

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
\_\_\_\_\_ Т.Г. Волова  
« \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2022 г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Влияние сорбентов серии «Унисорб» на структуру микробиоценоза и  
ферментативную активность почвы

06.04.01 Биология

06.04.01.01 микробиология и биотехнология

Научный  
руководитель \_\_\_\_\_ проф., д-р биол. наук С. В. Прудникова  
Выпускник \_\_\_\_\_ К. А. Туркин  
Рецензент \_\_\_\_\_ канд. биол. наук Г. И. Антонов

Красноярск 2022

## РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация на тему «Влияние сорбентов серии «Унисорб» на структуру микробиоценоза и ферментативную активность почвы» представлена в объёме 60 страниц, включает в себя 15 иллюстраций, 3 таблицы, а также список использованной литературы из 53 источников.

*Ключевые слова:* ПОЛИМЕРНЫЕ СОРБЕНТЫ, НЕФТЬ И НЕФТЕПРОДУКТЫ, БИОРЕМЕДИАЦИЯ.

*Цель:* оценить влияние сорбентов линии «Унисорб» на микрофлору и ферментативную активность почвы при проведении ремедиационных мероприятий.

*Задачи:* 1) оценить влияние сорбентов «Унисорб» на общую численность бактерий и микромицетов в нефтезагрязнённой почве и почве без загрязнителя; 2) исследовать влияние сорбентов на уреазную и инвертазную активность нефтезагрязнённой почвы и почвы без загрязнителя; 3) провести количественный анализ на пероксидазу, полифенолоксидазу и рассчитать коэффициент гумификации исследуемых почв; 4) выделить и идентифицировать доминирующие штаммы бактерий из каждого образца и исследовать их биохимические особенности.

*Актуальность* выбранной темы характеризуется большим количеством нефтяных загрязнений, в результате которых почвы становятся непригодными для использования. Полимерные сорбенты – перспективный и современный инструмент для проведения ремедиационных мероприятий.

*Основные выводы и результаты исследования:*

1. Внесение сорбентов в почвы не оказывало ингибирующего влияния на численность микроорганизмов на протяжении всего эксперимента.

2. К концу эксперимента уреазная и инвертазная активность нефтезагрязнённых почв имела высокие значения, что свидетельствует о протекании процессов ремедиации при внесении сорбентов.

3. Внесение сорбентов не оказало ингибирующего влияния на активность окислительных ферментов в чистых почвах и стимулировало восстановление естественной динамики в нефтезагрязнённых.

4. Изученные сорбенты могут быть рекомендованы для проведения ремедиационных мероприятий на территориях со слабым и средним уровнем нефтяного загрязнения.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 Обзор литературы .....	7
1.1 Нефтяные загрязнения.....	7
1.2 Влияние нефтяных загрязнений на свойства и биологическую активность почв.....	9
1.3 Трансформация углеводов в почве.....	10
1.4 Рекультивация нефтезагрязнённых почв.....	12
1.4.1 Механические методы.....	13
1.4.2 Химические методы.....	14
1.4.3 Физико-химические методы.....	14
1.4.4 Использование сорбентов в ремедиации.....	15
1.5 Ферментативная активность почв.....	17
1.5.1 Почвенная уреаса.....	19
1.5.2 Почвенная инвертаза.....	20
1.5.3 Пероксидаза, полифенолоксидаза и коэффициент гумификации почв.....	21
2 Объекты и методы исследования.....	23
2.1 Описание исследуемых сорбентов.....	23
2.2 Объект исследования и характеристика района исследования.....	24
2.3 Метод отбора проб.....	26
2.4 Метод определения общей численности микроорганизмов.....	27
2.5 Методы определения ферментативной активности почвы.....	28
2.5.1 Определение активности инвертазы.....	29

2.5.2	Определение активности уреазы .....	29
2.5.3	Определение активности пероксидазы, полифенолоксидазы и расчёт коэффициента гумификации почвы .....	30
2.6	Метод выделения чистых культур доминирующих микроорганизмов.....	31
2.7	Методы определения тинкториальных и биохимических особенностей выделенных штаммов .....	31
2.8	Метод идентификации видовой принадлежности микроорганизмов .....	33
3	Результаты исследования .....	35
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	53
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	55

## **ВВЕДЕНИЕ**

На сегодняшний день актуальным вопросом экологии является последствие загрязнений окружающей среды различными веществами.

Одной из экологических проблем России является загрязнение природных сред нефтепродуктами, которое наблюдается не только в нефтедобывающих районах, но и в городах. Исследования в этой области ведутся не только Российскими, но и зарубежными учёными. Объём подобных исследований с каждым годом становится всё больше [1].

Известным фактом является то, что попадание нефти и нефтепродуктов в природные среды вызывает глубокие, зачастую необратимые изменения жизненно важных показателей, что делает эти среды непригодными для их дальнейшего существования и использования [2].

При попадании нефтепродуктов в почву, происходит полная перестройка её профиля, нарушаются морфологические, физико-химические свойства, а также происходит угнетение почвенной микробиоты. Результатом этих процессов является потеря почвами плодородия и возможности к ремедиации, что приводит к потерям общей площади эксплуатируемых сельскохозяйственных почв.

Основными деструкторами нефти в почве являются аэробные хемогетеротрофные микроорганизмы – бактерии, грибы, дрожжи. Установлено, что наличие в среде загрязнителя в высоких концентрациях угнетает их активность, что приводит к замедлению, либо полной остановке процессов ремедиации [3].

Одним из современных методов очистки сред от нефти и нефтепродуктов является использование сорбентов различного состава. Их использование позволяет снизить концентрацию загрязнителя в среде [4].

Основываясь на вышеперечисленных фактах, можно говорить о том, что актуальной экологической задачей становится комплексное изучение методов и процессов ремедиации.

В связи с этим в работе была поставлена цель – оценить влияние сорбентов линии «Унисорб» на микрофлору и ферментативную активность почвы при проведении ремедиационных мероприятий.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- оценить влияние сорбентов «Унисорб» на общую численность бактерий и микромицетов в нефтезагрязнённой почве и почве без загрязнителя;

- исследовать влияние сорбентов на уреазную и инвертазную активность нефтезагрязнённой почвы и почвы без загрязнителя;

- провести количественный анализ на пероксидазную и полифенолоксидазную активность и рассчитать коэффициент гумификации исследуемых почв;

- выделить и идентифицировать доминирующие штаммы культивируемых бактерий из образцов почвы, содержащих разные сорбенты, и исследовать их биохимические особенности.

Работа выполнялась на базовой кафедре биотехнологии ИФБиТ в рамках хоздоговора № х/д31222 НИЧ СФУ от 02.03.2020 «Определение показателей биodeградации сорбентов «Унисорб», «Унисорб-Био» в чистых и нефтезагрязнённых почвогрунтах».

# 1 Обзор литературы

## 1.1 Нефтяные загрязнения

Развитие промышленности не может пройти бесследно для окружающей среды. Это же касается и нефтехимической промышленности, развивающейся с каждым годом. Разработка нефтяных месторождений, транспортировка и переработка нефти и нефтепродуктов – процессы, во время которых углеводороды нефти могут попасть в окружающую среду и оказать тем самым колоссальное влияние на экосистему. Происходит это, как правило, из-за несовершенства существующих технологий или по причине износа оборудования [5].

Согласно отчетам Федеральной службы по надзору в сфере природопользования о состоянии и охране окружающей среды в 2020 году на территории Российской Федерации было зарегистрировано 49 аварий, связанных с разливом нефтепродуктов, а в 2021 – 32 аварии. В результате этих происшествий около 200 гектаров площадей оказались загрязнёнными, а объём поступивших в окружающую среду нефтепродуктов превышал 8000 кубических метров.

Анализируя отчёты Федеральной службы по экологическому, технологическому и атомному надзору, а также данные Генеральной прокуратуры и Министерства энергетики Российской Федерации за последние 10 лет, можно заметить, что средние значения количества аварий и загрязнённых территорий остаются на одном уровне. Основная доля аварий происходит из-за коррозии металла труб. Наибольший вред в результате разлива нефтепродуктов причиняется почве и наземным экосистемам. Мероприятия по восстановлению загрязнённых территорий проводятся лишь в 10% случаев [6, 7, 8, 9].

Протяжённость действующих в России нефтепроводов оценивается приблизительно в 400 тысяч километров, более половины из них находятся в эксплуатации уже более 10 лет, а треть – более 20. При этом, согласно

нормативным документам, срок службы нефтепровода составляет от 5 до 10 лет. Эксплуатация нефтепроводов по истечении их рекомендуемого срока службы приводит к износу, который становится причиной попадания нефтепродуктов в окружающую среду. На местах нефтедобычи и нахождения нефтепроводов обнаруживаются территории, где полностью отсутствует какая-либо растительность, площадь таких территорий может достигать 15% от освоенной [10, 11].

Предприятия, занимающиеся нефтепереработкой и нефтехимией, а также нефтебазы, автозаправочные станции и автотранспортные организации также являются местами, территория вокруг которых подвержена значительному загрязнению нефтепродуктами. В таких местах нефтепродукты накапливаются в подпочвенных горизонтах и с грунтовыми водами распространяются на большие расстояния, причиняя вред экосистемам близлежащих территорий [6, 7, 8, 11].

Формы, в которых нефтепродукты могут находиться в окружающей среде, разделяют на 4 основных типа:

- свободная форма: из-за разной плотности не происходит смешивания нефти и субстрата, например, на поверхности воды или линзы на поверхности грунтовых вод;
- растворённая: смешивание нефтепродуктов с субстратом;
- адсорбированная: за счёт физико-химических взаимодействий углеводороды связываются с частицами почвогрунтов;
- испарённая: испаряющиеся с поверхности углеводороды или заземлённые и перемещающиеся в капиллярной системе почвогрунта углеводороды [12].

Всё вышеизложенное показывает, что нефтяные загрязнения и их последствия – это серьёзная экологическая проблема, требующая решения, так как ежегодно происходит большое количество разливов нефтепродуктов, классифицируемых от локальных до федеральных, приводящих к деградации окружающей среды.



## **1.2 Влияние нефтяных загрязнений на свойства и биологическую активность почв**

Почва — это динамическая и развивающаяся система, состоящая из органических и неорганических компонентов, содержащая в себе совокупность живых организмов, называемых биотой. Функции почвы невозможно недооценить, поскольку она является инструментом для синтеза биомассы, обладает фильтрующими и буферными свойствами, служит местом обитания множества организмов и хранителем генов, а также является основой жизнедеятельности человека и источником сырьевых материалов. Скорость почвообразования очень мала и составляет приблизительно 30 см в 5000 лет, поэтому её можно считать невозобновляемым ресурсом [4].

Попадание нефти в почву оказывает негативное влияние на её физико-химические и морфологические свойства, а также оказывает воздействие на её биоту, что приводит к перестройке почвенного профиля и затрудняет или делает невозможными выполнение её функций.

При попадании нефтепродуктов в почву происходит склеивание её частиц, вытеснение воздуха и воды, заполнение пор нефтью. Всё это приводит к тому, что плотность почвы увеличивается, образуются бескислородные пространства, нарушаются потоки питательных веществ и элементов, влага и вещества распределяются неравномерно [13].

Как было отмечено выше, почву населяет большое количество организмов. По литературным данным [4], их масса, приходящаяся на верхний тридцатисантиметровый слой почвы площадью в один гектар, составляет около 25 тонн: 10 тонн бактерий и актиномицетов, 10 тонн грибковых организмов, 4 тонны земляных червей и 1 тонна других почвенных организмов. Попадание нефти и нефтепродуктов в почву оказывает влияние на функциональные процессы почвенной биоты, угнетается жизнедеятельность микроорганизмов, снижается их численность

и ферментативная активность, замедляются естественные процессы ремедиации. Нефть и продукты её переработки оказывают токсическое, наркотическое, канцерогенное действие. Некоторые вещества в составе нефтепродуктов могут оказывать стимулирующее действие [13, 14].

Наибольшее негативное влияние нефти отмечается на гетеротрофные микроорганизмы. Самыми чувствительными являются нитрифицирующие бактерии, а микроорганизмы способные к осуществлению аммонификации, денитрификации и азотфиксации являются слабочувствительными и увеличивают свою численность после загрязнения.

### **1.3 Трансформация углеводов в почве**

Попавшие в почву нефтепродукты подвергаются сложному многоэтапному процессу разложения, происходящему с различными скоростями и основанному на физико-химических, синтетических и биологических механизмах. Среди физических факторов можно выделить испарение и вымывание. К химическим механизмам относят фотолит и биохимическое разрушение. Биологические – микробное разрушение [15, 16].

Первый этап, начинающийся непосредственно после попадания углеводов нефти в почву продолжается приблизительно 12-24 месяца. В этот период происходят процессы вымывания, испарения и окисления, углеводороды перераспределяются по почвенному профилю, содержание лёгких углеводов снижается, образуются простые эфиры, ненасыщенные алканы и спирты [17].

На втором этапе происходит биологическая трансформация нефтепродуктов. Она обусловлена тем, что некоторые микроорганизмы способны использовать углеводороды нефти в качестве субстрата для роста, что обусловлено наличием специфических ферментов. Основными участниками этого процесса являются аэробные хемогетеротрофные

микроорганизмы, к которым относятся бактерии, грибы и дрожжи. Наиболее распространёнными представителями являются бактерии родов *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Mycobacterium* и другие; мицелиальные грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium* и *Fusarium*; дрожжи рода *Candida* [18].

В зависимости от нагрузки (от концентрации нефтепродуктов, попавших в почву) микробные сообщества могут по-разному реагировать на такой тип загрязнения. Если нагрузка оказалась низкой или средней, то преимущество получает популяция с большей плотностью. Если же нагрузка оказалась высокой, то преимущество получают виды, способные эффективнее использовать углеводороды нефти и расти быстрее.

Состав микроорганизмов в почвенном сообществе зависит также и от времени, которое прошло с момента загрязнения. Н. А. Киреева и В. В. Водопьнова в своей работе выделяют пять основных стадий, происходящих от начала загрязнения до снижения концентрации загрязнителя и восстановления: отмирание, адаптация, линейный и экспоненциальный рост, стабилизация. На первом этапе происходит отмирание микроорганизмов в связи с попаданием загрязнителя сразу по нескольким причинам, во-первых, нефть образует анаэробные пространства, в которых не способны существовать аэробные виды, во-вторых, не все микроорганизмы способны использовать углеводороды нефти в качестве субстрата для роста. На втором этапе происходит адаптация, конкурентное преимущество получают микроорганизмы, способные усваивать углеводороды нефти. Затем следует стадия активного роста микроорганизмов, получивших преимущество, после чего численность популяции стабилизируется до тех пор, пока количество загрязнителя, а значит и питательного субстрата не снизится. При этом многие авторы отмечают, что после снижения концентрации загрязнителя видовой состав микроорганизмов восстанавливается к исходному.

Третий этап деградации нефтепродуктов в почве наступает приблизительно через 50 месяцев и характеризуется тем, что в почве

остаются наиболее устойчивые высокомолекулярные соединения. Как правило, это смолисто-асфальтеновые фракции. Эти фракции подвергаются разрушению всеми почвенными механизмами. Конечные продукты – двуокись углерода, вода, спирты, кетоны, кислоты. Эти вещества частично входят в состав почв и частично растворяются в воде [15 - 19].

#### **1.4 Рекультивация нефтезагрязнённых почв**

Под рекультивацией нефтезагрязнённых почв понимают комплекс мероприятий, проводимых с целью снижения антропогенного воздействия на экосистему почвы, в которую по каким-либо причинам попала нефть или нефтепродукты. Полютант в почве снижает её хозяйственную ценность и продуктивность, делая землю на долгое время непригодной для использования человеком. Во время мероприятий по рекультивации почв необходимо удалить максимально возможное количество загрязнителя (снизить его содержание до безопасного для экосистемы уровня) и восстановить показатели продуктивности и ценности [20].

Упоминая процедуру рекультивации почвы, нельзя не вспомнить о том, что естественные экосистемы обладают способностью к самовосстановлению. Этот же процесс характерен и для нефтезагрязнённых почв. Процесс естественной ремедиации почвенной экосистемы протекает очень длительно, поскольку нефть и нефтепродукты изменяют её физико-химические и биологические показатели. Основной причиной снижения скорости самовосстановления является изменение температурного режима и нарушение аэрации загрязнённых почв. В таких условиях снижается активность аборигенной микрофлоры, скорость работы ферментов и протекания химических реакций [21].

В связи с этим важной задачей становится модификация уже существующих и поиск новых способов очистки территорий от загрязнений.

На данный момент существует большое разнообразие методов очистки почвы, которая была загрязнена нефтепродуктами:

- механические методы;
- химические методы;
- физико-химические методы;
- биологические методы.

При этом необходимо понимать, что для каждого конкретного случая подбирается самый оптимальный способ, подходящий под имеющиеся условия. К факторам, влияющим на выбор метода очистки, относятся:

- климатические условия территории, на которой произошло загрязнение;
- ландшафтные условия территории;
- уровень загрязнения, который оценивается по количеству попавшей в окружающую среду нефти и нефтепродуктов;
- состав загрязнителя;
- продолжительность загрязнения;
- свойства почвы [22-24].

#### **1.4.1 Механические методы**

Под механическими методами очистки обычно подразумеваются процессы перемешивания и физического разделения почвы и загрязнителя. В первую очередь загрязнённый участок изолируют, чтобы не допустить дальнейшего распространения загрязнителя, после чего с использованием специальной техники нефтепродукты откачивают в ёмкости, которые доставляются на полигоны, для естественного разложения загрязнителя [25].

Похожим способом является замена почвы. В этом случае верхний слой почвы, подвергшейся загрязнению, удаляют и отвозят на полигоны. В естественных условиях процесс разложения нефти может занимать до 10 лет.

Недостатками данного метода является их высокая стоимость, которая обусловлена использованием специального оборудования и

транспортировкой резервуаров с откачанным загрязнителем. К тому же, с помощью такого метода невозможно ликвидировать загрязнение полностью, поскольку нефть, попавшая в нижние слои почвы, не собирается.

Использование подобных методов оправдано в тех случаях, когда ни одна из доступных альтернатив не может быть применена, например, если загрязнение произошло на территории рядом с водоёмами, где существует запрет на проведение процедур с почвой [24-26].

#### **1.4.2 Химические методы**

Использование химических методов очистки представляет собой извлечение нефтепродуктов из смеси с почвой с помощью специальных химических реагентов - растворителей.

При этом растворитель должен не смешиваться с исходным субстратом и регенерироваться с малыми энергозатратами.

Арены нефти обладают избирательной растворимостью в полярных растворителях, именно этим свойством пользуются при проведении химической ремедиации. Во время процедуры поллютант может подвергаться различным процессам: окисление и восстановление, замещение, осаждение, образование комплексов. Тип процесса будет зависеть от выбранного растворителя.

Анализируя эту информацию, можно прийти к выводу, что применение химических методов является более эффективным, чем использование механических методов, но необходимо понимать, что они тоже обладают рядом недостатков: высокая стоимость реагентов, воздействие реагентов и продуктов реакции на экосистему [24, 27].

#### **1.4.3 Физико-химические методы**

К физико-химическим методам очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений относятся такие методы как сжигание, термическая

десорбция, гелеобразование, диспергирование, сорбция и другие. Зачастую физико-химические методы используются в совокупности с механическими [24].

К сожалению, до сих пор сжигание – самый распространённый метод устранения нефтяных загрязнений, так как он отличается дешевизной, но не является эффективным. При сжигании в окружающую среду поступает большое количество продуктов горения нефти, которые наносят ущерб окружающей среде.

Более затратные физико-химические методы подразумевают под собой обработку грунтов подогретыми водными растворами с использованием химических реагентов. Этот метод очистки является более затратным, так как подразумевает использование специального оборудования и веществ.

Ещё одним распространённым методом очистки грунтов от нефтяных загрязнений является известкование, подразумевающее под собой обработку загрязнённых грунтов негашеной известью. В результате реакции взаимодействия нефтепродуктов и извести образуется твёрдый продукт, удерживающий загрязнители в виде соединений [28].

Применяемые на сегодняшний день физико-химические методы очистки зачастую наносят больший экологический ущерб, чем нефтяное загрязнение. При использовании этих методов может происходить уничтожение плодородного слоя, а при вывозе и складировании загрязнённого слоя грунта может происходить загрязнение новых территорий [29].

#### **1.4.4 Использование сорбентов в ремедиации**

Под сорбентами в ремедиации подразумевают специальные вещества, используемые для ликвидации последствий аварий, при которых происходит разлив нефти и нефтепродуктов и их попадание в окружающую среду [30].

Сорбция представляет собой процесс, во время которого одно вещество, жидкость или твёрдое тело поглощает другое. Вещество, которое осуществляет поглощение называют сорбентом, а поглощаемое вещество называют сорбатом. В зависимости от особенностей процесса сорбции выделяют несколько его типов: адсорбция, хемосорбция, абсорбция и капиллярная конденсация. В тех случаях, когда в процессе поглощения участвует вся масса сорбента, говорят о явлении абсорбции. В случае, если в процессе участвует только поверхностный слой сорбента, то говорят о явлении адсорбции. Если сорбент оказывает химическое действие на поглощаемое вещество – хемосорбция. Если сорбент имеет пористую структуру и в процессе происходит заполнение капилляров этой структуры сорбатом – капиллярная конденсация [30, 31].

Исходя их принципов осуществления процесса, сорбенты делят на две группы: абсорбирующие и связывающие. Связывающие сорбенты при использовании образуют кашицеобразную массу липкую массу, их сложно утилизировать, они являются огнеопасными. Абсорбирующие сорбенты, подобно губке, впитывают и запирают загрязнитель внутри себя, препятствуя его дальнейшему распространению [32].

Условно, сорбенты, используемые при ликвидации нефтяных загрязнений можно разделить на несколько групп:

- Минеральные сорбенты: к сорбентам данной группы относятся материалы на основе диатомита, глины, песка, вермикулита и другие. Это достаточно тяжёлые сорбирующие материалы, они сложны в применении, транспортировке и утилизации. К тому же, они не обеспечивают высокого уровня удержания загрязнителя, из-за чего нефть и продукты её переработки зачастую вытекают обратно. Данная группа сорбентов отличается низкой стоимостью их производства, но применение, транспортировка и утилизация оказывается затратной.

- Биологические сорбенты: представляют собой препараты для поглощения и разрушения углеводов нефти, производятся на основе



ассоциаций микробных масс естественных деструкторов углеводов, выделенных из различных сред. Такие сорбенты обладают высокой стоимостью, узкими пределами характеристик территорий, на которых они могут быть применены, процесс очистки может занимать длительное время, а также он является плохо изученным. Этим обусловлен тот факт, что в настоящее время эти сорбенты имеют низкий процент применения.

- Синтетические и полусинтетические сорбенты: изготавливают на основе полиэтилена, полипропилена, полиуретана и других органических и неорганических соединений. Эти сорбенты обладают низкой массой, но большим объёмом. Обладают высокой сорбционной ёмкостью, но при небольшом давлении возвращают загрязнитель обратно. Являются пожароопасными и тяжело утилизируются [33].

Перспективными видами сорбирующих материалов являются биосорбенты, которые представляют собой полимерную основу, нагруженную биопрепаратом из ассоциации углеводородокисляющих микроорганизмов с дополнительным внесением различных биогенных элементов, дефицит которых зачастую испытывает аборигенная микрофлора, что становится лимитирующим фактором для естественного восстановления экосистемы. При внесении такие сорбенты, во-первых, механически собирают и удерживают загрязнитель, препятствуя его распространению, во-вторых, осуществляется деградация загрязнителя за счёт иммобилизованных на сорбенте микроорганизмов, в-третьих, происходит биостимуляция аборигенной микрофлоры [34].

### **1.5 Ферментативная активность почв**

Почва – это экосистема, обладающая большим разнообразием ферментов. Эти ферменты участвуют в биохимических превращениях поступающих в почву веществ. В среднем ферменты ускоряют скорость протекания реакции в 10-15 раз. Ещё одной важной ролью ферментов в почве

является осуществление функциональной связи между компонентами экосистемы. В связи с этим говорят, что ферментативная активность почвы – показатель, который отражает её функциональное состояние [36].

Ферментативная активность почвы – очень важная характеристика, которая складывается в результате процессов поступления, накопления и работы ферментов в почве. Из-за этого говорят, что определение ферментативной активности почвы – это крайне важное диагностическое мероприятие, позволяющее оценить её функциональное состояние.

Загрязнённые почвы содержат большое количество химических соединений различного состава, которые попадают туда в результате деятельности человека. В первую очередь на попадание поллютанта в почву реагирует микробиота, которая почти сразу изменяет свой состав, численность и биохимические пути превращения веществ. В результате таких превращений изменяется и активность почвенных ферментов.

Почвенные энзимы играют важную роль в процессах восстановления загрязнённых территорий. Благодаря их способности инициировать и ускорять сложные химические реакции происходят процессы разрушения сложных токсических загрязнителей почвы до более простых и менее токсичных, доступных для почвенной микробиоты соединений [37].

Многие исследователи считают, что показатели активности почвенных ферментов могут быть использованы в качестве биоиндикаторов, с помощью которых становится возможным определение начала и уровня загрязнения, характера и скорости восстановления почв, а также оценка проводимых мероприятий по их восстановлению.

Таким образом, ферментативная активность почвы – это комплексная величина, отражающая функциональное состояние почвы, состояние и функционирование её биоты, способность использовать и преобразовывать определённые субстраты, что обуславливает способность к восстановлению. Определение и использование этого показателя имеет ряд преимуществ: показатель энзимной активности относительно стабилен, методы

определения ферментативной активности не являются сложными и имеют низкий уровень ошибки, показатели очень чувствительны даже к низкому уровню загрязнения [38].

### **1.5.1 Почвенная уреазы**

Почвенная уреазы – это фермент преимущественно микробного происхождения. Благодаря ему почвы и другие экосистемы не накапливают в огромных количествах продукты азотистого обмена.

Суть реакции заключается в превращении твёрдой мочевины в летучие продукты её гидролиза (аммиак и углекислый газ). Таким способом осуществляется минерализация органических остатков в почве и регулируется её азотный обмен [39].

Попадание нефтепродуктов в почву приводит к нарушению протекания естественных процессов обмена веществ, в том числе и азота. Считается, что активность почвенной уреазы находится в зависимости от уровня загрязнения. Так, низкие дозы нефтепродуктов, попавшие в почву, оказывают стимулирующий эффект на уреазную активность. При этом в некоторых источниках имеются данные о том, что средние и высокие концентрации нефти ингибируют её.

Наиболее вероятно, что активность этого фермента в почве зависит сразу от многих факторов. К ним можно отнести концентрацию нефти, тип нефти, тип почвы, климатические условия и другие минеральные компоненты [40].

Достоверно известно, что парафиновые углеводороды оказывают стимулирующий эффект на активность уреазы в почве, а такие компоненты нефти, как толуол и фенол, наоборот, ингибируют её.

Уреазы – чувствительный к проводимым ремедиационным мероприятиям (например, внесению сорбентов) фермент. Но более

интересным является тот факт, что другие экологические факторы наименее сказываются на её активности [41].

Таким образом, можно считать, что показатель активность почвенной инвертазы является достоверным признаком, по которому можно оценить состояние почвы, интенсивность протекания ремедиационных процессов и процессов минерализации азотистых соединений в ней.

### **1.5.2 Почвенная инвертаза**

Инвертаза – это фермент из класса гидролаз. Под действием инвертазы в почве происходит распад сахарозы до глюкозы и фруктозы. Помимо этого инвертаза может воздействовать и на другие углеводы, в результате распада которых образуется фруктоза. Образующаяся в результате работы этого фермента фруктоза является неотъемлемым компонентом почвы, поскольку является субстратом для жизнедеятельности микроорганизмов, а также участвует в ускорении фруктозотрансферных реакций.

Согласно литературным источникам [42], фруктоза является показателем, который напрямую отражает биологическую активность почвы и её плодородие. Активность инвертазы является чувствительной ко многим экологическим факторам, поэтому может использоваться для оценки их воздействия.

Известно, что количество инвертазы в почве напрямую зависит от общей численности микроорганизмов. Используя эту информацию, можно сделать вывод о том, что большая часть инвертазы в почве имеет микробное происхождение. Отсюда следует, что использование активности инвертазы в качестве диагностического показателя может отражать состояние почвенного микробиома и интенсивность протекающих процессов обмена веществ в ней [43, 44].

Попадание нефтепродуктов в почву в высоких концентрациях вызывает снижение активности инвертазы. Это связано с тем, что нефть

ингибирует жизнедеятельность целлюлозоразрушающих микроорганизмов. При снижении их численности и активности наблюдается уменьшение концентрации дисахаридов в почве, что влияет на активность этого фермента. Низкие и средние дозы могут стимулировать активность энзима [45].

### **1.5.3 Пероксидаза, полифенолоксидаза и коэффициент гумификации почв**

Пероксидаза – это фермент, благодаря которому осуществляется окисление органических субстратов почв с использованием кислорода воздуха и пероксида водорода. В почвах этот фермент оказывает влияние на гумусовые вещества, осуществляя процессы их окисления.

Полифенолоксидаза – фермент, участвующий в цепочке биохимических превращений ароматического ряда органических соединений до компонентов гумуса.

Активность этих ферментов является важным диагностическим показателем при исследовании почвы, поскольку они напрямую отражают происходящие в ней процессы синтеза и распада гумусовых веществ [46, 47].

В отличие от гидролаз (уреаза и инвертаза), эти ферменты менее стабильны в окружающей среде. Показатели их активности зависят от экологических факторов, влияющих на экосистему.

Гумификация представляет собой процесс превращения органических веществ почвы в гуминовые вещества (гуминовые кислоты, гумин, фульвовые кислоты). Во время данного процесса в равной степени происходят как реакции ассимиляции, так и диссимиляции. Их балансом и определяется важная характеристика пригодности почвы для использования в сельскохозяйственных нуждах, как коэффициент гумификации [48].

Коэффициент гумификации представляет собой количественную характеристику происходящих в почве процессов превращения

органического вещества в гумус. На его величину влияет множество факторов: количество и качество поступающего в почву органического вещества, гидротермические характеристики почвы, её биологическая активность, физико-химические характеристики, а также состав и качество минерального компонента [49].

Таким образом, можно говорить о том, что активность пероксидазы, полифенолоксидазы, а также коэффициент гумификации могут быть использованы в качестве диагностических показателей, отражающих функциональное состояние почвы.

## 2 Объекты и методы исследования

### 2.1 Описание исследуемых сорбентов

В работе использовались два типа полимерных сорбентов: «Унисорб» и «Унисорб-Био» (рисунок 1).



а



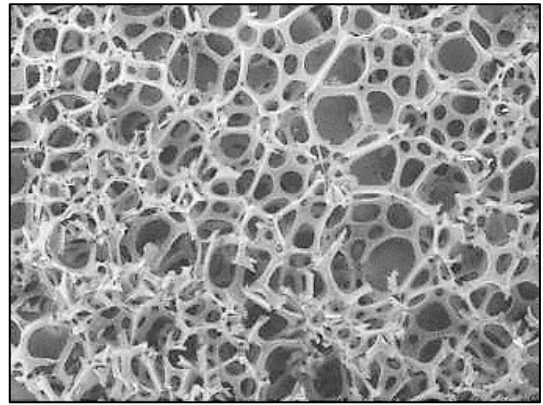
б

Рисунок 1 – Фотографии полимерных сорбентов в упаковках с сайта производителя [35]: а – Унисорб, б – Унисорб-Био

«Унисорб» – это универсальный сорбент, который производится на основе вспененного карбамида (мочевины). По заявлению производителя этот сорбент может быть использован для сбора нефти и нефтепродуктов как на твёрдых, так и на водных поверхностях. Согласно имеющейся в открытом доступе информации, данный сорбент имеет развитую пористую структуру (рисунок 2), благодаря чему способен в короткие сроки впитывать большое количество загрязнителя, также это обеспечивает ему высокую сорбирующую способность (30 – 67 кг / 1 кг). Также положительным качеством сорбента является то, что сам материал способен к биоразложению в почве. Он не токсичен, не патогенен, не вызывает нарушения экологического равновесия в экосистемах, не оказывает отрицательного воздействия на биотопы различного трофического уровня.



а



б

Рисунок 2 – Фотографии сорбента «Унисорб» с сайта производителя [35]: а – гранулы, б – пористая структура при увеличении 80х

«Унисорб-Био» – модифицированная версия «Унисорба». Основу сорбента также составляет вспененный карбамид (мочевина), но вдобавок сорбент содержит в своём составе биопрепарат на основе ассоциации нефтеокисляющих микроорганизмов. Сорбент имеет пористую, хлопьеобразную структуру, разрыхляет почву, насыщает её азотом и фосфором, стимулирует аборигенную микрофлору. Микроорганизмы в составе сорбента стимулируют процесс разложения нефтепродуктов. Использование этого сорбента оправдано в тех случаях, когда единственным возможным способом ликвидации загрязнения является биodeградация загрязнений.

## 2.2 Объект исследования и характеристика района исследования

В качестве объекта исследования в данной работе были приняты показатели общей численности бактерий и микромицетов, выделенных из образцов почвы с экспериментальной площадки, расположенной в черте города Красноярск, микрорайон «Ветлужанка», биохимические показатели образцов почвы (уреаза, инвертаза, пероксидаза и полифенолоксидаза, биохимические особенности метаболизма доминирующих штаммов бактерий в образцах).



Экспериментальная площадка представляла собой территорию, разбитую на четыре экспериментальных ячейки размером 600 x 600 x 200 миллиметров, расположенных на горизонтальной поверхности. Во избежание перекрёстной контаминации и взаимного влияния вносимого поллютанта между ячейками было принято расстояние 250 мм в рядах, а между рядами принято расстояние в 700 мм. Каждая экспериментальная ячейка содержала почву массой 49 кг.

Экспериментальные участки были пронумерованы согласно схеме заложения натурального эксперимента от 1 до 4 (рисунок 3). Ячейки 1 и 2 содержали чистую почву (являлись свободными от нефти), они являлись контролем, а в ячейки под номерами 3 и 4 была внесена нефть в концентрации 16% по отношению к массе (рисунок 4).

В ячейки под номерами 1 и 3 вносили полимерный сорбент «Унисорб-Био», в ячейки 2 и 4 вносили сорбент «Унисорб». Сорбент был расфасован в сетчатые мешочки из полиэфирного волокна, масса сорбента в каждом мешочке составляла 3 г, количество мешочков в одной ячейке - 10.

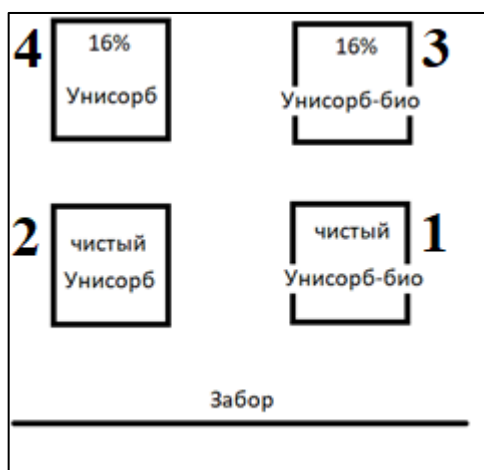


Рисунок 3 – Схема закладки натурального эксперимента



а



б



в

Рисунок 4 - Фотографии мелкоделяночной экспериментальной площадки: а – ячейка без почвы, б – внесение нефти в почву, в – ячейка в начале вегетационного периода 2022 года

Создание экспериментальной площадки производилось 12 июня 2020 года. Отбор образцов почвы производился в соответствии с планом (таблица 1). Всего было исследовано 32 образца почвы, отобранных во время 8 плановых заборов образцов.

Таблица 1 – График отбора образцов почвы с экспериментальных участков

№	Дата отбора образца
1	26.08.2020
2	15.10.2020
3	14.05.2021
4	23.06.2021
5	19.08.2021
6	19.10.2021
7	24.04.2022
8	26.05.2022

### 2.3 Метод отбора проб

Отбор образцов почвы производился в соответствии с существующими нормами [50]. Для этого использовались одноразовые чистые, плотные, герметичные пакеты из полиэтилена с застёжкой и стерильные шпатели (для каждого образца отдельный шпатель), необходимые для исключения

вторичной контаминации образцов. Для того, чтобы нефтезагрязнённые и свободные от нефти пробы были показательны в сравнительном анализе, они отбирались в идентичных естественных условиях.

Во время отбора проб из каждой ячейки методом конверта (отбор образцов из пяти разных точек) был получен смешанный образец с каждого экспериментального участка. Глубина погружения шпателя во время отбора не превышала значения 5 см (верхний слой почвы). Образцы во время отбора сразу нумеровались в соответствии с существующим планом экспериментального участка, ставилась отметка о дате сбора образца и фамилии исследователя, который производил отбор пробы. В течение 3-х часов после отбора пробы транспортировались в лабораторию. Хранение образцов производилось при температуре +4 °С не более двух суток.

#### **2.4 Метод определения общей численности микроорганизмов**

Определение общей численности микроорганизмов проводили путём высева разведений почвенных образцов на плотные питательные среды [51]. Для получения необходимых разведений каждого образца использовали 1 грамм почвы и в асептических условиях вносили его в колбу, простерилизованную в автоклаве, содержащую 100 мл водопроводной воды. Таким образом было получено разведение  $10^{-2}$ . Это разведение было использовано для определения общей численности микромицетов. Путём последовательного переноса 1 мл полученной в колбе суспензии в пробирки, содержащие 9 мл стерильной воды, было получено разведение почвенного образца равное  $10^{-6}$ , которое было использовано для посева на общую численность бактерий.

Для определения общей численности микромицетов использовали среду Чапека (Czapek Malt Agar, HiMedia). В среду вносили бензилпенициллин в концентрации 100 мкг на 1 л для ингибирования

бактериального роста. Инкубация чашек производилась при температуре 25 °С. Подсчёт колоний производили на 7-10 сутки культивирования.

Для определения общей численности бактерий использовали мясопептонный агар (Nutrient agar, HiMedia). Инкубация проводилась при температуре 30 °С. Подсчёт колоний на 5-7 сутки.

Численность микроорганизмов рассчитывали по формуле (1):

$$N = \frac{\bar{X} \times 10^n}{m \times V} \quad (1)$$

где  $\bar{X}$  – среднее количество колоний на чашке при высеве из соответствующего разведения;

$10^n$  – степень разведения почвенного образца;

$m$  – масса почвенного образца, взятого для приготовления суспензии (г);

$V$  – объем суспензии, внесенной в чашку Петри (мл).

## 2.5 Методы определения ферментативной активности почвы

Для определения ферментативной активности почвы использовали общепринятые методы почвенной энзимологии [52].

Уровень уреазной активности измеряли методом Т. А. Щербаковой, основанном на измерении продукта гидролиза мочевины – аммиака, который, вступая во взаимодействие с реактивом Несслера, образует окрашенные комплексы.

Для определения активности инвертазы использовали метод Гоффмана и Паллауфа. Данный метод основан на измерении уровня редуцирующих гексоз, которые образуются в результате гидролиза сахарозы.

Определения активности пероксидазы и полифенолоксидазы проводили методом Л. А. Карягиной и Н. А. Михайловской. Метод определения пероксидазной активности основан на учёте количества продуктов окисления полифенолов. Определение уровня

полифенолоксидазной активности проводилось также, но без использования пероксида водорода.

### **2.5.1 Определение активности инвертазы**

Для проведения исследования образцы почвы высушивали, отбирали 5 г и помещали в коническую колбу. В колбу вносили ацетатный буфер объёмом 5 мл и 5 мл сахарозы концентрацией равной 20 %. Колбу помещали в термостат с температурным режимом 37 °С и оставляли на 3 часа. После инкубации в термостате добавляли в колбу 40 мл воды при температуре 40 °С и фильтровали раствор.

10 мл фильтрата переносили в другую мерную колбу на 50 мл. В эту же колбу вносили медный реактив объёмом 4 мл. Для получения медного реактива смешивали в соотношении 1:25 раствор с 25 гр сегнетовой соли, 200 гр  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 20 гр  $\text{NaHCO}_3$  (раствор доводили водой до объёма 1 л) с раствором, полученным в результате растворения 50 гр  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в 500 мл воды.

Содержимое мерной колбы устанавливали на водяную баню и кипятили в течение 25 минут. После этого колбу охлаждали водопроводной водой и вносили в неё 2 мл 0,2М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и 5 мл молибденового раствора (5% раствор молибдата аммония, смешанный в пропорции 1:1 с 200 мл  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , растворённого в 800 мл воды). Колбу взбалтывали и оставляли на 1 час.

Спустя час, доводили содержимое колбы водой до объёма 50 мл. Полученный раствор колориметрировали в 1 сантиметровой кювете при длине волны 620 нанометров.

### **2.5.2 Определение активности уреазы**

Для исследования использовалось 5 г высушенного до сухого веса почвы. Образец переносили в колбу, вносили в неё 2-х % раствор мочевины в

фосфатном буфере объёмом 20 мл и толуол объёмом 200 мкл. Колбу закрывали крышкой и убирали в термостат, где выдерживали в течение 4-х часов при температуре 37 °С. По истечении времени экспозиции, вносили в колбу 1 мл 50% раствора трихлоруксусной кислоты. С целью вытеснения из образцов поглощённого аммиака добавляли по 50 мл раствора хлористого калия. Содержимое колбы перемешивали и фильтровали. От полученного фильтрата использовали 2 мл, разведённые водой до 30 мл. К ним приливали 2 мл реактива Несслера и 50% раствор сегнетовой соли объёмом 2 мл. Полученную смесь доводили водой до объёма в 50 мл, перемешивали и использовали для колориметрии при длине волны 400 нм.

Для расчёта концентрации аммиака использовалась стандартная кривая по серии разведений стандартного раствора ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  в концентрации 0,005 мг N- $\text{NH}_4$  в 1 мл).

### **2.5.3 Определение активности пероксидазы, полифенолоксидазы и расчёт коэффициента гумификации почвы**

Для исследования использовалась высушенная до сухого веса почва. Для определения активности пероксидазы в колбу вносили 1 грамм почвенного образца, вливали 10 миллилитров раствора гидрохинона 1% и 1 миллилитр раствора пероксида водорода 0,05%. Содержимое колбы перемешивали и помещали в термостат с температурным режимом в 30 °С. Время экспозиции 30 минут. Для контроля использовался аналогичный раствор без внесения образца. После экспозиции в колбы (контроль и опыт) приливали по 10 мл спирта. Полученную опытную вытяжку колориметрировали напротив контрольной в кюветах 1 сантиметр при длине волны равной 400 нм.

Определение активности полифенолоксидазы проводилось аналогичным образом, но без внесения пероксида водорода.

В контрольном образце гидрохинон окислялся естественным путём (с использованием кислорода воздуха), в опытном образце это происходило при участии пероксида водорода. Продукт окисления гидрохинона – бензохинон. На основании этого результат выражали в миллиграммах бензохинона на 1 г\ почвы.

Поскольку хиноны являются важными участниками процессов гумусообразования в почве, так как при конденсации хинонов с пептидами и аминокислотами происходит образование гумусовой кислоты, на основании активности пероксидазы и полифенолоксидазы можно судить о происходящих в почве процессах синтеза и распада гумусового вещества.

Коэффициент гумификации был рассчитан как соотношение активности пероксидазы к полифенолоксидазе.

## **2.6 Метод выделения чистых культур доминирующих микроорганизмов**

Во время проведения посевов на общую численность бактерий по визуальной оценке было замечено, что в каждом образце присутствуют доминирующие из культивируемых штаммов. Для получения чистых культур этих микроорганизмов путём механического разобщения производился пересев изолированных колоний на чашки Петри с мясопептонным агаром (Nutrient agar, HiMedia). Инкубация проводилась при температуре 30 °С. По завершении периода инкубации, полученные колонии пересеивали петлёй в пробирки с аналогичным скошенным агаром. Пробирки убирали в термостат с выставленным режимом в 30 °С. Период инкубации 2 суток.

## **2.7 Методы определения тинкториальных и биохимических особенностей выделенных штаммов**

Для определения грам-принадлежности использовался метод окраски по Граму. Для исследования подвижности и сахаралитических особенностей

выделенных штаммов использовались дифференциально-диагностические среды Гисса с различными углеводами: цитрат натрия, ацетат натрия, фенилаланин, лактоза, сорбит, лизин, глюкоза (рисунок 5).



а



б



в



г

Рисунок 5 – Внешний вид пробирок спустя двое суток культивирования выделенных штаммов на дифференциально-диагностических средах: а – образец 1, б – образец 2, в – образец 3, г – образец 4

Культуру засеивали уколом петли в столбик среды и инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение суток. Оценку результатов проводили визуальным путём по изменению цвета индикатора или структуры среды.

Если культура не способна ферментировать углевод, то цвет индикатора не меняется. При выделении газа также наблюдается изменение цвета индикатора или разрыв агара. Подвижность была оценена по характеру роста. Рост по направлению укола указывает на неподвижные культуры, диффузный рост говорит о подвижности.



## **2.8 Метод идентификации видовой принадлежности микроорганизмов**

Для определения видовой принадлежности доминирующих штаммов бактерий, выделенных из образцов исследуемой почвы, использовался метод времяпролётной масс-спектрометрии «MALDI-TOF» с использованием масс-спектрометра «Microflex» (BrukerDaltonics, Германия).

С суточных образцов чистых культур на скошенном агаре одноразовой петлёй отбирались образцы и наносились непосредственно в лунки стального планшета для масс-спектрометрии (MALDI-TOF, МТР 384 massive, BrukerDaltonics, Германия). После чего каждый образец покрывался двумя микролитрами насыщенного раствора матрицы –  $\alpha$ -CHCA (BrukerDaltonics, Германия) в растворе с ацетонитрилом и трифторуксусной кислотой с концентрацией 50% и 2,5% соответственно. Затем планшет высушивался на воздухе в течение 5 минут до образования кристаллов.

В качестве калибратора и контрольного образца использовался экстракт штамма *Escherichia coli* DH5a, поскольку для него известны точные значения масс белков.

Для получения каждого масс-спектра использовалось 50 импульсов лазера с минимальной пороговой мощностью излучения, необходимого для десорбции-ионизации образца. Диапазон отношения массы к заряду был установлен на уровне от 2000 до 20000.

Для записи, обработки и анализа полученных в ходе исследования масс-спектров использовалось программное обеспечение «BrukerDaltonics» (Германия): flexControl 2.4 (Build 38). Идентификация бактерий проводилась автоматически.

При интерпретации полученных масс-спектров исходили из предположения, что большая часть зарегистрированных пиков соответствует белковым молекулам, а определяемые массы – массам целых белков.

Исследования были проведены на базе бактериологического отделения клинико-диагностической лаборатории КГБУЗ «Красноярский краевой клинический центр охраны материнства и детства».

### **3 Результаты исследования**

Изъяты страницы 35-52 в связи с авторским правом

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В течение двух лет экспозиции сорбентов «Унисорб» и «Унисорб-Био» в почве динамика численности микроорганизмов на чистых и нефтезагрязнённых участках соответствовала сезонным колебаниям. Внесение нефти в концентрации 16 вес.% оказывало стимулирующее влияние на развитие бактерий и микромицетов в почве в первый год экспозиции, тогда как к концу второго года численность бактерий в чистой и загрязнённой почве достоверно не различалась.
2. При внесении сорбента «Унисорб-Био» численность бактерий в чистой и загрязнённой почве сравнивалась в конце первого года экспозиции, что указывает на более быструю трансформацию нефти за счёт содержащихся в составе сорбента углеводородокисляющих бактерий.
3. Исследование активности гидролитических ферментов показало, что в начале экспозиции (август 2020 г.) в чистой почве в присутствии сорбентов уреазная и инвертазная активность была высокой, тогда как на загрязнённых участках наблюдали ингибирующее действие нефти на активность почвенных энзимов. На последующих этапах уреазная и инвертазная активность нефтезагрязнённых почв была выше или не отличалась от показателей активности в чистой почве, что свидетельствует о протекании процессов ремедиации.
4. Изучение активности окислительных ферментов показало, что загрязнение почвы нефтью (16 вес.%) замедляло процессы, катализируемые пероксидазой и полифенолоксидазой. Внесение сорбентов не оказало ингибирующего влияния на активность данных ферментов в чистых почвах, но стимулировало восстановление естественной динамики в нефтезагрязнённых.
5. Среди выделенных штаммов бактерий в чистых почвах с разными сорбентами доминировал вид *Bacillus pumilus*, относящийся к

типичным почвенным бактериям. В нефтезагрязнённой почве с сорбентом «Унисорб» доминировали бактерии *Bacillus endophyticus*. В образцах нефтезагрязнённой почвы с сорбентом «Унисорб-Био» доминировал вид *Aromatoleum terpenicum* (*Azoarcus sp.*).

6. Внесённые в почву сорбенты «Унисорб» и «Унисорб-Био» оказывают стимулирующее воздействие на развитие микробиоценоза и ферментативную активность почвы и могут быть рекомендованы для проведения ремедиационных мероприятий на территориях со слабым и средним уровнем нефтяного загрязнения.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Кузнецов А. Е. Научные основы экобиотехнологии: учебное пособие для студентов / А. Е. Кузнецов, Н. Б. Градова – М.: Мир, 2006. – 8-10 с.
2. Середина В.П., Андреева Т.А., Алексеева Т.П., Бурмистрова Т.И., Терещенко Н.Н. Нефтезагрязненные почвы: свойства и рекультивация. Томск: Изд-во ТПУ, 2006, 270 с
3. Ларионов В.И. В кн.: Вопросы безопасности объектов нефтегазового комплекса. Сб. науч. тр. М: ЦИЭКС, 2004.
4. Ступин Д.Ю. Загрязнение почв и новейшие технологии их восстановления. СПб.: Изд-во Лань, 2009, 432 с.
5. Лим, Л. А. Нефтеемкость сорбента: проблема выбора методики определения / Л. А. Лим, В. А. Реутов, А. А. Руденко, А. С. Чудковский // Успехи современного естествознания. – 2018. – № 10. – С. 144-150.
6. Государственный доклад «О состоянии и об охране окружающей среды Российской Федерации в 2020 году». М. : Минприроды России; НПП «Кадастр», 2021. – 866 с. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://goo-gl.me/cAAUF> (Дата обращения: 07.02.2022).
7. Государственный доклад «О состоянии и об охране окружающей среды Российской Федерации в 2018 году». М. : Минприроды России; НПП «Кадастр», 2019. – 844 с. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.mnr.gov.ru/upload/iblock/821/ГД-2018.pdf> (Дата обращения: 07.02.2022).
8. Государственный доклад «О состоянии и об охране окружающей среды Российской Федерации в 2019 году». М. : Минприроды России; НПП «Кадастр», 2021. – 1000 с. [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://2019.ecology-gosdoklad.ru/filer\\_public/e8/76/e87607a0-9ee3-477d-9446-904c9d8c4504/doklad.pdf](https://2019.ecology-gosdoklad.ru/filer_public/e8/76/e87607a0-9ee3-477d-9446-904c9d8c4504/doklad.pdf) (Дата обращения: 07.02.2022).
9. Паламарчук, А. В. Прокурорский надзор за исполнением законов о промышленной безопасности / А. В. Паламарчук, Н. Д. Бут ; под общ.

- ред. А. В. Паламарчука. – М. : Генеральная прокуратура РФ, Акад. Генеральной прокуратуры РФ, 2015. – 540 с.
10. Шульгина, Т. В. Причины разлива нефти / Т. В. Шульгина // Проблемы науки. – 2018. – № 5. – С. 34-37.
  11. Васильева, Г. К. Нефть и нефтепродукты как загрязнители почв. Технология комбинированной физико-биологической очистки загрязненных почв / Г. К. Васильева, Е. Р. Стрижакова, Е. А. Бочарникова, Н. Н. Семенюк, В. С. Яценко, А. В. Слюсаревский, Е. А. Барышникова // Российский химический журнал. – 2013. – Т. 57, № 1. – С. 79-104.
  12. Лапин, А. П. Восстановление загрязненной почвы нефтью и нефтепродуктами / А. П. Лапин, А. Н. Новиков, А. А. Глухов, Р. Р. Садыков // Мир транспорта и технологических машин. – 2009. – Т. 557, № 2. – С. 105-113.
  13. Шорина, Т. С. Влияние нефти на физические свойства чернозема обыкновенного степной зоны Урала / Т. С. Шорина, А. М. Русанов, А. М. Сулейманова // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2010. – № 6 (112). – С. 137-139.
  14. Напрасникова, Е.В. Функциональный аспект антропогенных ландшафтов / Е.В. Напрасникова, С.С. Дубынина // Институт географии им. В.Б. Сочавы Со РАН, г. Иркутск, 2006 - № 3. — С. 162-166;
  15. Нефтезагрязнения и основные технологические способы урегулирования последствий [Электронный ресурс] / Наука и технологии – Режим доступа: <http://neftegaz.ru/science/view/764> (Дата обращения 20.02.2022).
  16. Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. Ред. Глазовская М.А., М.: Наука, 1988, 254 с.
  17. Atlas R.M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective / R.M. Atlas // Microb. Rev., 1981. 45, P.180-209.

18. Rosenberg E. The hydrocarbon-oxidizing bacteria / Rosenberg E., Balows A., Trueper H.P., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.H. // *The Prokaryotes*. Springer - Verlag, New York, P. 446-459.
19. Кабиров Т.Р. Использование многоуровневой системы индикации биологической активности почв для оценки эффективности методов биорекультивации нефтезагрязненных территорий: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.00.16, 03.00.23 / Кабиров Тагир Рустэмович. – Уфа, 2009. – 16 с.
20. Вельков В.В. Биоремедиация; принципы, проблемы, подходы / В.В. Вельков // *Биотехнология*.- 1995.- № 3–4.- 20-27 с.
21. Brown, J.L. Restoration of petroleum contaminated sites using phased bioremediation / J.L. Brown, R.J. Nadeau // *Bioremediation Journal* – 2002 – V. 6 – P. 315–319.
22. Куликова, И. Ю. Микробиологические способы ликвидации последствий аварийных разливов нефти в море / И. Ю. Куликова, И. С. Держинская // *Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе*. — 2008 — Вып. 5 — С. 24–29.
23. Привалова Н.М., Двадненко М.В., Хруцкий К.Ю., Лявина Е.В. Биологическая очистка промышленных нефтезагрязненных сточных вод // *Успехи современного естествознания*. – 2009. – №5. – С.81–82.
24. Очистка почв от нефтяного загрязнения и оценка ее эффективности / А. Н. Сухоносова, В. А. Бурлака, Д. Е. Быков [и др.] // *Экология и промышленность России*. – 2009. – № 10. – С. 18–20.
25. Слюсаревский, А. В. Сравнительный эколого-экономический анализ методов рекультивации нефтезагрязненных почв путем биорекультивации *in situ* и механической замены грунта / А. В. Слюсаревский, Л. В. Зиннатшина, Г. К. Васильева // *Экология и промышленность России*. – 2018. – Т. 22, № 11. – С. 40-45.



26. Khan, F. I. An overview and analysis of site remediation technologies / F. I. Khan, T. Husain, R. Hejazi // *Journal of environmental management.* – 2004. – Vol. 71, № 2. – P. 95-122.
27. Патент № 2426833 Российской Федерации, МПК E02B15/10 (2006.01), C02F1/28 (2006.01), C10G25/00 (2006.01). Установка и способ очистки от нефти, нефтепродуктов и нефтяного шлама / Телесов А.А., Телесов А.Н.
28. Van Hamme, J. D. Recent advances in petroleum microbiology / J. D. Van Hamme, A. Singh, O. P. Ward // *Microbiology and molecular biology reviews.* – 2003. – Vol. 67, № 4. – P. 503-549.
29. Мелкозеров В. М. Очистка нефтезагрязненных земель и водоемов Сибири с применением адсорбентов / В. М. Мелкозеров, С. И. Васильев, А. Я. Вельц, Л. Н. Горбунова, Ю. Л. Гуревич, В. П. Ладыгина, И. В. Трусей // *Нефтепромысловое дело.* – 2010. – № 11. – С. 58-62.
30. Луценко, А. Н. О применении инновационных сорбентов и устройств для ликвидации разливов нефти и нефтепродуктов / А. Н. Луценко // *Технологии техносферной безопасности.* – 2012. – № 3.
31. Булатов А.И. Охрана окружающей среды в нефтегазовой промышленности / А.И. Булатов, П.П. Макаренко, В.Ю. Шеметов // М.: Недра, 199, 483 с.
32. Базенкова Е.И. Способ рекультивации нефтезагрязненных почв / Е.И. Базенкова, Н.М. Колесникова, И.Г. Калачникова // *Инф. листок Свердлов. ЦНТИ.* № 362-95. Серия Р.68.29.15. 1996.
33. Mnif, S., Chamkha, M., Labat, M., Sayadi, S., 2011 Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria. *J.Appl. Microbiol.* 111, 434–436.
34. Каменщиков Ф.А., Богомольный Е.И. Удаление нефтепродуктов с водной поверхности и грунта. М. – Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2006 528 с.

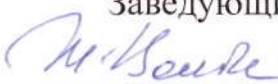
35. ООО НПФ «Экосорб» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.unisorb.ru/> (дата обращения: 10.02.2022).
36. Killham K., Staddon W.J. Bioindicators and sensors of soil health and the application of geostatistics // *Enzymes in the Environment*. N.Y.: Marcel Dekker Inc., 2002. P. 391–405.
37. Polyak Y.M., Bakina L.G., Chugunova M.V., Mayachki-na N.V., Gerasimov A.O., Bure V.M. Effect of remediation strategies on biological activity of oil-contaminated soil – A field study // *Int. Biodeter. Biodegrad.* 2018.V. 126. P. 57–68.
38. Steinweg J.M., Dukes J.S., Paul E.A., Wallenstein M.D. Microbial responses to multi-factor climate change: effects on soil enzymes // *Front. Microbiol.* 2013. V. 4.P. 1–11.
39. Купревич В.Ф., Щербакова Т.А. Почвенная энзимология. Минск: Наука и техника, 1966, 275 с.
40. Медведева Е.И. Биологическая активность нефтезагрязнённых почв в условиях Среднего Поволжья: Автореф. дис. канд. биол. наук. Тольятти. 2002, 18 с.
41. Albrecht A., Angers D.A., Beare M., Blanchart E., Soil aggregation, soil organic matter and soil biota interactions : implications for soil fertility recapitalization in the tropics. 16th World Congress of Soil Science. 20 August 1998, Scientific registration n: 212, Symposium n: 12.
42. Belousov A.A., Belousova E.N. Vliyanie strukturnogo sostava pochvy i agrohimikatov na sodержanie ugleroda mikrobnой bio-massy // *Vestn. Buryat. gos. s.-h. akad. im. V.R. Filippova.* - 2013. - № 2. - S. 25-31.
43. Anderson T.-H. The metabolic quotient for CO<sub>2</sub> (q CO<sub>2</sub>) as a specific activity parameter to assess the effect of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils / T.-H. Anderson K.H. Domsch // *Soil Biol. Biochem.* 1993. V.25, №3. P.393-395.
44. Прудникова М.А. Использование биологических показателей в мониторинге и постагрогенных черноземов / М.А. Прудникова, Е.В.

- Даденко, О.Ю. Ермолаева и др. // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2013. Т. 15. № 3 (5). С. 1406-1409.
45. Margesin, R.G. The impact of hydrocarbon remediation on enzyme activity and microbial properties of soil / R.G. Margesin, A. Walder, F. Schinner // Acta Biotechnol. 2000. V. 20. P. 313-333.
46. Stockdale E. A., Watson C. A. Biological indicators of soil quality in organic farming systems // Renewable Agriculture and Food Systems. 2009. Volume 24. P. 308-318.
47. Influence of crop rotation, intermediate crops, and organic fertilizers on the soil enzymatic activity and humus content in organic farming systems/A. Marcinkeviciene, V. Boguzas, S. Balnyte and et al.// Eurasian Soil Sci. 2013. Volume 46. P. 198-203.
48. Заушинцена А. В., Романов В. Н., Кожевников Н. В. Влияние ресурсосберегающих способов основной обработки чернозема обыкновенного на показатели общей биологической активности и урожайность зерновых культур// Самарский научный вестник. 2018. Т. 7. № 3 (24). С. 41-48.
49. Romanova S.M., Ponomarenko O.I., Matveyeva I.V., Beisembayeva L.K., Ka-zangarova N.B., Tukenova Z.A.. Evaluation of mulching technology application for cultivation of agricultural crops// Journal of Chemical Technology and Metallurgy. - 2019. - № 3. - P. 3.
50. ГОСТ 17.4.3.01-83 Охрана природы (ССОП). Почвы. Общие требования к отбору проб.
51. Нетрусов А. И. Практикум по микробиологии/А.И. Нетрусов, М.А. Егорова и др.; под ред. А.И. Нетрусова. М.: Академия, 2005 608 с.
52. Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии / Ф.Х. Хазиев; Институт биологии Уфим. НЦ.-М.:Наука, 2005 – 252 с.;
53. Zang H., Xie S., Wu H. A novel thermostable GH5\_7  $\beta$ -mannanase from *Bacillus pumilus* GBSW19 and its application in manno-oligosaccharides (MOS) production. Enzyme Microb. Technol. 2015. Vol. 78. P. 1–9.

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т.Г. Волова




«24» июня 2022 г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Влияние сорбентов серии «Унисорб» на структуру микробиоценоза и  
ферментативную активность почвы

06.04.01 Биология

06.04.01.01 микробиология и биотехнология

Научный руководитель		проф., д-р биол. наук	С. В. Прудникова
Выпускник			К. А. Туркин
Рецензент		канд. биол. наук	Г. И. Антонов

Красноярск 2022