивается в почву доступ кислорода воздуха.
3. Штаммы неферментирующих бактерий рода *Pseudomonas*, спорообразующих бактерий рода *Bacillus* и грибы рода *Aspergillus* являются нефтедеструкторами. Наиболее активно окисляют сырую нефть в условиях пониженных температур (+5+20˚С) бактерии рода Pseudomonas. В лабораторных условиях они вызывали лизис (растворение) нефти уже на 3–7сутки.
4. Наибольшая активность микроорганизмов достигается, когда выращенные штаммы УОМ иммобилизуются на цеолит или термовспученный минерал-вермикулит. Эти природные минералы обогащены, комплексом микроэлементов, необходимых для развития микроорганизмов, создают благоприятные условия жизнедеятельности микрофлоры в почве. Как носители микрофлоры цеолит и вермикулит позволяют значительно увеличить срок годности биопрепаратов, практически до 2 лет, в то время как биопрепараты УОМ на водной основе или хранение штаммов на агаризированных субстратах способны сохранять свою активность в течение 1–3 месяцев.

Автор благодарен сотрудникам лаборатории геохимии каустобиолитов ИПНГ СО РАН за участие в проведении исследований.

Научная работа выполнена в рамках госбюджетного научного проекта VII.59.2.4.: «Геолого-геохимические условия и история формирования месторождений нефти и газа в Лено-Вилюйском осадочном бассейне» на 2010–2012 гг.

ЛИТЕРАТУРА:

1. ГОСТ 17.4.4.02–84 Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализов.
2. Керстен Д. К. Морфологические и культуральные свойства индикаторных микроорганизмов нефтегазовой съемки //Микробиология, № 5, 1963.— С. 1024–1030.
3. РД 39–0147098–90 Инструкция по контролю за состоянием почв на объектах предприятий Миннефтегазпрома.
4. ГОСТ Р ИСО 22030–2009. Качество почвы. Биологические методы. Хроническая фитотоксичность в отношении высших растений.

© Ерофеевская Лариса Анатольевна (lora-07.65@mail.ru).
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»