

## ОЦЕНКА КАЧЕСТВА РЕКУЛЬТИВАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ЗЕМЕЛЬ ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВ

<sup>1</sup>Томский И.С., <sup>2</sup>Ерофеевская Л.А., <sup>1</sup>Томская Л.А.

<sup>1</sup>Политехнический институт (филиал) ФГАОУ ВПО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова», Мирный, Россия (678175 Россия, Республика Саха (Якутия), г. Мирный, ул. Тихонова, 5/1)

<sup>2</sup>Институт проблем нефти и газа СО РАН, Якутск, Россия (677980 Россия, Республика Саха (Якутия), г. Якутск, ул. Октябрьская, 1), e-mail: istomsky@yandex.ru

---

Настоящая статья посвящена исследованию штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов, выделенных и культивированных из почв, используемых при восстановлении земель Северных и Арктических территорий от нефтяных загрязнений, возникающих при аварийных разливах нефти и нефтепродуктов, бурении, освоении и эксплуатации нефтяных и газовых скважин, а также при транспортировке нефти. Актуальность исследований связана с особой ранимостью и долгим регенерационным периодом криогенной почвы, обусловленным природно-климатическими условиями. Рассмотрены вопросы индикации эффективности действия микроорганизмов на нефтезагрязненных почвах с помощью оценки активности фермента - уреазы. Обнаружена прямая корреляционная зависимость уреазной активности от степени нефтезагрязнения в различных видах почв. Установлено, что с помощью индикации уреазной активности можно оценивать степень восстановительного действия штаммов аборигенных микроорганизмов и биопрепаратов «Дестройл» и «Байкал ЭМ-1» на нефтезагрязненные почвы.

---

Ключевые слова: рекультивация, ферментативный анализ, уреазы, нефтезагрязненные почвы, нефтеокисляющие микроорганизмы.

## QUALITY ASSESSMENT OF LAND RECLAMATION CONTAMINATED ON INDICATORS ENZYMATIC ACTIVITY OF SOILS

<sup>1</sup>Tomskiy I.S., <sup>2</sup>Erofeevskaya L.A., <sup>1</sup>Tomskaya L.A.

<sup>1</sup>Politehnicheskyy Institute (branch) «North-Eastern Federal University named after M.K. Ammosov, Mirny, Russia (678175 Russia, Republic of Sakha (Yakutia), Mirny, Tikhonov Str., 5/1)

<sup>2</sup>Oil and gas research institute SB RAS, Yakutsk, Russia (677980 Russia, Republic of Sakha (Yakutia), Yakutsk Oktyabrskaya Str., 1), e-mail: istomsky@yandex.ru

---

This article is devoted to the study of oil-oxidizing microorganisms, strains and cultivated soils of the area used for land reclamation of Nordic and Arctic territories from oil pollution resulting from accidental oil spills and oil drilling, development and exploitation of oil and gas wells, and oil transportation. The importance of the research is also highlighted by the fact that cryogenic soils have special vulnerability and a long regeneration period conditioned by climate. The article reveals the effectiveness of microorganisms on contaminated soils by means of the estimation of enzyme activity - urease. There was also found a correlation based on the urease activity of oil pollution in different types of soils. It was established, that remedial actions of aboriginal strains of microorganisms and biological products based on «Destroyl» and «Baikal EM-1» on oil-contaminated soils can be assessed by the indication of the urease activity.

---

Keywords: reclamation, enzymatic assay, urease, oil-contaminated soil, oxidizing microorganisms.

В настоящее время техногенное загрязнение природной среды является одной из актуальных экологических проблем во всем мире, так как создает угрозу стойкого и необратимого изменения химического состава, физических, биохимических и микробиологических свойств почвы, определяющих ее плодородие. Для оценки состояния почвы в измененных и изменяющихся условиях окружающей среды основное значение приобретают не собственно количественные характеристики загрязнений, а их последствия.

Почва подвергается интенсивному антропогенному влиянию и служит одним из опасных звеньев циркуляции промышленных и сельскохозяйственных токсических веществ.

Разнообразные химические реакции в почве, связанные с обменом веществ, разложением и синтезом органических веществ, миграцией химических соединений, мобилизацией питательных элементов другими факторами, осуществляются ферментативно. Высокая чувствительность, точность, относительная простота и нетрудоемкость методов определения активности почвенных ферментов позволяют использовать их при оценке интенсивности и направленности важнейших для жизни и плодородия почвы биохимических процессов. По активности ферментов судят об агрономически значимых показателях, плодородии, превращении гумусовых веществ, окислительно-восстановительном режиме почвы. Активность ферментов отражает интенсивность основных биохимических процессов – самоочищение почвы и разложение органических соединений азота, фосфора, углерода, а также степень эродированности и загрязнения почвы.

Биодиагностика состояния и степени загрязнения почв по ферментативным показателям приобрела в последнее время особенно важное значение. Отсутствие стандартных, унифицированных методов определения активности почвенных ферментов пока затрудняет выявление возможности и области использования ферментов в целях биодиагностики.

Использование ряда ферментативных показателей при оценке общей биологической активности плодородия почвы в настоящее время общепринято. В качестве диагностического показателя загрязнения почв наиболее перспективными оказались ферменты класса оксидоредуктаз, в частности дегидрогеназы. Высокая чувствительность дегидрогеназ к химическим веществам используется при оценке токсичности сточных вод промышленных предприятий. Все это послужило основанием при выборе активности дегидрогеназ в качестве одного из диагностических показателей загрязнения почв [2].

Перспективным способом очистки и восстановления почв от нефтяных загрязнений является их обработка штаммами нефтеокисляющих микроорганизмов, выделенных и культивированных в данной местности. Под воздействием микроорганизмов нефть и нефтепродукты подвергаются деструкции за счет использования их клетками бактерий или грибов в качестве источников питания. В процессе жизнедеятельности клеток углеводороды превращаются в органические вещества, используемые как строительный материал для роста и развития другой почвенной микрофлоры.

Применение биопрепаратов на основе штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов, способных утилизировать загрязняющие вещества и защищать почвы от воздействия патогенной микрофлоры, что особенно актуально для растительных покровов Северных территорий и Арктики, поскольку криогенные почвы обладают особой ранимостью. Такой подход к решению данной проблемы позволяет в короткие сроки в суровых климатических

условиях предотвратить распространение веществ-загрязнителей на природные ландшафты, повысить плодородие почв, а также значительно улучшить санитарное состояние, как на самих загрязненных участках, так и на смежных территориях.

Однако, активная жизнедеятельность почвенных микроорганизмов возможна лишь при определенных оптимальных условиях. Это вызывает необходимость разработки технологий применения бактериальных препаратов нефтеокисляющих микроорганизмов для каждой почвенно-климатической зоны с целью адаптации микроорганизмов к условиям среды их обитания. Такого рода исследования и работы особо значимы в суровых условиях Северных регионов России, в частности Якутии с коротким, жарким и сухим летом и длинной, суровой зимой.

Почва и ее сложное микробиологическое сообщество до некоторой степени способны воспринимать и разлагать разнообразные загрязнители на основе нефти, превращая их в нетоксические формы. Микробы обладают способностью производить внеклеточные ферменты, приводящие к расщеплению сложных углеводородных соединений, что ведет к их трансформации в питательную среду. Этот процесс продолжается до тех пор, пока все источники питания не будут разложены до двуокиси углерода, воду и биомассу, которые служат пищей для других микроорганизмов и высших сообществ живой природы. Все это вызывает необходимость более детального изучения почвенных внеклеточных ферментов, как инициаторов и катализаторов расщепления углеводородных соединений широкого спектра [1,3].

Эффективность обработки нефтезагрязненных территорий микробиологическими препаратами можно проследить по изменению активности почвенных внеклеточных ферментов. Одним из таких ферментов является уреаза. Из-за сложности анализа механизма действия фермента, исследовались только уровни ее активности, что и являлось целью настоящей работы.

Исследования проводились в лабораторно-полевых условиях на различных участках, загрязненных от разлива сырой нефти, по пути следования трассы трубопроводной системы «Восточная Сибирь – Тихий Океан». Объектами исследований служили почвы фоновых и нефтезагрязненных территорий с внесением биопрепаратов Байкал ЭМ-1 и Дестройл совместно используемых с препаратами приготовленными из аборигенных микроорганизмов.

Биопрепарат Байкал ЭМ-1 – успешная отечественная разработка, основанная на применении микробиологических факторов воздействия на растения. Байкал ЭМ-1 принципиально отличается от всех известных удобрений. В состав препарата входят: молочнокислые, азотофиксирующие, фотосинтезирующие бактерии и дрожжи.

Молочнокислые бактерии – очищают землю от вредных химикатов. На бедных почвах по максимуму помогают выделить труднодоступные питательные вещества. Так же эти микроорганизмы помогают бороться с сорняками, разлагая их отсеченный после прополки корень, оставленный в земле. Азотфиксирующие бактерии – не дают азоту покидать почвенно-удерживающий комплекс, испаряясь в виде аммиачных соединений. Положительно влияют на развитие растений на всех этапах. Фотосинтезирующие бактерии – омолаживают растение, регенерируя клетки и ткани. Дрожжи (аэробные и анаэробные пласты) – вырабатывают вещества, защищающие растение от болезней. В состав комплекса включен новый вид микроорганизмов – (*Torulopsis Curunga*), открытых создателем препарата, П.А. Шаблиным. В этом препарате содержится около 1 млрд. эффективных микроорганизмов на 1 литр объема. Так же в жидкости содержатся остатки жизнедеятельности и питательная среда, на которой эти бактерии выращивались. Для применения Байкал ЭМ-1 разводят в пропорции 1:1000.

Действие биопрепарата Дестройл основано на высокой окислительной активности микробной культуры в отношении углеводов нефти и нефтепродуктов. Нефтеокисляющие бактерии разрушают практически все углеводороды, от метана до самых тяжелых остатков. В качестве источников питания используются углеводороды и минеральные соли. Внесение минеральной подкормки стимулирует при этом и местные биоценозы. Отмершие клетки культуры-продуцента образуют непатогенную и нетоксичную биомассу, которая в трофической цепи легко утилизируется местной сапрофитной микрофлорой, создавая основу для формирования гумуса в почве или образуя донный ил. Дестройл производится в виде порошка или пасты, состоящих из клеток микроорганизма, обладающих углеводородоокисляющей активностью с концентрацией не менее 100 млн. клеток в 1 г. препарата. Для ускорения процесса бактериологического разложения нефти в рабочий раствор вносят Hydrobreak PLUS в количестве 1:500 рабочей суспензии, а в случае вязких или засохших нефтепродуктов Hydrobreak POWER в количестве 1:100 рабочей суспензии.

Пробы почвы для определения активности уреазы были отобраны послетехнической рекультивации. Активность уреазы определяли колориметрическим методом на спектрофотометре СЕСІL Aquarius при длине волны 400нм. Для этого берут 5 г воздушно-сухой почвы, помещают в колбу ёмкостью 100 мл, приливают 20 мл 2%-ного раствора мочевины в фосфатном буфере (рН=6,7) и 200 мкл толуола. Колбу плотно закрывают и помещают в термостат при температуре 37°С на 4 ч. После экспозиции приливают 1 мл 50%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Затем для вытеснения из почвы поглощенного аммиака доливают 50 мл 1н. раствора хлористого калия. Содержимое колб фильтруют 2 мл

фильтрата, помещают в мерную колбу объемом 50 мл, разводят водой до 30 мл, затем приливают 2 мл 50%-ного раствора сегнетовой соли и 2 мл реактива Несслера. В мерной колбе раствор доводят до метки, перемешивают и окрашенный раствор колориметрируют при длине волны 400 нм. Контроли ставят с реактивами без почвы и с почвой без субстрата. В оба контроля после экспозиции также добавляют трихлоруксусную кислоту. Содержание аммиака в фильтрате рассчитывают по стандартной кривой. Активность уреазы выражают в миллиграммах N-NH<sub>4</sub> на 1 г почвы за 4 ч.[6].

В результате анализа были получены следующие данные активности уреазы в зависимости от типа почв, которые представлены в нижеследующей таблице.

**Таблица**

**Активность уреазы от типа почвы**

Тип почвы	Участки	Опыт	Активность уреазы, %
Дерново-подзолистая суглинистая	1	Т-4	100
		У-3	8,5
		У-6	6,2
		У-8	16,4
		У-7	0,3
Мерзлотная подзолистая	2	Ф-1	100
		Д1-2	3,8
		А-4	125,8
	3	Ф-04	100
		С-4	71,2
		С-14	50,3
		СУ-5Б	262,1

Примечание: Т, Ф – фоновая, У, С – нефтезагрязненные участки, А – участки обработанные аборигенными микроорганизмами, Д1-2 – участки обработанные аборигенными микроорганизмами с препаратом «Дестройл», СУ-5Б – участки обработанные аборигенными микроорганизмами с препаратом «Байкал ЭМ-1».

Как видно из приведенных данных, уже первичная микробиологическая обработка загрязненных дерново-подзолистых суглинистых почв приводит к уменьшению общего содержания нефти и нефтепродуктов, но активность уреазы при этом не достигает фонового значения. Тогда как, обработка мерзлотных подзолистых типов почв аборигенными микроорганизмами дает более эффективные результаты. Следует отметить, что добавление препарата «Дестройл» (Д1-2) к вытяжке аборигенных микроорганизмов при обработке почв приводит к угнетению активности уреазы, что свидетельствует о неэффективном применении данного препарата. Использование препарата «Байкал ЭМ-1» (СУ-5Б) наоборот приводит к увеличению уреазной активности более чем в 2,5 раза[5].

Таким образом, определяя уровень уреазной активности можно судить об интенсивности жизнедеятельности почвенных микроорганизмов, участвующих в восстановлении нефтезагрязненных земель. Уреазная активность показывает также

необходимость проведения рекультивационных работ в несколько этапов для достижения желаемых результатов.

Для ускорения процесса восстановления плодородия нарушенных земель, после биологической очистки в опытных участках, была проведена фитомелиорация. В процессе выполнения исследования использовалась методика рекультивации, согласно РД 39-00147105-006-97 [4]. Перед высевом трав проводилось биотестирование нескольких сортов растений, способных расти на разных типах почв, загрязненных нефтью.

По результатам этого тестирования для фиторекультивации нарушенных территорий отбирались растения с наиболее высокими показателями всхожести и способностью дернообразования в нефтезагрязненном субстрате, а именно: тимофеевка луговая (*Phleumpratense*); вика посевная (*Viciasativa*); овес посевной (*Avenasativa*); ежа сборная (*Dactylisglomerata*); овсяница луговая (*Festucapratensis*). Все семена имели сертификаты сортовой идентификации и карантинной экспертизы. Через 100 дней после посева на рекультивируемых участках был отмечен травостой, высота которого варьировала от сорта растений.

Таким образом, задача доочистки нефтезагрязненных площадок решалась тем, что в почвы нарушенной территории вносились биопрепараты, содержащие полезные микроорганизмы, культивированные в среде, содержащей именно ту нефть, которая была разлита на конкретных участках. Тем самым, создаются условия для обеспечения симбиотического роста почвенных бактерий и грибов нефтезагрязненного участка. К окончанию проведения экспериментов, почвенно-растительный слой опытных участков были переведены в состояние, соответствующее безопасному уровню, который характеризует способность почв к естественному самоочищению.

### Список литературы

1. Березин, И.В., Мартинек, К. Основы физической химии ферментативного катализа / Учеб.пособие для студентов хим. и биол. фак. ун-тов. – М.: Высшая школа, 1977.– 280 с.
2. Булатов, А.И., Макаренко, П.П., Шеметов, В.Ю. Справочник инженера-эколога нефтедобывающей промышленности по методам анализа загрязнителей окружающей среды: в 3 ч. М.: ООО «Недра-Бизнесцентр», 1999г. Ч. 2: Почва. – 634 с.
3. Полторац, О., Чухрай Е. Физико-химические основы ферментативного катализа. – М.:Высшая школа, 1970. –360 с.

4. РД 39-00147105-006-97 «Инструкция по рекультивации земель, нарушенных и загрязненных при аварийном и капитальном ремонте магистральных нефтепроводов». – Уфа, 1997.
5. Томский, И.С., Ерофеевская, Л.А. Изучение активности фермента уреазы в мерзлотных почвах Якутии, загрязненных углеводородами нефти // Химия и химическое образование: Мат-лы 5-го Межд. симпозиума / (ДВФУ, 12 - 18 сент. 2011 г.). – Владивосток, 2011. – С. 51-53.
6. Хазиев, Ф.Х. Методы почвенной энзимологии / Ин-т биологии Уфим. НЦ. – М.: Наука, 2005. – 252 с.

**Рецензенты:**

Коробков И.Г., д.г.-м.н., профессор, ведущий научный сотрудник Научно-исследовательского геологоразведочного предприятия АК АЛРОСА (ПАО), г. Якутск;  
Петрова Н.Н., д.х.н., профессор, заведующий кафедрой общей, аналитической и физической химии Института естественных наук Северо-Восточного федерального университета имени М.К. Аммосова, г. Якутск.