

К ВОПРОСУ ДИАГНОСТИКИ И ОЦЕНКИ ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЮ ЧЕРНОЗЕМОВ

Рассматривается вопрос нормирования содержания нефти в почве, выше которого она не может самостоятельно восстановиться после загрязнения. Определяется способность чернозема обыкновенного к естественной биоремедиации. Выявлены информативные диагностические признаки, определяющие степень влияния нефти на почвенную экосистему. Установлено, что достоверными индикаторами устойчивости почв к углеводородному загрязнению служат уровни микробиологической и ферментативной активности черноземов.

Ключевые слова: нефтезагрязненные черноземы; диагностика почв; почвенные ферменты; детоксикация; биоремедиация.

Загрязнение почв и почвенного покрова нефтью и нефтепродуктами является одной из важных проблем экологии почв. Актуальным этот вопрос является не только для районов, где расположены объекты нефтедобывающей и нефтехимической отраслей экономики. Транспортировка углеводородного сырья осуществляется на обширных пространствах, удаленных от источников их производства на многие сотни километров, а потребление нефтепродуктов и выбросы в окружающую среду их отходов происходят практически повсеместно. Ежегодно на территории Российской Федерации на месторождениях нефти случаются тысячи аварий и порывов продуктопроводов в зонах их транспортировки. При этом наблюдаются существенное снижение продуктивности почв, глубокие изменения их химических и физических свойств, ухудшение экологического состояния и функций в биосфере, что сопряжено с выводом из сельскохозяйственного оборота значительной части агроландшафтов. Перечисленные явления наблюдаются и на территории Оренбургской области, расположенной на границе лесостепной и степной зон, в пределах которой находится ряд крупных месторождений нефти и газового конденсата [1. С. 106].

В настоящее время немало внимания уделяется изучению процессов естественной биоремедиации и разработке методов рекультивации загрязненных почв с целью их возвращения в сельскохозяйственный оборот. Успешное решение данной задачи во многом зависит от того, насколько хорошо разработаны методы оценки степени загрязнения почв. Однако многие вопросы диагностики и нормирования содержания нефти в почвах до настоящего времени находятся в стадии решения, поскольку влияние нефти на свойства почв и, как следствие, определение норм ее содержания в определяющей степени зависят от сочетания многих факторов, таких как тип почв, состояние растительного покрова, климатические показатели региона, физико-химические свойства нефти, условия землепользования и др. [1. С. 107; 2. С. 33].

Для нормирования нефтезагрязнений важно установить уровень концентрации нефти в почвах, выше которого она не может сама справиться с загрязнением, т.е. определить потенциал ее способности к самоочищению. Кроме того, необходимо выявить для каждого типа почв (или группы типов) наиболее информативные диагностические показатели изменений в экологии почв, так как попытки нормирования нефти во всех почвах по различным обобщенным признакам вредности приводят к колебаниям их значений в очень широком диапазоне [2. С. 35; 3. С. 341].

В пределах степного Предуралья в процессе проведения полевого эксперимента с почвами искусственно

загрязненными 1, 5, 10, и 15% концентрациями нефти была предпринята попытка оценить способность чернозема обыкновенного к естественной биоремедиации. Опыт проводился на многолетней пашне. Объектом исследования явился чернозем обыкновенный среднелесной (гор. А+ВВ = 43–45 см) малогумусный (содержание гумуса 5,5–5,8%) тяжелосуглинистый.

С целью оценки степени влияния нефти на почвенную экосистему образцы почв отбирались из слоев 0–10, 10–20 и 20–30 см (верхняя часть гор. А+ВВ), которые исследовались на 5, 30, 90, 310 и 365-е сут после загрязнения. При этом допустимым уровнем загрязнения было принято считать такое количество нефти, которое подвергается минерализации в почве естественным образом за промежуток времени, не превышающий один год.

Выявлено, что из множества диагностических признаков, определяющих степень влияния нефти на почвенную экосистему, таких как содержание и запас гумуса, емкость катионного обмена, количество питательных элементов и др., наиболее достоверным индикатором, индексом или показателем устойчивости почв к антропогенным воздействиям, связанным с загрязнением нефтью, служит микробиологическая и ферментативная активности почв, которые являются лабильными признаками, реагирующими даже на незначительные концентрации нефти [3. С. 342; 4. С. 199; 5. С. 67].

Исследования микробиологической активности показали, что наблюдается смена микробиологического состава как в зависимости от концентрации нефти, так и вниз по почвенному профилю. В верхнем слое незагрязненной почвы (0–10 см) преобладали гетеротрофные микроорганизмы, или копиотрофы, которые быстро развиваются за счет легкодоступных веществ, содержащихся в высоких концентрациях. Их численность составляет 23,7 млн/г и превышает численность остальных групп микроорганизмов. Вниз по почвенному профилю, на глубине 20–30 см, наблюдается преобладание олиготрофных микроорганизмов, способных медленно развиваться за счет разложения более сложных соединений, содержащихся в меньших концентрациях и более устойчивых к стрессам.

При поступлении нефти в почву на 5-е сут наблюдается увеличение численности *гетеротрофных организмов* в слое 0–10 см с 23,7 до 29,3 млн/г на участке почвы с концентрацией 1% и углеводородоксилирующих микроорганизмов в слое 10–20 см при 5%-ном загрязнении с 6,9 до 7,7 млн/г за счет поступления дополнительного источника углерода и невыраженного токсического эффекта. На участках с более высокой концентрацией нефти наблюдается снижение численности всех основных групп микроорганизмов.

Через 4 месяца дозы нефти 1 и 5% вызывают рост численности *олиготрофных микроорганизмов* в среднем на 30–45%, что, по всей видимости, связано с адаптацией почвенной микрофлоры к изменившимся условиям среды. Углерод нефти используется микроорганизмами как дополнительный источник питания, что приводит к запуску многоэтапных механизмов самовосстановления почвы от нефтяного загрязнения. Помимо этого, с течением времени легкие, наиболее

токсичные фракции нефти испаряются и снижение их отрицательного воздействия при данных концентрациях вызывает восстановление численности микроорганизмов почвы и их видового состава. При более высоких концентрациях нефти эти процессы происходят медленнее, так как сильный токсический эффект и неблагоприятные физические свойства почв, связанные с воздействием на них углеводородов, способствуют угнетению жизнедеятельности микроорганизмов.

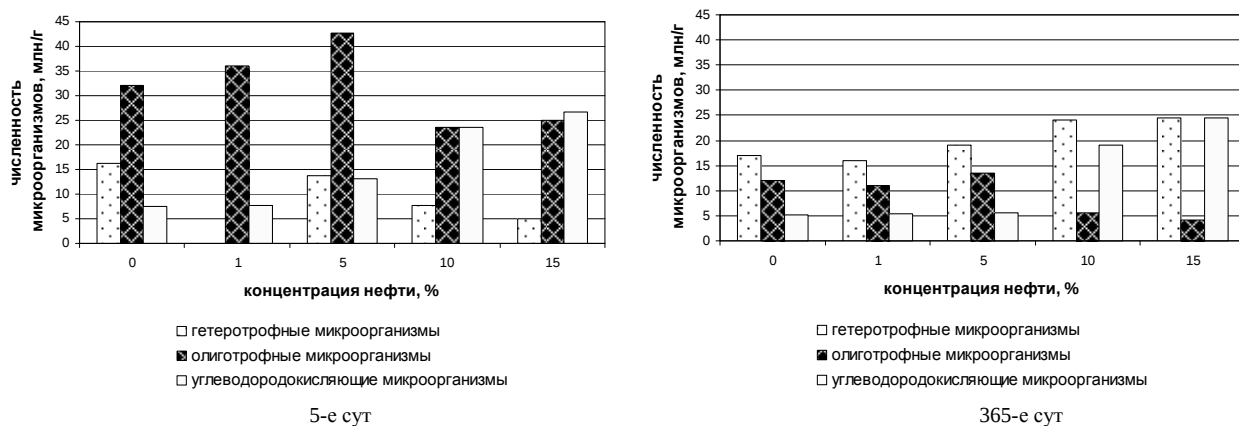


Рис. 1. Численность микроорганизмов в нефтезагрязненной почве

Выявлена реакция на нефть и у группы *углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ)*, содержание которых является важным диагностическим признаком самоочищающейся способности почвы. В слое почвы 0–10 см в пределах изученных уровней загрязнения наблюдается линейная зависимость изменения численности УОМ от концентрации нефти, которая имеет уравнение следующего вида: концентрация нефти = $6,71 + 0,19 \times \text{УОМ}$, $r = 0,85$ при $p = 0,047$. В слое 10–30 см сохраняется та же тенденция и по мере увеличения концентрации нефти возрастает численность УОМ. Исключение составляет лишь участок с 1%-ным загрязнением, где численность микроорганизмов не изменяется достоверно, поскольку нефть в такой концентрации не проникает в нижележащие слои, а концентрируется в верхнем слое (до 5 см) и не оказывает существенного влияния на почвенную микрофлору.

На 365-е сут картина несколько меняется. Численность всех групп микроорганизмов снижается по сравнению с прошлым годом как в незагрязненной, так и в загрязненной нефтью почве, что, вероятно, связано с частичным вымыванием нефти в нижележащие слои почвенного профиля за счет таяния снега и осенних дождей. Максимальная общая численность микроорганизмов (ОМЧ) наблюдается при 5%-ном загрязнении в слое почвы 0–30 см. Здесь относительно невысокая концентрация нефти не оказывает сильного токсического эффекта на гетеротрофные микроорганизмы и стимулирует деятельность олиготрофов и УОМ. При 10- и 15%-ном загрязнении проявляется обратное явление – снижение численности гетеротрофных микроорганизмов на 50–70%. Значения УОМ и ОМЧ при 1- и 5%-ном загрязнении приближается к контрольным во всех исследуемых слоях почвы, что связано с разложением нефти к концу первого года исследования (рис. 1).

При более высоких концентрациях тенденция увеличения численности УОМ и олиготрофов остается прежней, что является свидетельством продолжения процессов разложения (вплоть до минерализации) нефти в почве.

С целью выявления наиболее чувствительных и информативных микробиологических показателей мы определяли количество микроорганизмов на разных питательных средах, что дало следующие результаты: на мясопептонном агаре, нефть оказывает прямое отрицательное воздействие; численность гетеротрофов снижается на 80–90% при максимальном загрязнении (15%) в исследуемом концентрационном диапазоне. Наблюдается отрицательная корреляция между концентрацией нефти и численностью микроорганизмов, $r = -0,69$ при $p = 0,005$ на 5-е сут после загрязнения и $r = -0,55$ при $p = 0,033$ на 6-й месяц после загрязнения.

Тенденция увеличения численности микроорганизмов в нефтезагрязненных почвах со временем связана, вероятно, с их адаптацией к изменившимся условиям среды и частичной деградацией нефти в почве с течением времени. При этом невысокие дозы нефти вызывают увеличение численности олиготрофов. Критической дозой нефти, при которой численность микроорганизмов достоверно ниже контрольного значения, следует считать ее 10%-ную концентрацию. С численностью микроорганизмов тесно связана ферментативная активность почв, поскольку ферменты являются продуктом жизнедеятельности почвенной микрофлоры.

Основная роль в процессах самоочищения почвы от ксенобиотиков принадлежит биологическому окислению. Почвенные ферменты участвуют в процессах самоочищения почвы от экзогенных веществ, трансформируя, нейтрализуя, разрушая не свойственные почвам вещества,

токсичные изначально или образовавшиеся выше определенных пределов. Биологическое окисление происходит в процессе ферментативных реакций, в частности окислительно-восстановительных, и осуществляется оксидоредуктазами (каталаза, пероксидаза, полифенолоксидаза и др.). Каталазная активность – это устойчивый показатель, который может использоваться для энзимологической диагностики состояния загрязненности почв и изменения окислительно-восстановительных условий среды. Многие исследователи (С.А. Алиев, Д.А. Гаджиев и др.) предложили использовать активность каталазы как показатель общей биологической активности почв с различной степенью загрязнения нефтяными органическими веществами [6. С. 25; 7. С. 47].

Исследование каталазной активности нефтезагрязненных черноземов показало, что на начальных сроках инкубации (первые 5 дней) наблюдается увеличение каталазной активности в слое почвы 10–20 см, что можно объяснить большей численностью микроорга-

низмов и более интенсивными микробиологическими процессами за счет наличия корневых систем растений, влиянием выделяемых ими веществ, повышенным содержанием гумуса и большей влажностью по сравнению с самым верхним слоем. Увеличение каталазной активности при 1%-ном загрязнении с 6,0 до 7,3 мл О₂мин/г, а следовательно, запуск механизмов детоксикации нефти, наблюдается только в слое 0–10 см, так как нефть в течение вегетационного периода не мигрирует ниже 10 см. При 5%-ном загрязнении активность каталазы максимальна (9,2 мл О₂мин/г) в слое 10–20 см, поскольку в этом варианте опыта нефть не проникает на глубину более 20 см (табл. 1). На основании полученных данных можно предположить, что столь малая концентрация нефти не оказывает заметного токсического эффекта на почвенную микрофлору, которая, между тем, отвечает на поступление в черноземы дополнительного источника углерода повышением ферментативной активности, в том числе каталазной.

Таблица 1

Остаточное содержание нефти в различных слоях почвенного профиля чернозема обыкновенного

Время инкубации, сут	Слой почвы, см	Концентрация загрязнителя, %	Остаточное содержание нефти, мг/кг
3	0–10	0	4,0±0,8
	10–20		1,0±0,2
	20–30		0,8±0,2
	0–10	1	745,7±179,1
	10–20		195,9±55,2
	20–30		23,8±4,8
	0–10	5	2 841,9±768,4
	10–20		1 935,7±587,1
	20–30		853,4±370,7
	0–10	10	5 534,1±1106,8
	10–20		3 435,2±1087,0
	20–30		2 391,8±478,4
	0–10	15	6 932,1±1386,4
	10–20		5 240,9±1048,2
	20–30		3 574,3±714,9
365	0–10	0	4,0±0,8
	10–20		1,0±0,2
	20–30		0,8±0,2
	0–10	1	72,4±12,5
	10–20		12,4±55,2
	20–30		3,0±3,0
	0–10	5	95,8±19,2
	10–20		343,4±94,7
	20–30		76,7±15,3
	0–10	10	211,5±42,3
	10–20		463,1±112,6
	20–30		900,2±337,4
	0–10	15	429,1±85,8
	10–20		745,6±149,1
	20–30		4 568,7±913,7

Также обнаружено, что в слое 0–10 см происходит увеличение ОМЧ при 1%-ном загрязнении, а в слое 10–20 см – увеличение численности углеводород-окисляющих микроорганизмов при 5%-ном загрязнении, но без увеличения ОМЧ. Такая ситуация, по всей видимости, объясняется сменой функциональных групп микроорганизмов в связи с поступлением специфического источника питания без существенных изменений их численности.

На 90-е сут исследований выявлен сдвиг критической дозы нефти для каталазной активности в сторону более высокой концентрации нефти в слоях 0–10 см и 10–20 см (рис. 2). Также отмечено, что в слое 10–20 см происходит относительное увеличение каталазной ак-

тивности по сравнению с показателями на момент начала исследований. В слое 20–30 см по-прежнему наблюдается линейная зависимость между активностью каталазы и содержанием нефти в пределах изученных уровней загрязнения, которая описывается следующим уравнением: $кат. = 5,85 - 0,11 \times \text{конц. нефти}$, $r = -0,90$, $p = 0,037$.

На 310-е сут (начало второго вегетационного периода) каталазная активность во всех исследуемых слоях почв снижается по сравнению с данными предыдущих исследований как на контрольном участке, так и на участках, загрязненных нефтью, что может быть связано с более низкими температурами воздуха на момент отбора образцов.

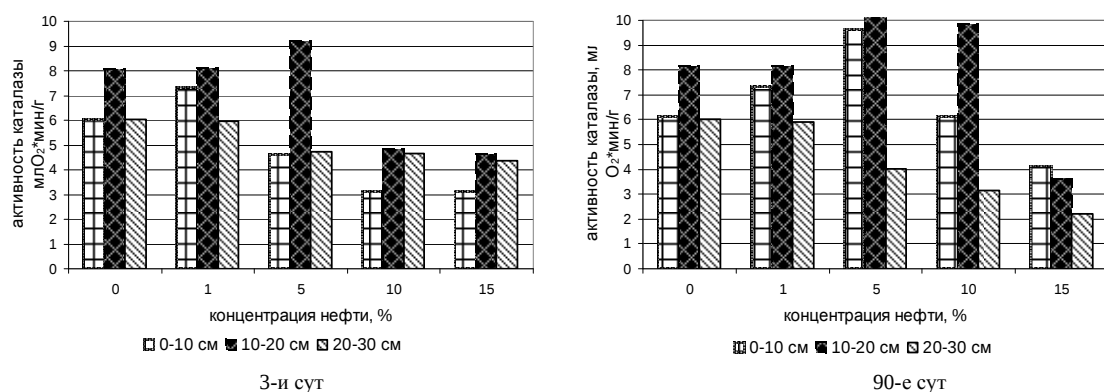


Рис. 2. Каталазная активность нефтезагрязненных черноземов

В слое почвы 0–10 см каталазная активность на загрязненных нефтью участках концентрацией 5, 10 и 15% оказалась выше по сравнению с контролем. Концентрация же загрязнителя, равная 1%, на этот момент не вызывает повышения активности фермента, в связи с тем что за осенне-зимний период происходит миграция нефти вниз по почвенному профилю под влиянием тока дождевых и талых вод. Косвенно этот вывод подтверждается увеличением активности каталазы в слое почвы 10–20 см при 1%-ном загрязнении по сравнению с контролем, чего не наблюдалось ранее. Снижение ферментативной активности в слоях 10–20 и 20–30 см отмечено лишь при 15%-ном загрязнении, что объясняется наличием более выявленного токсического эффекта и способностью высоких концентраций нефти влиять на воздушный режим почв, затруднять доступ кислорода к нижележащим слоям почвенного профиля, что отрицательно сказывается на ферментативной деятельности черноземов (рис. 3).

На завершающем этапе исследований (365-е сут) общая тенденция изменения каталазной активности остается прежней, при этом происходит значительное увеличение ее значений в почвах всех исследуемых участков. В черноземах с 1%-ным загрязнением показатели каталазной активности в слое 0–30 см не изменяются достоверно по сравнению с контрольными ($t = 1,47–1,69$ при $n = 10$), что свидетельствует о снижении интенсивности окислительно-восстановительных процессов, направленных на разложение нефти.

При изучении вопросов самовосстанавливающейся способности обыкновенных черноземов от нефтяного загрязнения значительное внимание уделяется исследованию почвенных фенолоксидаз (пероксидазы и полифенолоксидазы), которые играют заметную роль в процессах гумификации, оказывают защитное действие на почву, разлагая различные ксенобиотики, участвуют в многостадийных процессах разложения и синтеза органических соединений ароматического ряда [8. С. 238].

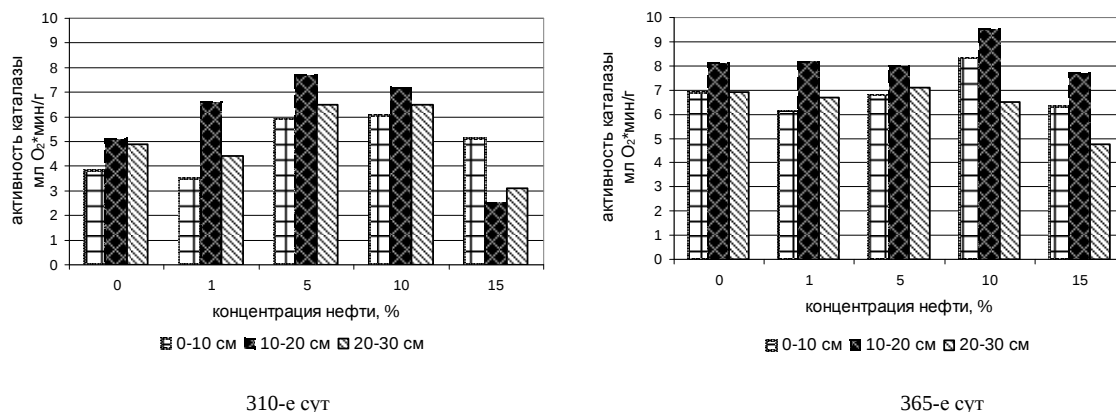


Рис. 3. Каталазная активность нефтезагрязненных черноземов

Исследования пероксидазной активности нефтезагрязненных почв показали, что в первый год после внесения поллютанта наблюдается отрицательная корреляционная зависимость между активностью фермента и концентрацией нефти в почве (рис. 4). Коэффициент корреляции r колеблется от $-0,92$ до $-0,98$ при $p \leq 0,05$ для разных слоев почвы и в разные сроки отбора почвенных проб.

Это объясняется отсутствием необходимых условий для активной деятельности исследуемого фермента в результате низкой его специфичности к катализи-

руемой реакции и снижением поступления кислорода к загрязненной части почвенного профиля. Увеличение пероксидазной активности выявлено лишь на 310-е сут, и проявляется оно только при относительно невысоких (1 и 5%) концентрациях нефти в слоях 0–10 и 10–20 см. На 365-е сут активность исследуемого фермента повышается и в слое 20–30 см, но уже при более высокой концентрации – 10%. При этом наблюдается сдвиг критической дозы нефти для исследуемого фермента с 5 до 15%.

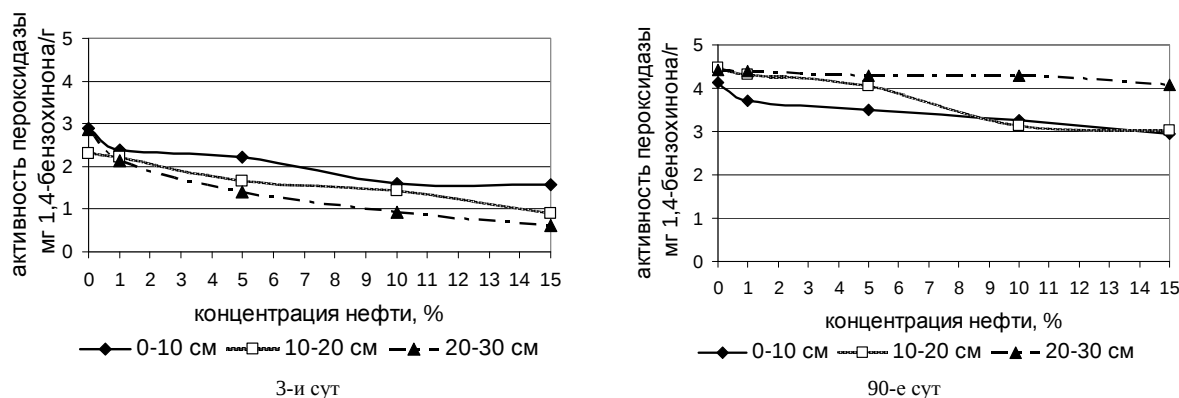


Рис. 4. Peroxidазная активность нефтезагрязненных черноземов

Активность полифенолоксидазы в первые периоды после внесения загрязнителя снижается при концентрации нефти 5, 10 и 15%. На 310-е сут в слое 20–30 см не происходит снижения полифенолоксидазной активности, где, по всей видимости, начинаются процессы трансформации продуктов нефтяного разложения в компоненты гумуса. Через год концентрации нефти 5, 10 и 15% стимулируют активность исследуемого фермента во всех слоях почвенного профиля, что свидетельствует об активации процессов разложения и трансформации органического вещества.

С активностью окислительно-восстановительных реакций тесно связана интенсивность еще одного важного биохимического процесса – выделения CO_2 , или «дыхания» почвы.

Интенсивность выделения CO_2 черноземом на 3-и сут после загрязнения снижается по мере увеличения концентрации нефти во всех слоях почвенного профиля. На 90-е сут в слое почвы 0–10 см начинается интенсивное выделение углекислого газа на участках с 1- и 5%-ным загрязнением, что связано с активизацией микробиологической деятельности в результате по-

ступления дополнительного органического вещества в почву. Подтверждением тому служит положительная корреляционная зависимость между интенсивностью «дыхания» почвы и ОМЧ, коэффициент корреляции $r = 0,95$ при $p = 0,027$.

На 310-е сут интенсивность «дыхания» черноземов при 15%-ной дозе нефти снижается, что объясняется, с одной стороны, низкой микробиологической активностью черноземов в весенний период (результат низких дневных и ночных температур воздуха), а с другой – недостаточным временем для восстановления биологической активности почв при столь высокой изначальной концентрации нефти.

Спустя год усиление эмиссии CO_2 происходит при концентрации загрязнителя 5, 10 и 15% во всех исследуемых слоях почвенного профиля (табл. 2). Подобная тенденция была выявлена и при исследовании численности углеводородокисляющих микроорганизмов, что подтверждается высоким коэффициентом корреляции между этими двумя важными показателями биологической активности почвы, равным 0,98 при $p = 0,014$.

Таблица 2

Интенсивность выделения CO_2 черноземов, загрязненных нефтью

Слой почвы, см	Концентрация нефти, %				
	Контроль (незагрязненная почва)	1	5	10	15
3-и сут					
0–10	32,72±0,08	32,70±0,02	22,12±0,01	11,64±0,07	11,60±0,08
10–20	32,44±0,03	32,12±0,07	22,46±0,09	11,26±0,05	10,74±0,04
20–30	31,22±0,05	31,02±0,06	21,28±0,04	11,14±0,02	10,74±0,09
90-е сут					
0–10	33,63±0,03	37,23±0,11	39,96±0,04	22,50±0,09	11,53±0,05
10–20	33,03±0,08	32,67±0,09	33,08±0,07	22,15±0,05	11,00±0,12
20–30	32,87±0,07	32,30±0,06	31,87±0,13	21,37±0,03	10,76±0,11
310-е сут					
0–10	32,77±0,14	35,90±0,08	35,10±0,07	36,80±0,05	21,53±0,09
10–20	32,17±0,10	32,15±0,05	38,68±0,06	37,96±0,11	20,77±0,04
20–30	31,00±0,09	30,98±0,03	36,18±0,04	34,25±0,07	20,36±0,03
365-е сут					
0–10	34,59±0,07	34,52±0,06	36,59±0,03	39,01±0,09	35,03±0,08
10–20	33,05±0,04	33,01±0,11	38,89±0,06	40,82±0,12	37,15±0,05
20–30	32,12±0,01	32,30±0,08	35,59±0,09	37,19±0,06	34,12±0,07

Целлюлозолитическая активность почв многими исследователями рассматривается в качестве интегрального показателя их биологической активности. Определение интенсивности разложения целлюлозы при нефтяном загрязнении показало, что в первые 90 сут общая активность

разложения целлюлозы ни на одном из опытных участков не превышала 50%. В наибольшей степени целлюлозолитическую активность почвы подавляла максимальная концентрация нефти. На завершающем этапе исследований (365-е сут) выявлен обратный процесс: концентрация

нефти 10 и 15% вызывает увеличение активности разложения целлюлозы в сравнении с контролем; в отдельных случаях доля разложившейся ткани превышала 50%, в связи с чем можно судить об усилении минерализации органического вещества и, как следствие, об активизации процессов детоксикации почвы на этих участках.

Концентрация нефти 1% на момент завершения работ не вызывает достоверного изменения целлюлозолитической активности, что может свидетельствовать о прекращении процессов утилизации поступивших в почву углеводов из-за их полной минерализации.

Таким образом, в процессе выполненных исследований установлен уровень концентрации нефти в черноземах обыкновенных, выше которого чернозем не может самостоятельно, без осуществления комплекса работ по очистке почв от углеводородного сырья, справиться с нефтяным загрязнением.

Этот предел оказался равным 5%. Как следствие, судя по изменению микробиологической и ферментативной активности, чернозем обыкновенный при 1–5%-ном загрязнении нефтью способен в течение года самовосстанавливаться.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Шорина Т.С.* Использование показателей ферментативной активности для диагностики состояния почв и их мониторинга: материалы II Междунар. науч.-практ. конф. и «Экология биосистем: Проблемы изучения, индикации и прогнозирования». Астрахань : Астраханский университет, 2009. С. 106–107.
2. *Узких О.С., Хомяков Д.М.* Показатели биологического мониторинга при нефтяных загрязнениях почв // Экология и промышленность России. 2009. № 5.
3. *Margesin R., Zimmerbauer A., Schinner F.* Monitoring of bioremediation by soil biological activities // Chemosphere. 2000. V. 40.
4. *Щербаков А.П., Кутова Н.Я., Девятова Т.А.* Характеристика биологической активности черноземов Центрально-Черноземной зоны // Агро-экологические принципы земледелия : сб. ст. М. : Наука, 1993.
5. *Тыныбаева Т.Г., Кураков А.В.* Мониторинг загрязнения сорных солончаков и насыпных грунтов нефтяными углеводородами на месторождении Северные Бузачи (Казахстан) // Доклады по экологическому почвоведению. 2006. Вып. 3. Раздел : Экология почв. № 3. С. 63–74.
6. *Новоселова Е.И.* Экологические аспекты трансформации ферментативного пула почвы при нефтяном загрязнении и рекультивации : автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Уфа, 2007. 41 с.
7. *Алиев С.А., Гаджиев Д.А.* Влияние загрязнения нефтяным органическим веществом на активность биологических процессов почв // Известия АН АзССР. Сер. биол. науки. 1977. № 2.
8. *Русанов А.М., Шорина Т.С.* Оценка влияния нефтяного загрязнения на свойства чернозема обыкновенного // Сборник материалов IV Всероссийской научной конференции с международным участием «Отражение био-, гео-, антропоферных взаимодействий в почвах и почвенном покрове». Томск, 2010. Т. 2.

Статья представлена научной редакцией «Биология» 29 мая 2012 г.