

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

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
\_\_\_\_\_ Т. Г. Волова  
«\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г.

## МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Влияние нефтепродуктов на микробиологическую активность почв севера  
Красноярского края

06.04.01 Биология

06.04.01.01. Микробиология и биотехнология

Руководитель	_____	профессор, д.б.н	И. Д. Гродницкая
Выпускник	_____		Е. В. Сиделева
Рецензент	_____	доцент, к.б.н	С. Ю. Евграфова

Красноярск 2023

## РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Влияние нефтепродуктов на микробиологическую активность почв севера Красноярского края» содержит 71 страницу, включает в себя 23 иллюстрации, 5 таблиц, 2 формулы, а также список использованной литературы из 72 источников.

Ключевые слова: БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЧВ, НЕФТЕПРОДУКТЫ, ДИЗЕЛЬНОЕ ТОПЛИВО, ЛИСТВЕННИЦА СИБИРСКАЯ, ДИЗЕЛЕОКИСЛЯЮЩИЕ БАКТЕРИИ.

Несмотря на многочисленные утечки нефтепродуктов на местах нефтедобычи в северных районах, почвы которых характеризуются низкими скоростями микробиологической деструкции, недостаточно изучено воздействие нефтепродуктов на почвы. Необходимо изучать формирование почвенного микробиома в условиях нефтезагрязнения, особенно для поиска возможных эффективных средств биоремедиации.

Цель: оценить влияние разных концентраций дизельного топлива (ДТ) на микробиологическую активность и способность к возобновлению лиственницы сибирской (*Larix sibirica*) в почвах северного типа.

В задачи исследования входило: исследовать биологическую активность (ОЧМ, состав ЭТГМ, МБ и БД, ферментативную активность) 4 почв северного типа до и после внесения разных концентраций ДТ, выделить аборигенные дизелеоокисляющие микроорганизмы, а также оценить влияние разных концентраций ДТ на грунтовую всхожесть семян и сохранность сеянцев *Larix sibirica* в почвах модельного эксперимента.

Биологическая активность северных почв зависела от их типа и концентрации внесения ДТ. В целом наблюдается снижение биологической активности северных почв при внесении ДТ. Отрицательный эффект ДТ наблюдался также и на всхожести семян лиственницы сибирской.

Выделены аборигенные дизелеоокисляющие бактериальные штаммы, которые могут быть перспективны для проведения биоремедиационных мероприятий нефтезагрязненных почв северных районов.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
1 Обзор литературы.....	8
1.1 Влияние нефтепродуктов на свойства почвы.....	8
1.2 Влияние нефтепродуктов на активность почвенных ферментов.....	8
1.2.1 Активность почвенной уреазы.....	10
1.2.2 Активность почвенной инвертазы.....	11
1.2.3 Активность полифенолоксидазы и пероксидазы, коэффициент гумификации почв.....	12
1.3 Влияние нефтепродуктов на микробный состав почвы.....	13
1.4 Роль микроорганизмов в рекультивации нефтезагрязненных почв.....	15
1.5 Влияние нефтепродуктов на жизнедеятельность растений.....	17
1.6 Характеристика типов почв северных территорий России.....	20
2 Объекты и методы исследования.....	23
2.1 Объекты исследования.....	23
2.2 Методы исследования.....	23
2.2.1 Определение общей численности и состав эколого-трофических групп микроорганизмов.....	23
2.2.2 Определение дыхательной активности микроорганизмов.....	24
2.2.3 Определение ферментативной активности исследованных почв.....	25
2.2.4 Определение влажности исследованных почв.....	26
2.2.5 Определение pH исследованных почв.....	27
2.2.6 Внесение разных концентраций дизельного топлива в северные почвы.....	27

2.2.7 Выделение и определение дизелеоокисляющих микроорганизмов.....	27
2.2.8 Постановка модельного мелкоделяночного эксперимента по выявлению влияния разных концентраций дизельного топлива на биологическую активность почв и процессы возобновления лиственницы сибирской.....	29
2.2.9 Статистическая обработка данных.....	33
3 Результаты исследований.....	34
3.1 Лабораторный эксперимент.....	34
3.1.1 Показатели влажности северных почв до и после внесения дизельного топлива.....	34
3.1.2 Показатели рН северных почв до и после внесения дизельного топлива.....	35
3.1.3 Общая численность и состав эколого-трофических групп микроорганизмов северных почв до и после внесения дизельного топлива.....	35
3.1.4 Содержание микробной биомассы и интенсивность базального дыхания северных почв до и после внесения дизельного топлива.....	40
3.1.5 Ферментативная активность северных почв до и после внесения дизельного топлива.....	42
3.2 Дизелеоокисляющие бактерии из загрязненных дизельным топливом северных почв.....	46
3.3 Мелкоделяночный модельный эксперимент.....	47
3.3.1 Влияние разных концентраций дизельного топлива на процессы возобновления лиственницы сибирской.....	47

3.3.2 Показатели рН исследуемых почв мелкоделяночного эксперимента.....	48
3.3.3 Общая численность и состав эколого-трофических групп микроорганизмов исследуемых почв мелкоделяночного эксперимента.....	49
3.3.4 Содержание микробной биомассы и интенсивность базального дыхания исследуемых почв мелкоделяночного эксперимента.....	52
3.3.5 Ферментативная активность исследуемых почв мелкоделяночного эксперимента.....	54
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	59
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	61
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	62

## ВВЕДЕНИЕ

Загрязнение нефтью почвы при освоении нефтегазовых ресурсов является одним из наиболее значимых неблагоприятных антропогенных экологических факторов, оказывающих негативное воздействие на экосистему. В связи с этим большие масштабы приобретает процесс отторжения земель из сельскохозяйственного использования.

Длительное влияние нефтепродуктов на почву приводит к значительным изменениям её свойств, в том числе и микробиологических показателей. Более того действие нефтепродуктов на живые организмы почвы в большей степени определяется их концентрацией. Например, при низких уровнях загрязнения нефтепродуктами наблюдается положительный эффект на рост общей численности микроорганизмов и микробной биомассы, поскольку почва обогащается новым энергетическим субстратом для микроорганизмов. Также при малых дозах нефть оказывает положительное воздействие на развитие растений, ввиду содержания стимулирующих их веществ. Напротив, массивное нефтезагрязнение почв ингибирует ферментативную активность, подавляет физиологические характеристики и жизнедеятельность растений, уменьшает количество микроорганизмов, наиболее чувствительных к поллютанту. Вследствие чего происходит нарушение баланса в экосистеме по причине изменения структурных и геохимических свойств почвенного покрова, а также токсического эффекта на живые организмы.

К настоящему моменту в России нет единого мнения о безопасном содержании нефти в почве, и поэтому ПДК для нефтепродуктов в почве не установлены. В Германии и Голландии, например, 0.05 г/кг нефтепродуктов в почве считают фоновым уровнем; 1 г/кг - повышенным загрязнением, при котором следует провести мониторинг, определить и ликвидировать источник загрязнения; 5 г/кг и более - серьезной экологической проблемой, при которой необходима рекультивация почв [1].

Почвы районов севера обладают маломощным органомным слоем и низкой интенсивностью метаболических процессов микробной деградации органического субстрата, а реакция среды отличается кислыми значениями рН. Поэтому самоочищение почв северных районов от нефтепродуктов и восстановление почвенного метаболизма идут значительно медленнее.

Проблема восстановления нефтезагрязненных почв северных районов весьма актуальна. В связи с этим необходимо изучать формирование почвенного микробиома в условиях нефтезагрязнения, чтобы оценить влияние нефтепродуктов на микробиологические показатели, а также исследовать влияние разных концентраций на развитие растений.

Целью данного исследования являлось: оценить влияние разных концентраций дизельного топлива (ДТ) на микробиологическую активность и способность к возобновлению листовенницы сибирской в почвах северного типа.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) исследовать и сравнить общую численность (ОЧМ) и соотношение эколого-трофических групп микроорганизмов (ЭТГМ) в образцах 4 типов почв при внесении разных концентраций ДТ;
- 2) оценить содержание микробной биомассы (МБ) и интенсивность базального дыхания (БД) в образцах 4 типов почв при внесении разных концентраций ДТ;
- 3) исследовать ферментативную активность в образцах 4 типов почв при внесении разных концентраций ДТ;
- 4) выделить и идентифицировать аборигенные дизелеоокисляющие микроорганизмы из образцов северных почв;
- 5) оценить грунтовую всхожесть семян и сохранность сеянцев *Larix sibirica* в 4 типах почв при внесении разных концентраций ДТ.

## **1 Обзор литературы**

### **1.1 Влияние нефтепродуктов на свойства почвы**

Нефть и нефтепродукты влияют на функциональную деятельность почвенных обитателей: происходит угнетение жизнедеятельности многих микроорганизмов, их ферментативной активности, изменяется общая численность микроорганизмов. Из-за уменьшения влагоемкости нарушается стабильность почвы и замедляется активность микроорганизмов-деструкторов нефти.

Загрязнение нефтепродуктами влияет на все морфологические, физические и физико-химические свойства почвы, обуславливающие ее плодородные и экологические функции [2].

Воздействие нефти на физические качества почвы обусловлено высокой вязкостью нефтепродуктов и их склеивающими свойствами. Нефть, заполняя поры почвенных частиц, вытесняет из них воздух и воду, формируя бескислородную среду. В результате ограничивается распределение влаги, снижается доступность воды и кислорода для почвенных микроорганизмов и растений, затрудняется транспорт и обмен микроэлементов и питательных веществ в почве [3]. Из-за увеличения плотности, нарушения водно-воздушного режима и снижения коэффициента фильтрации нарушаются и агрофизические свойства почвы. Увеличение количества мегаструктуры почвы (частицы более 10 мм) и снижение способности этой фракции к разрушению водой пропорционально увеличению концентрации нефти [4].

Помимо физических меняются также и биологические свойства почвы, ее микробный состав и ферментативная активность. Внесение низких концентраций нефтепродуктов в почву повышает биологическую активность, а при внесении высоких доз быстро меняется характер биохимических процессов и снижаются показатели биологической активности [5].

### **1.2 Влияние нефтепродуктов на активность почвенных ферментов**



Почвенные ферменты имеют преимущественно микробиологическое происхождение и являются продуктами метаболизма микроорганизмов и растений [6]. Ферменты катализируют различные биологические пути трансформации органических и неорганических соединений, обеспечивая циркуляцию элементов и преобразование энергии в условиях как естественной экосистемы, так и нарушенной под влиянием деятельности человека. Неотъемлемой частью работы ферментов является осуществление функциональной взаимосвязи между разными компонентами экосистемы. Благодаря работе почвенных ферментов обеспечивается доступность питательных веществ для организмов и способность почвы к самоочищению от загрязнителей, в том числе от нефтепродуктов. Ферментативная активность почв играет роль в оценке плодородия почв, степени их культивации, загрязненности поллютантами такими как нефтепродукты, тяжелые металлы и др. Анализируя ферментативную активность почвы можно проследить множество биохимических процессов, протекающих в почве, к которым относится гумусообразование, нитрификация, азотфиксация и другие, в том числе процессы деструкции нефтепродуктов [7].

Загрязнение почвы нефтепродуктами влияет на ее ферментативную активность. Первой на нефтезагрязнение реагирует почвенная микробиота, в результате чего изменяется общая численность микроорганизмов, состав эколого-трофических групп и биохимические пути превращения веществ. Вследствие этого изменяется и активность почвенных ферментов. Механизм действия нефтяных загрязнений на активность ферментов различен. Таким образом, по уровню восприимчивости к загрязняющему агенту ферменты расположились от более чувствительных к менее: ферриредуктаза, каталаза, уреазы, инвертазы. Редокс-ферменты характеризуются высокой чувствительностью к нефтяным поллютантам [8].

Использование ферментативной активности в качестве индикатора биологической активности почв имеет ряд преимуществ: показатели активности фермента относительно стабильны, методы определения

ферментативной активности просты в исполнении и отличаются низким значением ошибки, показатели восприимчивы к низким дозам загрязняющего агента [9]. За счет активности ферментов углеводородокисляющих микроорганизмов происходит частичная деструкция нефти, а также образование окисленных метаболитов, таких как спирты, альдегиды, карбоновые кислоты, которые могут вовлекаться в разнообразные метаболические процессы: использоваться микроорганизмами в качестве субстратов, включаться в состав гумуса или образовывать нерастворимые высокомолекулярные соединения [37].

### **1.2.1 Активность почвенной уреазы**

Почвенная уреазы – один из основных ферментов азотного обмена, осуществляющий баланс содержания азота, а также процесс разложения мертвого органического материала в почве [10]. Уролитический фермент расщепляет мочевины с выделением  $\text{NH}_3$  и  $\text{CO}_2$ . Благодаря действию уреазы не происходит чрезмерного накопления метаболитов азотистого обмена в экосистеме. При нефтезагрязнении изменяется естественное протекание процессов круговорота веществ, среди которых и трансформация азота. Углеводороды нефтепродуктов могут по-разному воздействовать на уреазную активность почв. Так, фенол и толуол вызывают ингибирование уреазы, а парафиновые углеводороды, напротив, стимулируют её действие [11]. Кроме того, действие нефти в значительной степени определяется ее концентрацией [12]. Низкие дозы нефтепродуктов оказывают положительный эффект на уреазную активность почв, в то время как высокие концентрации могут угнетать работу уреазы. Концентрации 0.5 и 5.0% бензина снижают уреазную активность почвы до 77 и 94 % соответственно [13]. Короткоцепочечные алканы, составляющие значительную часть бензина, легко проникают сквозь клеточные мембраны бактерий и дестабилизируют их, тем самым оказывая достаточно быстрый токсический эффект на почвенные микроорганизмы [14,

15]. Подобная ситуация происходит и с ДТ. Легкие фракции ДТ ингибируют активность уреазы почв при 0.5 и 1.0%-м загрязнении [13]. На ранних этапах инкубации по степени ингибирующего воздействия на уреазную активность нефтепродукты расположились следующим образом: бензин → дизельное топливо → моторное масло [16]. Вместе с тем нефтезагрязнение несколько снижает показатели рН почвы, что является оптимальным условием для работы уреазы [17].

Суммируя вышесказанное, можно заключить, что активность почвенной уреазы зависит от комплексного воздействия многих факторов, таких как тип нефтепродукта и его концентрация, тип почвы, рН, минеральные компоненты, а также изменение климатических условий [18]. Поэтому показатель уреазной активности можно рассматривать как индикатор состояния почв, по которому можно оценить интенсивность минерализации азотистых соединений и эффективность процессов биоремедиации.

### **1.2.2 Активность почвенной инвертазы**

Ещё одним показательным индикатором для оценки биологической активности почв является инвертазная активность, так как она участвует в регуляции процессов разложения почвенного органического вещества и базального дыхания. Инвертаза активно участвует в процессах превращения углеводов почвы, катализируя гидролиз дисахаридов и полисахаридов по глюкозидным связям [19]. Образующиеся в результате мономеры являются субстратом для жизнедеятельности большинства микроорганизмов. Подавляющая часть почвенной инвертазы имеет микробное происхождение, поэтому содержание гидролазы в почве определяется общей численностью микроорганизмов. Поэтому показатели активности инвертазы можно использовать для оценки состояния почвенного микробиома и интенсивности процессов трансформации органических веществ [20, 21].

Снижение активности инвертазы связано с изменением направления основных процессов превращения органических веществ – преобладают реакции, направленные на окисление углеводов и регулируемые редокс-ферментами [22]. Инвертаза также имеет некоторую чувствительность к нефтепродуктам, обусловленную уменьшением численности и активности целлюлозоразрушающих микроорганизмов, что приводит к снижению содержания в почве дисахаридов [12]. Было установлено, что внесение низких концентраций нефти вызывает незначительное уменьшение активности инвертазы, а внесение высоких концентраций снижало активность фермента на 11% [23]. Также обнаружено, что ДТ и смесь ДТ с топочным мазутом в концентрации 10 л/м<sup>2</sup> значительно ингибируют активность инвертазы [24].

### **1.2.3 Активность полифенолоксидазы и пероксидазы, коэффициент гумификации почв**

Пероксидаза (ПО) и полифенолоксидаза (ПФО) задействованы в многоступенчатых реакциях превращения гумусовых веществ, катализируя взаимопротивоположные процессы распада и синтеза гумуса в почве. ПО катализирует окисление органических соединений почв при помощи H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и O<sub>2</sub>. ПФО, в свою очередь, катализирует цепочку биохимических превращений органических веществ до компонентов гумуса почв (гуматы, гуминовые кислоты, фульвокислоты). Процессы ассимиляции и диссимиляции почвенного гумуса идут одновременно, следовательно, накопление гумуса определяется соотношением показателей пероксидазной и полифенолоксидазной активностей [25, 26]. Для определения состояния плодородия почвы используется коэффициент накопления гумуса (коэффициент гумификации (K<sub>гум</sub>)), определяемый как отношение активности ПФО к активности ПО. Коэффициент гумификации позволяет оценить тенденции направления процессов гумусообразования: гумификации или минерализации.

В отличие от гидролаз, ПФО и ПО менее стабильны в окружающей среде. Активность данных ферментов определяется типом почвы, её физико-

химическими и гидротермическими показателями, количеством и качеством органического вещества, поступающего в почву, видовым и количественным разнообразием почвенной микробиоты и растений, а также комплексным взаимодействием экологических факторов [27, 28], в частности зависит от нефтепродукта и его концентрации в почве.

Среди нефтепродуктов наиболее негативное воздействие на ПО и ПФО проявляет газойлевая фракция богатая моно- и полициклическими ароматическими углеводородами, в том числе смолами и асфальтенами [6]. Установлено, что активность ПО и ПФО снижается с повышением концентрации нефти [23]. Наиболее выраженному угнетению подвергается ПФО: высокие дозы нефтяного загрязнения (8%) приводили к ингибированию фермента в 6 раз. Определено, что внесение низких концентраций нефтепродуктов (2-3%) повышает коэффициент гумификации, а высоких (8%) – снижает [23].

Таким образом, чтобы оценить функциональное состояние почвы в условиях нефтезагрязнения, целесообразно исследовать активность ПО и ПФО, а также коэффициент гумификации, позволяющий судить об интенсивности процесса минерализации гумуса.

### **1.3 Влияние нефтепродуктов на микробный состав почвы**

Почва является средой обитания для совокупности характерных только ей живых организмов, называемых биотой. Воздействуя на почву, нефтезагрязнение ведёт к полной или частичной перестройке почвенного микробиома и изменению его функциональных процессов. Изначально, попадая в почву, нефть влечёт за собой увеличение общей численности микроорганизмов и снижение активности ферментов почвы. По возрастанию численности основные группы микроорганизмов располагаются следующим образом: грибы, спорообразующие бактерии, аммонифицирующие бактерии, актиномицеты [8]. Нитрифицирующие бактерии характеризуются повышенной чувствительностью к нефтезагрязнениям, в отличие от аммонификаторов и

азотфиксаторов, численность которых увеличивается при попадании нефти в почву. Гетеротрофные микроорганизмы подвержены наибольшему негативному влиянию нефтепродуктов. При этом наблюдается уменьшение разнообразия микроскопических грибов, уменьшение роста бактерий. Преобладание олиготрофов в почве свидетельствует о неблагоприятном трофическом режиме [29]. Загрязнение нефтью значительно снижает содержание в почвах целлюлозоразрушающих микроорганизмов [30].

Увеличение общей численности микроорганизмов в условиях нефтезагрязнения происходит вследствие попадания в почву избыточного количества органического субстрата, доступного этим микроорганизмам. Микроорганизмы, устойчивые к данным условиям и способные к окислению углеводородов нефти, начинают активно размножаться и быстро увеличиваются в количествах. Чувствительные к нефтепродуктам организмы погибают [8]. На количество микроорганизмов в загрязненных почвах влияют интенсивность и продолжительность загрязнения, свойства нефти и почв [30]. Так, ДТ в концентрации от 3 г/кг подавляет рост почвенных микроорганизмов посредством токсического действия низкомолекулярных предельных углеводородов [31]. По прошествии времени положительные эффекты нефтепродуктов на микробиологическую активность снижаются, и нефть проявляет свои токсические и канцерогенные действия.

Обнаружено, что в условиях нефтяного загрязнения рН почвы смещается в кислую область (рН 4,5 – 5,5), что благоприятно сказывается на росте грибов. [32]. Однако первоначально загрязнение нефтью существенно изменяет структуру грибных сообществ, в результате чего возрастает численность грибов, обладающих неспецифическими ферментными комплексами для деструкции углеводородов нефти [42]. Установлено, что существует два типа грибов, которые способны окислять углеводороды, в том числе полиароматические, – это лигнолитические и нелигнолитические грибы [33]. Лигнолитические грибы имеют внеклеточные лигнин-разлагающие ферменты, такие как лигнин- и марганец-пероксидаза, лакказы. К числу лигнолитических

грибов относят представителей родов *Phanerochaete*, *Trametes*, *Bjerkandera* и *Pleurotus* [34]. Нелигнолитические грибы синтезируют внутриклеточные ферменты, например, цитохром Р450-зависимая монооксигеназа. Представители нелигнолитических грибов из родов: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cunninghamella*, *Trametes* и *Caldariomyces* [35].

В качестве наиболее устойчивых к действию нефти в высоких концентрациях грибов в почвах северных регионах отмечены грибы родов *Fusarium*, *Sagenomella*, *Mortierella* [36]. Также стоит заметить, что так как почвы северных регионов отличаются кислыми значениями pH, эффективность микробных ассоциаций на основе грибов, будет выше, чем у бактериальных ассоциаций.

#### **1.4 Роль микроорганизмов в рекультивации нефтезагрязненных почв**

Деградация нефти – это сложный многоэтапный процесс. Он определяется физическими, химическими и биологическими факторами. К физическим факторам относятся вымывание и испарение, к химическим – биохимическая деструкция и фотолиз, к биологическим - микробная деградация органического вещества [37, 38]. Самовосстановление плодородия почв, сильно загрязненных нефтью, занимает несколько лет.

Выделяют 3 основных этапа биодегградации нефтепродуктов в почве:

**1 этап** начинается от попадания нефтепродуктов в почву и продолжается от 1 до 2 лет. На этом этапе происходит ряд физико-химических процессов, в результате которых происходит общее перераспределение углеводов в почвенном профиле, а также снижается содержание низкомолекулярных углеводов. Легкие фракции нефти легко проникают сквозь клеточные мембраны и оказывают остротоксические действия на микроорганизмы почвы. По истечении первого этапа биодегградации нефтепродуктов в почве образуются спирты, простые эфиры и ненасыщенные короткоцепочечные углеводороды [39]. Микрофлора обычно подавлена. С уменьшением

токсичности почвы резко увеличивается численность бактерий, в основном парафиноокисляющих.

**2 этап** длится от 4 до 5 лет и характеризуется микробиологической деградацией нефтепродуктов. Самоочищение почвы определяется постепенным снижением количества остаточной нефти в почве. Микроорганизмы, устойчивые к данным условиям, производят специфические ферменты для окисления углеводородов нефти. К таким организмам относятся: бактерии родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium* и др.; мицелиальные грибы родов *Penicillium*, *Aspergillus* и *Fusarium*; дрожжи рода *Candida* [40, 41]. Они способны использовать нефтепродукты в качестве единственного доступного субстрата в аэробных условиях. В этот период происходит трансформация n-алканов C<sub>17-30</sub> и окисление простейших ароматических углеводородов. Через четыре вегетационных периода остаточное содержание нефти в почве составляет около 45%.

**3 этап** биodeградации нефти является самым продолжительным. В почве на данный этап остались наиболее сложные высокомолекулярные соединения нефти, представленные смолисто-асфальтовыми фракциями. Такие сложные структуры трудно разлагаются микроорганизмами. Конечными продуктами метаболизма являются CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, спирты, кислоты и кетоны. Позднее эти метаболиты либо входят в состав почв, либо растворяются в воде.

Таким образом, естественное самоочищение нефтезагрязнённых почв длится довольно продолжительный период времени и включает каскадные процессы деградации разных фракций нефтепродуктов.

Известно, что действие нефти на почвенные организмы в значительной степени будет определяться ее концентрацией. Так, при низких концентрациях нефть, выступает в качестве легко доступного субстрата, тем самым стимулирует рост общей численности микроорганизмов и увеличивает биологическую активность почвы. Напротив, высокий уровень нефтезагрязнения приводит к снижению видового разнообразия почвенного



микробиома и доминированию нефтеокисляющих микроорганизмов. Также известно, что нефтепродукты угнетают жизнедеятельность азот- и нитрофиксирующих бактерий, вследствие чего снижается содержание азота и фосфора, исчезают нитраты. Всё это сказывается на плодородии почв [42].

### **1.5 Влияние нефтепродуктов на жизнедеятельность растений**

Широко описано негативное влияние нефтепродуктов на рост и развитие растений. В результате нефтезагрязнения почвы происходят глобальное угнетение жизнедеятельности растений ввиду нарушения обмена веществ, торможение репродуктивных процессов, в том числе задержка наступления периода цветения и плодоношения, а также подавление фотосинтеза. Многокомпонентный и разнообразный фракционный состав нефти является определяющим фактором токсичности на живые организмы почвы. Высокое содержание ароматических (до 40%) и алифатических углеводородов (до 70%) напрямую воздействует на биологическую активность почв. Короткоцепочечные алканы способны быстро проникать в клетки растений, вызывая множественные нарушения [43]. Легкие нефтепродукты, такие как бензин и дизельное топливо, негативно сказываются на развитии растений при концентрациях от 0.5 % только по продолжении первых месяцев после нефтезагрязнения, позднее фитотоксический эффект снижается. Напротив, тяжелые нефтепродукты, в том числе моторное масло в концентрации 1-5 % изначально не проявляют негативных свойств на растительные сообщества и даже стимулируют их рост и развитие, но с течением времени такой положительный эффект снижается и происходит полное угнетение процессов жизнедеятельности при концентрации выше 5 % [16]. Доказано, что нефтепродукты негативно воздействуют на продуктивность растительного сообщества. В условиях нефтезагрязнения уменьшается биомасса и биоразнообразие. Например, внесение в почву парафинового масла в разы уменьшало биоразнообразие лугового биоценоза. Число видов при этом

снизилось в 6-20 раз, а под влиянием ДТ – в 10-60 раз в зависимости от концентрации поллютанта. С увеличением уровня загрязнения до 10 % начинает уменьшаться и биомасса фитоценоза [44]. Концентрация нефтепродукта считается токсичной, если урожайность снижается более чем на 10 % [45]. Когда снижение показателей происходит более чем на 50 %, почва считается сильно деградированной.

Таким образом, по уменьшению негативного воздействия на развитие растений нефтепродукты располагаются следующим образом: бензин → дизельное топливо → моторное масло [16].

Стоит отметить, что молодые растения больше подвержены токсическому воздействию нефтепродуктов, чем многолетние взрослые особи. После завершения ювенильного этапа взрослые растения способны к частичной сопротивляемости; это обусловлено способностью зрелых растений производить новые структуры из спящих почек даже после частичной гибели растения при загрязнении нефтью.

Одним из главных негативных эффектов нефтезагрязнения почвы является снижение доступности основных макроэлементов, необходимых для жизнедеятельности и развития организма: азота, фосфора и калия. Пути миграции подвижных форм элементов затрудняются в условиях нефтезагрязнения из-за склеивания нефтью почвенных частиц. Также обнаружено влияния нефти и нефтепродуктов на бактерии азотного обмена [46, 47, 48].

Ещё одним негативным последствием нефтезагрязнения почв является рост числа грибов, продуцирующих токсины [49]. Продукты жизнедеятельности таких грибов оказывают угнетающее действие на растения и, в конечном итоге, могут привести к их гибели [50].

В большинстве случаев на нефтезагрязненных почвах у растений проявляются следующие физиологические и фенологические аномалии [51]:

- появление как карликовых, так и аномально больших жизненных форм, нарушение нормальных пропорций органов;

- обилие несвойственных здоровым растениям утолщений, наростов, и деформаций, придающих отдельным представителям неестественный, изуродованный вид;

- нарушение порядка стадий цикла жизни растений (повторное цветение видов, обычно цветущих один раз в сезон);

- обильные повреждения, нанесённые растениям вредителями – прямое следствие слабого иммунитета.

На клеточном уровне под действием углеводов нефтепродуктов происходит повреждение мембран, важнейших для жизнедеятельности растений органоидов: митохондрий и хлоропластов. Вследствие чего возникают проблемы в работе фотосинтетического аппарата [52]. Также обнаружено пагубное влияние углеводов нефти на мембраны клеток корня [53].

Вопреки всему вышесказанному, стоит отметить, что нефтезагрязнения почв способны стимулировать процессы роста и развития растений [54]. Это утверждение справедливо лишь для некоторых видов растений, которые имеют разветвлённую корневую систему. При этом положительный эффект возможен при низких концентрациях загрязняющего агента и специфических почвенных условиях. Так, наибольшую устойчивость продемонстрировали некоторые представители бобовых, злаков и корневищных растений. Несмотря на это, в целом нефтяное загрязнение остается серьезной проблемой для растительного мира и требует построения превентивных мер для его сдерживания.

Некоторыми исследованиями подтверждено, что биоремедиация наземных экосистем, загрязненных нефтью, наиболее эффективно проводится с использованием единой биосистемы растение-микроорганизмы [55, 56]. Выращивание на загрязнённых почвах растений, ризосфера которых заселена микроорганизмами, трансформирующими загрязняющие вещества, является перспективным приёмом улучшения качества загрязнённых почв. Растения, используемые для биологической мелиорации загрязнённых нефтью почв, должны обладать следующими свойствами: длительным периодом жизни,

способностью расти на низко плодородных почвах, а также выделять в почву большое количество корневых экссудатов, таких как аминокислоты, простые сахара, полисахариды и др., стимулирующих развитие ризосферной микробиоты, и синтезировать экзоферменты, трансформирующие загрязняющие вещества в менее токсичные соединения. Подобраны виды растений-ремедиантов для загрязненных ДТ почв в условиях севера [56]: злаковые - *Lolium perenne*, *Festuca pratensi*, *Leymus arenarius*, *Phalaroides arundinacea*, *Bromopsis inermis*; бобовые - *Lotus corniculatus*.

## 1.6 Характеристика типов почв северных территорий России

Почвы районов севера обладают маломощным органометным слоем и низкой интенсивностью метаболических процессов микробной деградации органического субстрата. Реакция среды характеризуется низкими значениями рН. Поэтому самоочищение почв северных районов от нефтепродуктов и восстановление почвенного метаболизма идут медленно. В зависимости от типов северных почв, физико-химических и биологических свойств они восстанавливаются с разной скоростью.

*Подбуры* формируются на супесчаных и легкосуглинистых отложениях на плоских вершинах и склонах, характеризуются элювиально-иллювиальной дифференциацией оксидов Fe и Al. Поверхностный грубогумусовый горизонт развит хорошо. Срединные горизонты профиля ярко окрашены, имеют охристую, желтую или желто-бурую окраску иллювиального горизонта ВF за счет красящих железистых пленок на поверхности минеральных зерен. Нижний минеральный горизонт более светлый. Для подбуров характерны кислая и сильноокислая реакция всего профиля со снижением кислотности книзу, ненасыщенность основаниями, аккумулятивное распределение ила, обменных оснований и гумуса фульватного состава с преобладанием подвижных и агрессивных фракций.

*Аллювиальные серогумусовые* почвы встречаются практически во всех экологических зонах и находятся на территориях, которые ранее были

покрыты водой. Чаще аллювиальные почвы образуются в прирусловой части поймы, на повышенных участках центральной поймы под разнотравно-злаковой растительностью, где они формируются в результате оседания материала в отложениях водных потоков. Почвы периодически затапливаются паводковыми водами. Органогенный горизонт маломощный, дерновый горизонт густо пронизан корнями травянистых растений и кустарничков. Аллювиальным почвам свойственна слоистость профиля, сочетание песчаных и супесчаных фракций, иногда слоистость слабо выражена, в нижней части профиля могут встречаться горизонтально ориентированные яркие ржавые прослои. Гранулометрический состав песчаный, супесчаный. В профиле присутствуют окатанные камни разного размера. Аллювиальные почвы часто страдают от засоления и неспособности удерживать необходимую влагу и питательные вещества. Они также могут подвергаться эрозии при сильном дожде или наводнении. В целом аллювиальные серогумусовые почвы являются важным источником питания для растительности в условиях севера.

*Криоземы* распространены в зонах многолетней мерзлоты и занимают выположенные поверхности равнин и делювиально-криосолифлюкционные террасы с ярко выраженным криогенным бугорково-западинным микрорельефом. Характеризуются затрудненным внутренним дренажем и переувлажнением почвенного профиля, что обусловлено как тяжелым гранулометрическим составом почв, так и присутствием в профиле льдисто-мерзлотного водоупорного горизонта. В результате мерзлотного определения образуется переходная зона между замерзшими и размороженными слоями, которая называется полем мерзлости. Эта зона очень важна для изучения криоземов, так как именно здесь происходят процессы газового обмена, которые влияют на климатические процессы. Криоземы диагностируются по сочетанию органогенного подстильно-торфяного, состоящего из опада мхов и лишайников, и минерального криотурбированного, т.е. перемешанного, горизонтов. Органогенный горизонт представлен

растительными остатками разной степени трансформации, далее следует тиксотропный криотурбированный горизонт. Механический состав почв однородный или мало каменистый суглинисто-глинистый. В минеральном горизонте могут встречаться растительные остатки разной степени разложения. Структура почв творожистая или мелкозернистая, либо почвы бесструктурные.

*Глееземы* сопутствуют криоземам, занимая депрессии, где длительное время застаивается влага. Глеевый горизонт сплошной и достаточно мощный, тиксотропный, тяжелоглинистый с характерной ярко голубовато-зеленой окраской с ржавыми пятнами и полосами. На открытом воздухе почвенные образцы глеевого горизонта быстро теряют яркую окраску, переходят в холодные серые тона. Над мерзлым горизонтом, который залегает на глубине 50-60 см, наблюдается переувлажнение, почвенный разрез быстро заплывает и заполняется водой. Глееземы отличаются слабокислой или кислой реакцией с повышением значений рН вниз по профилю; в случае карбонатности пород возможна нейтральная реакция. Органическое вещество фульватного состава.

На процессы загрязнения и самоочищения почв оказывают воздействие следующие почвенно-климатические особенности северных районов [57]:

- низкие температуры и короткий период самоочищения природных сред;
- кислая реакция почв;
- промывной водный режим почв, способствующий выщелачиванию элементов, что приводит к загрязнению грунтовых вод;
- высокая продолжительность солнечного сияния в летние месяцы, что оказывает позитивный эффект на самоочищения почв путем фотохимических превращений.

Специфические почвенно-климатические особенности северных районов в совокупности со специфическими чертами микробиоты почв (психротолерантность, олиготрофность, низкое биоразнообразие) создают необходимость разработки рекомендаций по биоремедиации почв от нефтепродуктов.

## 2 Объекты и методы исследования

### 2.1 Объекты исследования

Сотрудниками Института леса им. В.Н. Сукачева в августе 2021 г. на территории Таймырского Долгано-Ненецкого муниципального района и г. Норильска были отобраны основные образцы северных почв для их исследования. Район расположен за Северным полярным кругом, на полуострове Таймыр. Объектами исследований являлись образцы 4-х типов почв: криозем, глеезем, аллювиальная дерновая и подбур (табл. 1). Почвы были отобраны с верхнего минерального горизонта с глубины 0-10 см.

Таблица 1 – Координаты точек отбора почвенных образцов

Тип почвы	Широта	Долгота
Криозем	69°25'31"	86°32'37"
Глеезем	69°25'0"	86°32'20"
Аллювиальная	69°32'16"	88°5'15"
Подбур	69°35'26"	88°16'7"
Подбур	69°28'30"	88°31'20"

### 2.2 Методы исследования

#### 2.2.1 Определение общей численности и состав эколого-трофических групп микроорганизмов

Общую численность микроорганизмов (ОЧМ) и состав эколого-трофических групп (ЭТГМ) определяли чашечным методом с использованием ряда диагностических питательных сред: мясопептонный агар (МПА), сусло агар (СА), крахмало-аммиачный агар (КАА) и почвенный агар (ПА). Посев почвенной суспензии (0.01 мл) производили из разведений 1:10<sup>3</sup> на поверхность питательных сред в чашках Петри в трехкратной повторности. Засеянные чашки Петри инкубировали при температуре 27-28 °С. Подсчет численности

колоний бактерий проводили на 3-5 сутки, а грибов – на 5-7-е сутки. Число колониобразующих единиц (КОЕ) высчитывали по формуле:

$$(x \pm 2\sigma_x) \times K \times \frac{1}{V}, \quad (1)$$

где  $x$  – среднее число колоний, выросшее при высеве из данного разведения;

$\sigma$  – среднее квадратичное отклонение;

$K$  – разведение, из которого производился посев;

$V$  – объём почвенной суспензии, из которого производился посев.

Данные по ОЧМ, полученные методом посева, выражали в млн КОЕ на 1 г сухой почвы [58].

### 2.2.2 Определение дыхательной активности микроорганизмов

Дыхательную активность микроорганизмов определяли методом субстрат-индуцированного дыхания (СИД) (см. рис.1) с использованием газового хроматографа Agilent 6890 N (США) (см. рис. 2). По количеству выделяемого почвенными микроорганизмами  $\text{CO}_2$  определяли микробную биомассу (МБ) ( $C_{\text{мик}}$ ) и базальное дыхание (БД) [58, 59, 60, 61].



Рисунок 1 – Флаконы с образцами почвы после добавления глюкозо-минеральной смеси





Рисунок 2 – Хроматограф Agilent N 6890 и генератор водорода

### 2.2.3 Определение ферментативной активности исследуемых почв

Ферментативную активность почв определяли методами А.Ш. Галстяна и Т.А. Щербаковой [62]. Колориметрическими методами с использованием фотоэлектроколориметра КФК-3 определяли активность ферментов: инвертазы (И), уреазы (У) (рис. 3), пероксидазы (ПО) и полифенолоксидазы (ПФО). Активность инвертазы выражали в мг глюкозы / г почвы, уреазы – в мг  $N-NH_4$  / г почвы, пероксидазы и полифенолоксидазы – в мг бензохинона / г почвы. По соотношению активности полифенолоксидазы и пероксидазы (ПФО / ПО) высчитывали коэффициент гумификации ( $K_{гум}$ ), позволяющий судить об интенсивности процесса минерализации гумуса [62].

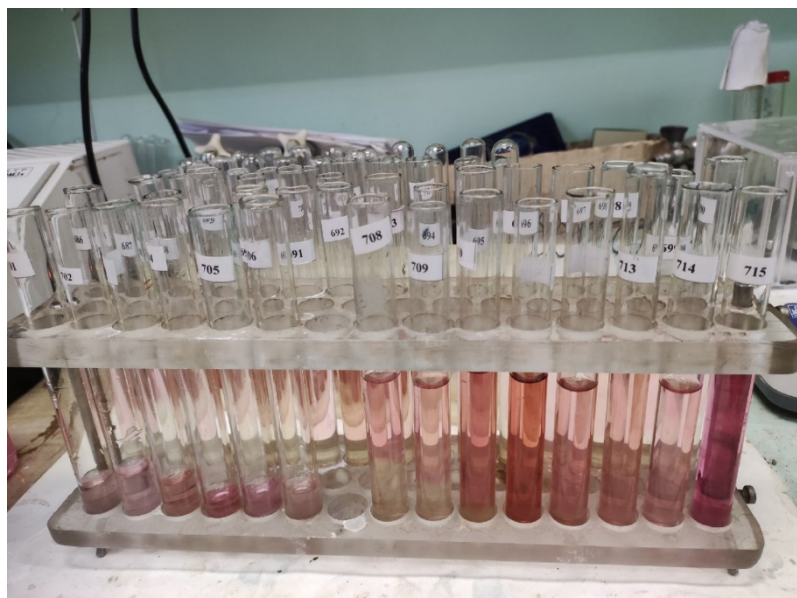


Рисунок 3 – Определение уреазной активности исследуемых почв

#### 2.2.4 Определение влажности исследуемых почв

Влажность образцов почв определяли по ГОСТ 28268-89 [63]. Почвенные образцы помещали в пронумерованные, взвешенные алюминиевые чашки. Далее в каждую чашку помещали навеску с 5 г почвы. Затем, почвенные образцы в алюминиевых чашках высушивали в сушильном шкафу при 180 °С в течение 6-7 дней. По истечении указанного срока высушенную почву взвешивали. Массовое отношение влаги в почве в процентах вычисляли по формуле:

$$W = \frac{m_1 - m_0}{m_0 - m} \times 100\% \quad (2)$$

где  $m_1$  - масса влажной почвы со стаканчиком и крышкой, г;

$m_0$  - масса высушенной почвы со стаканчиком и крышкой, г;

$m$  - масса пустого стаканчика с крышкой, г.

### **2.2.5 Определение рН исследуемых почв**

Кислотность северных почв (рН) определяли потенциометрическим способом, для этого образцы почв массой 1 г помещали в пробирки. К образцам приливали по 10 мл дистиллированной воды (1:10). Почву с водой оставляли на 60 мин для отстаивания. Далее фильтровали почвенную суспензию с помощью стеклянных воронок и фильтров. В полученной почвенной водной вытяжке измеряли рН с помощью портативного потенциометра Аквилон–410.

### **2.2.6 Внесение разных концентраций дизельного топлива в северные почвы**

Сотрудниками ИЛ СО РАН был проведен инкубационный эксперимент (август 2021 - февраль 2022 гг.) по оценке дыхательной активности (МБ и БД) северных почв до и после внесения разных концентраций дизельного топлива [64] В образцы почв вносили ДТ в концентрации 1 г/кг, 3 г/кг, 5 г/кг (контроль, 1 вариант - 1 г/кг, 2 вариант - 3 г/кг, 3 вариант - 5 г/кг) в трех повторностях. Образцы северных почв после окончания эксперимента (февраль 2022 г.) исследовали на ОЧМ, состав ЭТГМ, ферментативную активность, содержание МБ и БД, влажность и рН (см. пункт 2.2.1-2.2.5).

### **2.2.7 Выделение и определение дизелеоокисляющих микроорганизмов**

Из почв, в которые были внесены разные концентрации ДТ, выделяли дизелеоокисляющие микроорганизмы. Дизелеоокисляющие накопительные культуры были изолированы из образцов 2 типов северных почв (подбур и криозем), отобранных на территории полуострова Таймыр (см. пункт 2.1). Из навесок почвы, массой 40 г готовили почвенные суспензии на основе жидкой минеральной среды Маккланга с добавлением 1 мл ДТ на 100 мл среды. Почвенные суспензии инкубировали в шейкере-инкубаторе при 180 об/мин, температуре 28 °С в течение 14 суток. После инкубации производили посев на

твердую минеральную среду Маккланга, в которую вносили 1 мл ДТ на 100 мл среды (см. рис. 4, 5).



Рисунок 4 – Почвенные суспензии после 14-дневной инкубации

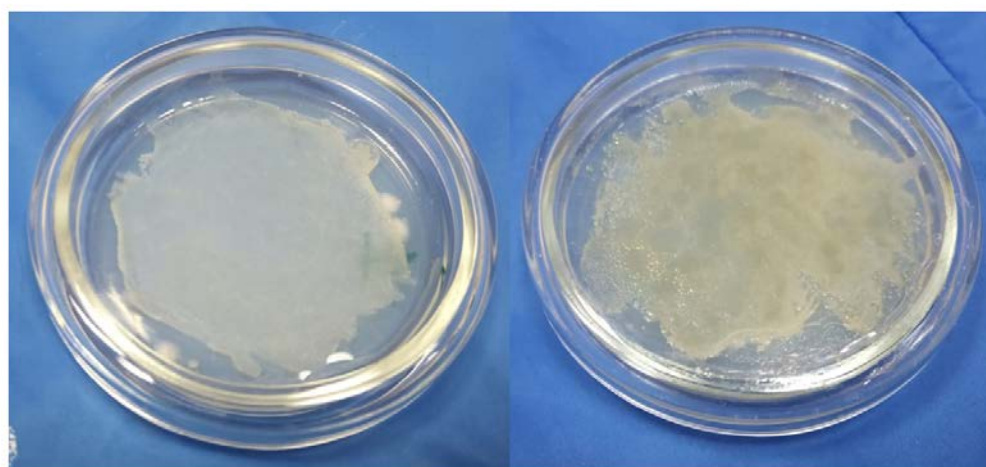


Рисунок 5 – Дизелеоокисляющие колонии бактерий на твердой среде Маккланга

Путем многократных рассевов на агаризованной минеральной среде Маккланга были выделены чистые культуры. Пересев чистых культур бактерий производили на косой агар в пробирки со средой Маккланга с добавлением ДТ 1 мл на 100 мл среды, затем в течение 5 суток инкубировали в термостате при 28 °С. При росте на среде Маккланга бактерии образовывали светло-бежевые колонии. Пробирки с выросшими культурами далее сохраняли в холодильнике.

Для идентификации дизелеоокисляющих микроорганизмов готовили чистые суточные культуры бактерий на минеральной среде Маккланга. Определение видовой принадлежности бактерий проводилось в клинической лаборатории Красноярского краевого центра охраны материнства и детства методом масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией на приборе MALDI-TOF Bruker (Германия). В стерильных условиях на специальный планшет с мишенями наносился микробный материал, который затем обрабатывали раствором матрицы, обеспечивающей лазер-индуцированное получение ионизированных пептидов. Заполненный планшет устанавливался в устройство MALDI-TOF масс-спектрометра, и производилось измерение и обработка полученных масс-спектров, нацеленных на идентификацию таксономической принадлежности исследуемых микроорганизмов.

#### **2.2.8 Постановка модельного мелкоделяночного эксперимента по выявлению влияния разных концентраций дизельного топлива на биологическую активность почв и процессы возобновления лиственницы сибирской**

Лиственница гмелина (*Larix gmelinii* Rupr.) наряду с лиственницей сибирской (*Larix sibirica* L.) являются основными лесообразующими породами в районах субарктического севера. Поэтому в модельном мелкоделяночном эксперименте по оценке влияния разных концентраций дизельного топлива на рост и развитие растений тестовым объектом выбрали лиственницу сибирскую, семена которой (Усть-Бюрское лесничество, 1 класс качества, дата сбора январь-февраль 2022г. - удостоверение о качестве семян №24/12788) высевали в 4 типах почв (0-10 см), доставленных с Таймырского Долгано-Ненецкого муниципального района и г. Норильска: криозем, глеезем, аллювиальная дерновая и подбур (см. пункт 2.1). Кроме того, для сравнения взяли натурную дерново-карбонатную слабощелочную супесчаную почву [65, 66] с опытного

участка. Делянки были заложены 27 мая 2022 г. на посевном участке ИЛ СО РАН (Академгородок) г. Красноярск. Несмотря на то, что климатические условия северных районов Красноярского края различаются с таковыми центральной его части, для проведения модельного эксперимента были созданы единообразные условия для роста и развития лиственницы. Перед посевом семена лиственницы сибирской замачивали в 0.5%-ном растворе марганцево-кислого калия в течение 5 часов. Экспериментальный участок выстилали черным спанбондом плотностью 60 г/м<sup>2</sup> с целью предотвращения роста травы и обеспечения доступности влаги вследствие водного полива в оптимальном количестве. Поверх материала заложены делянки 19\*15 см с 4 модельными почвами северного типа и дерново-карбонатной супесчаной почвой, высотой до 5 см. Для определения влияния ДТ на всхожесть и выживаемость лиственницы сибирской делянку с каждым типом почвы делили на 3 части (варианты), в которые вносили ДТ в концентрации 1 г/кг и 5 г/кг, контролем служил вариант без внесения ДТ.

Семена сеяли в бороздки длиной 15 см в трех повторностях, по 15 шт. в каждую бороздку, расстояние между посевными строчками 5 см. План-схема и общий вид мелкоделяночного эксперимента представлен на рис. 6 и 7. Семена заделывались в почву на глубину до 1.0 см с последующим мульчированием вермикулитом. В течение вегетационного периода за посевами проводили уход в виде полки сорняков и полива почвы.

	контроль	1 г/кг	5 г/кг
Подбур			
Криозем			
Глеезем			
Аллювиальная			
Дерново-карбонатная			

Рисунок 6 - План-схема модельного мелкоделяночного эксперимента на посевном участке ИЛ СО РАН в Академгородке г. Красноярска

Учитывали грунтовую всхожесть семян (июнь, 2022 г.), рост и развитие сеянцев (июнь-сентябрь, 2022 г.) и сохранность сеянцев (май 2023 г.). В сентябре 2022 г. произвели отбор почвенных образцов для определения рН, микробной и ферментативной активности, МБ и БД (см. пункт 2.2.1 - 2.2.5).



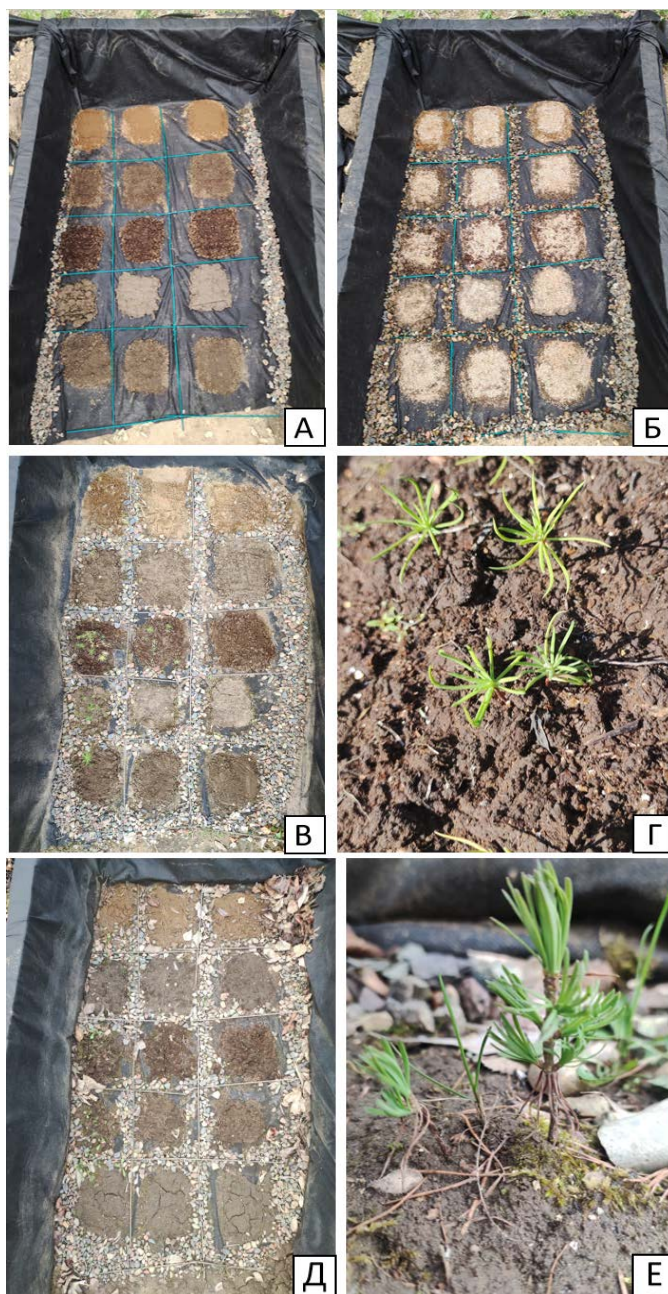


Рисунок 7 - Внешний вид и расположение участков в модельном мелкоделяночном эксперименте с лиственницей сибирской на посевном участке ИЛ СО РАН (г. Красноярск): технологические аспекты закладки опыта (А, Б); всходы лиственницы сибирской после двух месяцев с начала эксперимента (В, Г); сеянцы лиственницы сибирской через год с начала эксперимента (Д, Е)



### **2.2.9 Статистическая обработка данных**

Полученные данные по ОЧМ, составу ЭТГМ, микробной биомассе, базальному дыханию, ферментативной активности, влажности и рН исследованных почв, а также по грунтовой всхожести семян и сохранности сеянцев к концу вегетации были обработаны в программе Excel 2016. Для каждого образца почв посчитаны средние значения, ошибки средних, проведен корреляционный анализ.

### **3 Результаты исследований**

Изъятые страницы с 34-58 в связи с авторским правом

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Биологическая активность исследуемых почв зависела от их типа и концентрации вносимого ДТ. До внесения ДТ максимальные значения ОЧМ были у подбура и аллювиальной почвы (14.2 и 13.8 млн КОЕ/ г почвы), а минимальными у глеезема (7.4 млн КОЕ/ г почвы). В лабораторном эксперименте при увеличении концентрации ДТ у глеезема и аллювиальной дерновой почвы отмечено повышение ОЧМ, в криоземе и подбуре численность микроорганизмов носила параболический характер. После добавления ДТ в криоземе, аллювиальной дерновой почве и глееземе доминировали олиготрофы, а в подбуре - гидролитики.
2. Содержание МБ во всех почвах после внесения разных концентраций ДТ значительно уменьшилось (в среднем в 1.8 раз), а скорость БД увеличилась, что указывает на негативное влияние ДТ на большую часть микроорганизмов. Низкие значения МБ в глееземе и подбуре при довольно высоких значениях БД свидетельствуют о стрессовом состоянии микробиомов почв из-за внесения ДТ.
3. Установлено, что ферментативная активность почв существенно зависела от внесения ДТ. Максимальная концентрация ДТ снижала активность уреазы в глееземе, криоземе и подбуре, ПО – в криоземе, ПФО – в подбуре и аллювиальной дерновой почве, инвертаза и коэффициент гумификации снижались во всех почвах, кроме глеезема.
4. Из загрязненных ДТ северных почв выделены и идентифицированы дизелеоокисляющие бактерии из родов *Serratia*, *Pseudomonas* и *Rhodococcus*.
5. В мелкоделяночном эксперименте установлено, что на всхожесть семян, развитие и сохранность сеянцев лиственницы сибирской оказывали влияние как тип почвы, так и добавление разных концентраций ДТ. В контроле и опыте всех почв грунтовая всхожесть семян и итоговая сохранность сеянцев лиственницы сибирской оказались довольно

низкими. На участках криозема и глеезема в вариантах с 5 г/кг ДТ не отмечено ни одного всхода. В глееземе четко прослеживается отрицательная корреляция между количеством семян и концентрацией добавленного ДТ.

6. В мелкоделяночном эксперименте ферментативная активность и общая численность микроорганизмов модельных почв при добавлении разных концентраций ДТ оказались в целом выше в 3.5 и 3.4 раза соответственно, чем в лабораторном. Содержание микробной биомассы в оптимальных лабораторных условиях было выше, чем в мелкоделяночном эксперименте, где внесение ДТ во всех модельных почвах снижало активность МБ в среднем в 5.6 раз, а интенсивность БД повышало в 1.3 раза.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БД – базальное дыхание

ДТ – дизельное топливо

КАА – крахмало-аммиачный агар

$K_{\text{гум}}$  – коэффициент гумификации

КОЕ – колониобразующая единица

МБ – микробная биомасса

МПА – мясопептонный агар

ОЧМ – общая численность микроорганизмов

ПА – почвенный агар

ПО - пероксидаза

ПФО - полифенолоксидаза

СА – сусло агар

ЭТГМ – эколого-трофические группы микроорганизмов

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Васильченко А. В. Проблема экологической оценки загрязнения почв нефтепродуктами / А. В. Васильченко, Т. С. Воеводина // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2015. – №. 10 (185). – С. 147-151.
- 2 Габбасова, И. М. Деградация и рекультивация почв Башкортостана / И. М. Габбасова; под. ред. чл.-корр. АН РБ, проф. Ф. Х. Хазиева. – Уфа : Гилем, 2004. – 284 с.
- 3 Новоселова, Е. И. Роль ферментативной активности почв в осуществлении ею трофической функции в условиях нефтяного загрязнения / Е. И. Новоселова, Н. А. Киреева, М. И. Гарипова // Вестник Башкирского университета. – 2014. – Т. 19, № 2.
- 4 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.
- 5 Шорина, Т. С. Влияние нефтяного загрязнения на биологическую активность черноземов Оренбургской области / Т. С. Шорина // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2009. – № 6. – С. 651-653.
- 6 Новоселова, Е. И. Экологические аспекты трансформации ферментного пула почвы при нефтяном загрязнении и рекультивации : дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.27 / Новоселова Е. И. – Воронеж, 2008. – 334 с.
- 7 Новоселова, Е. И. Ферментативная активность почв в условиях нефтяного загрязнения и её биодиагностическое значение / Е. И. Новоселова // Теоретическая и прикладная экология. – 2009. – № 2. – С. 4-12.

- 8 Полонская, Д. Е. Влияние уровня нефтезагрязнения на состав почвенных микроорганизмов / Д. Е. Полонская, С. В. Хижняк, В. И. Полонский, Т. С. Бородулина // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2011. – № 7. – С. 47-51.
- 9 Steinweg J.M. Microbial responses to multi-factor climate change: effects on soil enzymes / J. M. Steinweg, J. S. Dukes, E. A. Paul, M. D. Wallenstein // Front. Microbiol. 2013. V. 4.P. 1–11.
- 10 Купревич В.Ф., Щербакова Т.А. Почвенная энзимология. Минск: Наука и техника, 1966, 275 с.
- 11 Абдусаламова Х. С. Влияние нефтезагрязнения на показатели биологической активности почв/ Х. С. Абдусаламова, А. М. Дохтукаева, Я. С. Усаева //Universum: химия и биология. – 2017. – №. 12 (42). – С. 4-6.
- 12 Рыкова А. И. Влияние нефтепродуктов на активность гидролаз почвы (на примере керосина)/ А. И. Рыкова, Е. Н. Макарова, Е. А. Толстых //Зыряновские чтения. – 2011. – С. 180-182.
- 13 Михайлова А. А. Влияние нефтепродуктов на активность почвенной уреазы в условиях севера/ А. А. Михайлова //Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. – 2010. – №. 5. – С. 111-115.
- 14 Колесников С. И. Биодиагностика экологического состояния почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами/ С. И. Колесников // Ростов н/Д, 2007. 192 с.
- 15 Чижов Б. Е. Рекультивация земель лесного фонда, подвергшихся нефтяному загрязнению/ Б. Е. Чижов // М., 2004. 80 с
- 16 Михайлова, А.А. Эколого-биологические особенности и подходы к нормированию загрязнения нефтепродуктами городской среды Архангельска:

дис. ... канд. биол. наук: 03.02.08 / Михайлова А. А. – Архангельск, 2014. – 158 с.

17 Хазиев Ф.Х. Изменение биохимических процессов в почвах при нефтяном загрязнении и активация разложения нефти/ Ф. Х. Хазиев, Ф. Ф. Фатхиев // Агрохимия. - 1981. Т.1. -10. - С. 102-111.

18 Медведева Е.И. Биологическая активность нефтезагрязнённых почв в условиях Среднего Поволжья: Автореф. дис. канд. биол. наук. Тольятти. 2002, 18 с.

19 Рыкова А. И. Влияние нефтепродуктов на активность ферментов почвы/ А. И. Рыкова, Е. А. Толстых, К. А. Харина //Вестник Курганского государственного университета. – 2012. – №. 3 (25). – С. 98-101.

20 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.

21 Прудникова М.А. Использование биологических показателей в мониторинге и постагрогенных чернозёмов / М.А. Прудникова, Е.В. Даденко, О.Ю. Ермолаева // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2013. Т. 15. № 3 (5). С. 1406-1409.

22 Мязин, В. А. Влияние нефтепродуктов на биологические показатели почвы в условиях полевого модельного эксперимента / В. А. Мязин, Н. В. Фокина // Материалы XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – 2015. – С. 197-201.

23 Сергатенко С. Н. Влияние нефтяного загрязнения на активность почвенных ферментов классов оксидоредуктаз и гидролаз / С. Н. Сергатенко, И. Л.



Федорова, Т. Д. Игнатова //Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2022. – №. 3 (59). – С. 83-88.

24 Мязин, В.А. Разработка способов повышения эффективности биоремедиации почв Кольского Севера при загрязнении нефтепродуктами (в условиях модельного эксперимента): дис. ... канд. биол. наук: 03.02.08 / Мязин В. А. – Апатиты, 2014. – 159 с.

25 Stockdale E. A. Biological indicators of soil quality in organic farming systems / E. A. Stockdale, C. A. Watson // Renewable Agriculture and Food Systems. – 2009. Volume 24. P. 308-318.

26 Marcinkeviciene A. 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 // Eurasian Soil Sci. – 2013. Volume 46. P. 198-203.

27 Игнатов А. Л. Экологические проблемы нефтяных разливов / А. Л. Игнатов //Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. – 2021. – С. 37-42.

28 Romanova S.M. Evaluation of mulching technology application for cultivation of agricultural crops / S. M. Romanova, O. I. Ponomarenko, I. V. Matveyeva, L. K. Beisembayeva, N. B. Kazangarova, Z. A. Tukenova // Journal of Chemical Technology and Metallurgy. - 2019. - № 3. - P. 3.

29 Шаркова, С. Ю. Состояние микробного комплекса почв при нефтезагрязнении / С. Ю. Шаркова, Е. А. Полянскова, Е. А. Парфенова // Известия Пензенского государственного педагогического университета им. В.Г. Белинского. – 2011. – № 25.

30 Кузнецова, Т. В. Динамика микробного пула дерново-подзолистых почв при разных начальных уровнях нефтяного загрязнения / Т. В. Кузнецова, А. М.

Петров, Р. Э. Хабибуллин // Вестник Казанского технологического университета. – 2017. – Т. 20, № 17.

31 Lapinskiene, A. Eco-toxicological studies of diesel and biodiesel fuels in aerated soil / A. Lapinskiene, P. Martinkus, V. Rebzdaite // Environmental Pollution. – 2006. – № 142(3). – P. 432–437.

32 Schwarz A. Response of the fungal community to chronic petrogenic contamination in surface and subsurface soils / A. Schwarz // Geoderma. – 2019. – Т. 338. – С. 206-215.

33 Aydin S. Aerobic and anaerobic fungal metabolism and Omics insights for increasing polycyclic aromatic hydrocarbons biodegradation / S. Aydin // Fungal Biology Reviews. – 2017. – Т. 31. – №. 2. – С. 61-72.

34 Chikere C. B. Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil / C. B. Chikere, G. C. Okpokwasili, B. O. Chikere // 3 Biotech. – 2011. – Т. 1. – С. 117-138.

35 Ichinose H. Cytochrome P 450 of wood - rotting basidiomycetes and biotechnological applications / H. Ichinose // Biotechnology and applied biochemistry. – 2013. – Т. 60. – №. 1. – С. 71-81.

36 Бикташева Л. Р. Изменение структуры грибного сообщества почв при высоком содержании нефти в условиях модельного эксперимента / Л. Р. Бикташева, С. Ю. Селивановская, П. Ю. Галицкая // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. – 2020. – Т. 162. – №. 4. – С. 573-591.

37 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.

- 38 Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. Ред. Глазовская М.А., М.: Наука, 1988, 254 с
- 39 Atlas R.M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective / R.M. Atlas // *Microb. Rev.*, 1981. 45, P.180- 209.
- 40 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.
- 41 Bidja Abena M. T. Microbial diversity changes and enrichment of potential petroleum hydrocarbon degraders in crude oil-, diesel-, and gasoline-contaminated soil / M. T. Bidja Abena // *3 Biotech.* – 2020. – Т. 10. – №. 2. – С. 1-15.
- 42 Исакова, Е. А. Особенности воздействия нефти и нефтепродуктов на почвенную биоту / Е. А. Исакова // *Colloquium-journal.* – 2019. – № 12.
- 43 Pikovskii Y. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and photosynthetic activity of perennial cereals as markers of soil remediation after petroleum hydrocarbons pollution (field experience) / Y. Pikovskii // *Conf. Novel Approaches for Bioremediation of Organic Pollution*. Eliat. – 1998. – С. 22.
- 44 Заушинцен А.С. Изменение свойств темно-серой лесной почвы в результате загрязнения нефтепродуктами и биодеструкции углеводов микробной ассоциацией: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.08 / Заушинцен А. С. – Кемерово, 2014. – 155 с.
- 45 Колесников, С.И. Влияние загрязнения нефтью и нефтепродуктами на биологическое состояние чернозема обыкновенного / С.И. Колесников, К.Ш. Казеев, М.Л. Татосян, В.Ф. Вальков // *Почвоведение.* – 2006. – № 5. – С. 616.
- 46 Хазиев Ф. Х. Влияние нефтяного загрязнения на некоторые компоненты агроэкосистемы / Ф. Х. Хазиев // *Агрохимия.* – 1988. – №. 2. – С. 56-61.

- 47 Исмаилов Н.М. Микробиология и ферментативная активность нефтезагрязненных почв / Н.М. Исмаилов// Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. М.: Наука, 1988. С. 42-56.
- 48 Xu J. G. Nitrogen dynamics in soils with different hydrocarbon contents planted to barley and field pea / J. G. Xu, R. L. Johnson //Canadian Journal of Soil Science. – 1997. – Т. 77. – №. 3. – С. 453-458.
- 49 Korneykova M. V. Bioremediation of soil of the kola peninsula (Murmansk region) contaminated with diesel fuel / M. V. Korneykova //Geography, Environment, Sustainability. – 2021. – Т. 14. – №. 1. – С. 171-176.
- 50 Иларионов С. А. Роль микромицетов в фитотоксичности нефтезагрязненных почв / С. А. Иларионов, А. В. Назаров, И. Г. Калачникова //Экология. – 2003. – №. 5. – С. 341-346.
- 51 Грищенко О. М. Ботанические аномалии как поисково-разведочный критерий нефтегазоносности / О. М. Грищенко //Экология. – 1982. – Т. 1. – С. 18-22.
- 52 Веселовский В. А. Биотестирование загрязнения среды нефтью по реакции фотосинтетического аппарата растений / В. А. Веселовский, В. С. Вшивцев //Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. М.: Наука. – 1988. – С. 99-112.
- 53 Буадзе О. А. Ультраструктурные и цитологические основы действия ксенобиотиков на растительные клетки / О. А. Буадзе //Биотрансформация ксенобиотиков в растениях. Тбилиси: Менциерба. – 1988. – С. 248-284.
- 54 Шулаев Н. С. Изучение воздействия нефтяного загрязнения почв на развитие высших растений на примере рогоза широколистного / Н. С. Шулаев //Успехи современного естествознания. – 2016. – №. 2. – С. 193-197.

- 55 Евдокимова Г. А. Способы биоремедиации почв Кольского Севера при загрязнении дизельным топливом / Г. А. Евдокимова, Н. П. Мозгова, И. В. Михайлова //Агрохимия. – 2009. – №. 6. – С. 61-66.
- 56 Евдокимова Г. А. Воздействие загрязнения почв дизельным топливом на растения и ризосферную микробиоту на Кольском Севере / Г. А. Евдокимова //Агрохимия. – 2007. – №. 12. – С. 49-55.
- 57 Маслобоев В. А. Биоремедиация загрязненных нефтепродуктами почв в субарктическом регионе / В. А. Маслобоев, Г. А. Евдокимова, Т. Г. Губкина, В. А. Мязин, Н. В. Фокина, К. В. Украинская //Проблемы безопасности и эффективности освоения георесурсов в современных условиях. – 2014. – С. 146-149
- 58 Звягинцев Д. Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии, МГУ //Москва. – 1991.
- 59 Воробьева Р. П. Экологическая оценка осадков сточных вод по влиянию на биологическую активность почвы / Р. П. Воробьева, А. С. Давыдов, Ю. С. Ананьева //Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2003. – Т. 12. – №. 4. – С. 53-60.
- 60 Anderson J. P. E. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils / J. P. E. Anderson, K. H. Domsch //Soil biology and biochemistry. – 1978. – Т. 10. – №. 3. – С. 215-221.
- 61 Degens B. P. Repeated wet-dry cycles do not accelerate the mineralization of organic C involved in the macro-aggregation of a sandy loam soil / B. P. Degens, G. P. Sparling //Plant and Soil. – 1995. – Т. 175. – С. 197-203.
- 62 Хазиев Ф. Х. Методы почвенной энзимологии. М.: Наука. 252 с. – 2005.
- 63 ГОСТ 28268-89 – 1990. Почвы. Методы определения влажности, максимальной гигроскопической влажности и влажности устойчивого

завядания растений: введ. впервые: дата введения 1990-06-01. М.: Стандартиформ, 2006. 8 с.

64 Masyagina O. V. Soil contamination by diesel fuel destabilizes the soil microbial pools: Insights from permafrost soil incubations / O. V. Masyagina //Environmental Pollution. – 2023. – Т. 323. – С. 121269.

65 Лоскутов Р. И. Интродукция декоративных древесных растений в южной части Средней Сибири / Р. И. Лоскутов //Красноярск: ИЛиД СО АН СССР. – 1991. 189 с.

66 Шишов Л. Л., Тонконогов, В. Д., Лебедева, М. И. Классификация и диагностика почв России. – 2004.

67 Xia M. Crude oil depletion by bacterial strains isolated from a petroleum hydrocarbon impacted solid waste management site in California / M. Xia //International Biodeterioration & Biodegradation. – 2017. – Т. 123. – С. 70-77.

68 Novakovskiy A. B. Long-term dynamics of plant communities after biological remediation of oil-contaminated soils in Far North / A. B. Novakovskiy, V. A. Kanev, M. Y. Markarova //Scientific Reports. – 2021. – Т. 11. – №. 1. – С. 1-12.

69 Almuharef, I. Enzymatic conversion of glycerol to 2, 3- Butanediol and acetoin by *Serratia proteamaculans* SRWQ1 / I. Almuharef, M. Rahman, W. Qin //Waste and Biomass Valorization. – 2019. – Т. 10. – №. 7. – С. 1833–1844.

70 Rojas-Avelizapa, N.G. Degradation of aromatic and asphaltenic fractions by *Serratia liquefaciens* and *Bacillus* sp. / N. G. Rojas-Avelizapa, E. Cervantes-Gonzalez, R. Cruz-Camarillo, L. I. Rojas-Avelizapa //Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. – 2002. – Т. 69. – №. 6. – С. 835–842.

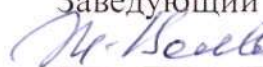
71 Radwan, S.S. Hydrocarbon utilization by nodule bacteria and plant growth-promoting rhizobacteria / S. S. Radwan, N. Dashti, I. El-Nemr, M. Khanafer //International Journal of Phytoremediation. – 2007. – Т. 9. – №. 6. – С. 475–486.

72 Sun, Y. Diversity and degradation characteristics of culturable oil-degrading bacteria in Antarctic soil / Y. Sun, K. Zhang, W. Gao, B. Han, L. Zheng //Huanjing Kexue Xuebao/Acta Scientiae Circumstantiae. – 2022. – T. 42. – №. 3. – C. 400–417.

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т. Г. Волова

« 27 » июня 2023 г.

## МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Влияние нефтепродуктов на микробиологическую активность почв севера  
Красноярского края

06.04.01 Биология

06.04.01.01. Микробиология и биотехнология

Руководитель



профессор, д.б.н

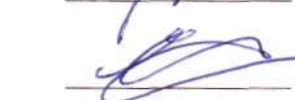
И. Д. Гродницкая

Выпускник



Е. В. Сиделева

Рецензент



доцент, к.б.н

С. Ю. Евграфова

Красноярск 2023