

На правах рукописи

ПАРХОМЕНКО АННА НИКОЛАЕВНА

**ВЛИЯНИЕ ЗАГРЯЗНЕНИЯ НЕФТЕПРОДУКТАМИ И СЕРОЙ
НА МИКРОФЛОРУ ПОЧВ АРИДНОЙ ЗОНЫ
(НА ПРИМЕРЕ АСТРАХАНСКОЙ ОБЛАСТИ)**

03.02.08 – экология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Уфа - 2011

Работа выполнена на кафедре «Прикладная биология и микробиология»
ФГОУ ВПО «Астраханский государственный технический университет»

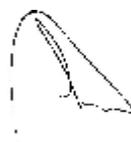
Научный руководитель	доктор биологических наук, профессор Сопрунова Ольга Борисовна
Официальные оппоненты	доктор биологических наук, профессор Кураков Александр Васильевич доктор биологических наук, профессор Хазиев Фангат Хаматович
Ведущая организация	ФГОУ ВПО «Калмыцкий государственный университет» (г. Элиста)

Защита диссертации состоится «25» февраля 2011 г. в 14.00. часов на заседании
Объединенного диссертационного совета ДМ 002.136.01 при Учреждении
Российской академии наук Институте биологии Уфимского научного центра
РАН по адресу: 450054, г. Уфа, Проспект Октября, 69, тел/факс: 8 (347) 235-53-
62, e-mail: ib@anrb.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Уфимского научного центра
Российской академии наук и на официальном сайте:
<http://www.anrb.ru/inbio/dissovet.html>.

Автореферат разослан « » января 2011 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент



Р.В. Уразгильдин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Основными природными ресурсами, в значительной степени определяющими потенциал социально-экономического развития Астраханской области в настоящее время, являются нефть и газ.

Деятельность, связанная с разведкой, добычей и транспортировкой нефти и газа приводит к загрязнению окружающей среды, в том числе и почв. На территории Астраханской области преобладают почвы, которые характеризуются невысоким плодородием, низкой гумусированностью, щелочной реакцией почвенного раствора, малой емкостью поглощения, что обусловлено почвообразованием в условиях недостаточного и неустойчивого увлажнения, высоких температур, наличия солей (Ежов, 1981).

Влияние предприятий нефтегазовой отрасли связано с выносом токсичных веществ при добыче, переработке, транспортировке сырья и продуктов переработки, которые могут влиять на почвенные экосистемы как локально (нефтебазы, расположенные в черте г. Астрахани), так и при переносе некоторых загрязнителей на значительные расстояния (Астраханский газовый комплекс (АГК)). При этом, длительное антропогенное влияние загрязняющих веществ оказывает неблагоприятное воздействие на формирование почвенных биоценозов, в том числе и микробных. Следует отметить, что исследования, касающиеся микробного населения почв Астраханской области, находящихся в зоне влияния предприятий нефтегазовой отрасли, малочисленны. В частности, микробиологические исследования почв АГК ограничиваются данными по численности и видовому составу микроорганизмов-деструкторов нефтяных углеводородов (Еремеева, 2000) и определением численности и биомассы микроорганизмов (бациллярные формы, микромицеты, стрептомицеты, актиномицеты) в грунтах, загрязненных отходами бурения (Андрианов, 2002). Исследована численность и биомасса бактерий, актиномицетов, грибов и водорослей бурых почв бэровских бугров Морозова, Карим, Большой Барфон (Сальникова, 2007).

Как правило, в практике экологического мониторинга для оценки степени воздействия и скорости самоочищения экосистем и почв, подвергающихся антропогенному влиянию, используются различные показатели. Так, оценка состояния объектов окружающей среды (почв и растительности) в районе АГК в рамках производственного экологического мониторинга дается на основе определения ПДК и ОДК химических веществ с определением токсичности почв методом биотестирования с помощью зеленых водорослей и дафний (Осипов, 2006). Тогда как оценка состояния и изменения почвенной биоты является одной из важнейших задач мониторинга почв в нефтегазовой отрасли, так как почвенные организмы являются наиболее чувствительными индикаторами изменения почвенно-экологических условий (Языков, 2003). Недостаточная изученность и неполное представление о происходящих в почвах изменениях могут

привести к глубоким, часто необратимым изменениям и в конечном итоге к деградации почвенных экосистем.

В связи с этим, комплексная оценка влияния загрязняющих веществ предприятий нефтегазовой отрасли на химические и микробиологические компоненты почв является достаточно актуальной.

Цель исследований. Изучение влияния загрязнения нефтепродуктами и серой на микрофлору почв Астраханской области.

Задачи исследований:

1. изучить химические параметры почв, находящихся в зоне влияния предприятий нефтегазовой отрасли;
2. изучить микробный пейзаж почв, испытывающих влияние загрязняющих веществ предприятий нефтегазовой отрасли;
3. провести сравнительный анализ влияния основных загрязняющих веществ (дизельное топливо и сера) на изменения химических и микробиологических показателей почвы при различных температурах;
4. провести интегральную оценку воздействия различных уровней загрязнения дизельным топливом и серой на химические и микробиологические показатели почвы.

Научная новизна работы. Впервые изучена микрофлора почв АГК и нефтебазы и выявлены основные морфологические (бактерии, грибы, дрожжи, актиномицеты) и физиологические (сапротрофные, аммонифицирующие, нитрифицирующие I и II фазы, денитрифицирующие, азотфиксирующие, сульфатредуцирующие, фосформинерализующие, маслянокислые, целлюлозоразрушающие) группы микроорганизмов.

Впервые по данным модельных исследований дана интегральная оценка воздействия различных уровней загрязнения дизельным топливом и серой на химические свойства и структуру микробного сообщества почв, определена зависимость этих показателей от температурных условий среды.

Практическая значимость. Полученные в результате исследований данные по влиянию загрязнения дизельным топливом и серой на почвенный микробиоценоз позволяют рекомендовать в качестве индикаторных групп микроорганизмов использовать группы нитрифицирующих микроорганизмов I фазы и актиномицетов. Исследования видового состава комплексов плесневых грибов и целлюлозолитиков могут быть предложены в качестве дополнительных критериев мониторинга состояния антропогенно нарушенных почв Астраханской области.

Внедрение результатов экспериментальных исследований в учебный процесс Института рыбного хозяйства, биологии и природопользования Астраханского государственного технического университета при написании учебно-методических пособий и проведении лабораторных и практических занятий по дисциплинам «Почвенная микробиология», «Большой практикум», «Биотехнология» подтверждено соответствующими актами.

Апробация работы. Материалы диссертации представлялись на: научных конференциях профессорско-преподавательского состава АГТУ (Астрахань, 2006-2010), 5-й международной научно-практической

конференции «Проблемы сохранения и рационального использования биоразнообразия Прикаспия и сопредельных регионов» (Элиста, 2006), 2-й международной научной конференции «Современные проблемы загрязнения почв» (Москва, 2007), международной научно-практической конференции «Фундаментальные аспекты биологии в решении актуальных экологических проблем», посвященной 100-летию со дня рождения К.В. Горбунова (Астрахань, 2008). На I открытой научно-практической конференции молодых работников Газопромыслового управления ООО «Газпромдобыча Астрахань» «Наука и молодежь в развитии газовой промышленности-2009» (Астрахань, 2009) работа отмечена дипломом I степени. Основные положения и материалы диссертационной работы обсуждались на расширенном межлабораторном семинаре Учреждения Российской академии наук Института биологии Уфимского научного центра РАН (Уфа, 2010). Результаты исследований также представлены в отчетах о научно-исследовательской работе «Особенности биоразнообразия природных экосистем Нижнего Поволжья» кафедры «Прикладная биология и микробиология» АГТУ (госбюджетные, промежуточный 2006 г. УДК 34.35.25, № г.р.01.2.006 05245; заключительный 2008 г. УДК 34.35.25, № г. р. 01200900158).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 работ, в том числе две в изданиях, входящих в перечень рекомендованных изданий ВАК РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 178 страницах машинописного текста, включает 14 таблиц и 32 рисунка. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, методической части, изложения результатов исследований и их обсуждения, выводов, списка литературы и приложений. Список литературы включает 157 источников отечественной и зарубежной литературы.

ВЛИЯНИЕ АНТРОПОГЕННЫХ ФАКТОРОВ НА МИКРОБИОЦЕНОЗЫ ПОЧВ (обзор литературы)

На основании анализа литературы рассматриваются особенности воздействия нефтяных углеводородов на свойства почвы (Пиковский, 1988; Гайнутдинов и др., 1988; Халимов и др., 1996; Кураков, Гузев, 2003) и развитие растений (Левин и др., 1989; Фахрутдинов, 2001). Особое внимание уделяется выявлению особенностей влияния различных концентраций нефти и нефтепродуктов на почвенные микроорганизмы (Гилязов, 1980; Звягинцев, 1989; Settl, Rossi, 1992) и специфику микрофлоры нефтезагрязненных почв (Билай, Коваль, 1980; Киреева, Рафикова, 2007; Rehmman et al., 1998). Приводятся данные о поступлении серы и серосодержащих веществ в окружающую среду (Почвенно-экологический мониторинг..., 1994; Абросимов, 2002). Описаны особенности изменения свойств почвы (Bache, 1980; Розанов, 1990), количественных и качественных характеристик

микробных сообществ почв под влиянием закисления (Марфенина, 1991; Григорьев, Горленко, Марфенина, 2004).

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводились на базе кафедры прикладной биологии и микробиологии Астраханского государственного технического университета в течение 2004-2009 гг. Объектами исследований являлись почвы: бурые полупустынные песчаные, отобранные в зоне влияния Астраханского газового комплекса (АГК), и светло-каштановые, отобранные на территории нефтебазы №5, расположенной в черте г. Астрахани, где длительное время производилось хранение и транспортировка углеводородного сырья.

Отбор проб почвы производился в соответствии с требованиями ГОСТ 28168-99 (Практикум по агрохимии, 2001) из горизонта A_{max} с глубины 0-30 см.

Изучение влияния антропогенных воздействий (дизельное топливо, сера) при различных температурах (+5 °С и +30 °С) на структуру и функционирование микробных сообществ в почве проводили в модельных опытах в течение 20 недель с использованием стеклянных сосудов (эксикаторов), масса почвы в которых составила 5,0 кг, высота слоя почвы 30 см.

В качестве загрязняющих веществ вносили дизельное топливо (ДТ) в концентрациях (г/кг): 2,5 (0,3 %); 25 (3,0 %); 83 (10,0 %) и химически чистую серу из расчета (мг/кг почвы): 16,0 (0,1 ПДК); 100,0 (0,6 ПДК); 500,0 (3 ПДК). Контролем служила незагрязненная почва.

Агрохимические анализы почв проводили по общепринятым методам: рН солевой вытяжки (ГОСТ 26483-85); гидролитическую кислотность (ГОСТ 26212-91); обменную кислотность (ГОСТ 26484-85); сумму поглощенных оснований (Практикум по агрохимии, 2001); степень насыщенности почвы основаниями; плотный остаток вытяжки (Практикум по агрохимии, 2001); содержание ионов карбоната и бикарбоната (ГОСТ 26424-85), ионов хлора (ГОСТ 26425-85), ионов сульфата (ГОСТ 26426-85); азот нитратный (ГОСТ 26488-85), аммонийный; общий фосфор (Практикум по агрохимии, 2001); сумму обменных оснований (кальций и магний) по ГОСТ 26428-85.

Определение содержания нефтяных углеводородов в почве проводили согласно методике выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в пробах почв флуориметрическим методом (ПНД Ф 16.1.21-98; Другов, 2000).

Выделение и учет численности микроорганизмов различных физиологических групп из почв, отобранных в зоне влияния АГК и нефтебазы, и почв, используемых в модельных опытах, проводили методом предельных разведений с последующим высевом на жидкие и плотные питательные среды: рыбо-пептонный бульон (РПБ) для аммонификаторов; среду Виноградского для нитрификаторов; Гильтая для денитрифицирующих; Эшби – азотфиксирующих микроорганизмов рода *Azotobacter*; Таусона - сульфатредуцирующих; Муромцева - фосфатминерализующих; элективную среду Виноградского - маслянокислых;

Омелянского - аэробных целлюлозоразрушающих; Имшенецкого - анаэробных целлюлозоразрушающих (Наплекова, 1974; Ежов, 1981; Муромцев, 1985; Звягинцев, 1991; Практикум по биологии почв, 2002; Нетрусов, 2005). Выделение и учет плесневых грибов, дрожжей и актиномицетов осуществляли на агарах Чапека, Сабуро, крахмало-казеиновом (Семенов, 1990; Практикум по биологии почв, 2002). Относительная численность, позволяющая отделить влияние сопутствующих факторов от влияния поллютанта, рассчитывалась как отношение численности микроорганизмов в загрязненной и контрольной почвах (Киреева, 2000). Для характеристики комплексов микроскопических грибов использовали показатель относительного обилия видов (Мирчинк, 1985; Звягинцев, 1991).

На основании концепции строения и функционирования комплекса почвенных микроорганизмов (Звягинцев, 1987) определили микробный пул, или фоновое содержание микроорганизмов; минимальные значения численности (a_{\min}), емкость почвенной среды, или максимальные показатели численности микроорганизмов за исследуемый период (a_{\max}); амплитуду их колебаний ($a_{\max} - a_{\min}$), характеризующую потенциальную способность экосистемы сохранять равновесие при изменяющихся внешних воздействиях.

Идентификацию микроорганизмов проводили по культурально-морфологическим свойствам, используя Определитель бактерий Берджи Дж. Хоулта и др. (1997). Определение видового состава комплекса плесневых грибов проводили по микологическим определителям (Пидопличко, 1972; Билай, Коваль, 1988; Саттон, 2001), актиномицетов - Гаузе и др. (1983).

Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась с помощью программ STATISTICA v. 6.0 for Windows и Microsoft Excel, Clusters3.xls for Windows методами корреляционного, регрессионного (Боровиков, 1998) и кластерного анализа (Воробьев, 2006).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Химические и микробиологические показатели почв в зоне влияния АГК

В рамках производственного экологического мониторинга АГК систематические наблюдения за состоянием почв и растительности ведутся на 56 стационарных площадках, охватывающих зону до 60 км с учетом расположения промобъектов и розы ветров (Осипов, 2006).

Для проведения исследований почвы отобрали на стационарных площадках в районе скважин АГКМ и в зоне АГХК в двух горизонтах (0-5 см и 10-30 см) (табл. 1).

На основании полученных данных установлено, что исследуемые почвы обладают щелочной реакцией среды (рН 9,1-9,2). Содержат незначительные количества фосфора (0,0021-0,0034 % от массы почвы) и азота (0,00011-0,0006 %); характеризуются низкой гумусированностью и содержат незначительное количество органических веществ (0,12-0,37 %); по типу засоления относятся в основном к карбонатно-хлоридно-кальциевым.

Таблица 1

Обозначение почвенных образцов отобранных для экспериментальных исследований

№ варианта в эксперименте	Точка отбора почв	Место отбора пробы относительно ГПЗ	Удаленность от ГПЗ, км
в районе АГКМ			
6	скв. 93	северо-запад	4,5
4	скв. 65Д	северо-запад	6,5
5	скв. 8Э	северо-запад	7,0
3	УППГ 6	юго-восток	9,0
в зоне АГХК			
1	№ 2	запад	6,0
2	№ 10	юго-восток	7,0
7	№ 3	северо-запад	10,0

Общее микробное число почвы (ОМЧ) для всех образцов составило 10^6 - 10^7 КОЕ/г.

При изучении микробного пейзажа почв, отобранных в зоне влияния АГК из горизонтов 0-5 и 10-30 см, выявлены различные физиологические и морфологические группы микроорганизмов (табл. 2).

Таблица 2

Численность микроорганизмов в почвах АГК (данные 2007 г.)

Группы микроорганизмов	Численность микроорганизмов в исследуемых почвенных образцах, КОЕ/г						
	№ 2 (точка 1)	№ 10 (точка 2)	УППГ 6 (точка 3)	Скв.65Д (точка 4)	Скв. 8Э (точка 5)	Скв. 93 (точка 6)	№ 3 (точка 7)
Сапротрофные	$\frac{10^7}{10^6}$	$\frac{10^7}{10^6}$	$\frac{10^7}{10^7}$	$\frac{10^7}{10^7}$	$\frac{10^6}{10^6}$	$\frac{10^6}{10^6}$	$\frac{10^6}{10^6}$
Аммонифицирующие	$\frac{10^7}{10^4}$	$\frac{10^4}{10^1}$	$\frac{10^7}{10^5}$	$\frac{10^4}{10^2}$	$\frac{10^6}{10^3}$	$\frac{10^5}{10^3}$	$\frac{10^5}{10^2}$
Нитрифицирующие I фазы	$\frac{10^2}{10^2}$	$\frac{10^1}{10^1}$	$\frac{\text{ед. кл.}}{10^1}$	$\frac{\text{ед. кл.}}{\text{ед. кл.}}$	$\frac{10^2}{10^2}$	$\frac{\text{ед. кл.}}{\text{ед. кл.}}$	$\frac{10^1}{10^1}$
Нитрифицирующие II фазы	$\frac{10^2}{10^2}$	$\frac{10^2}{10^1}$	$\frac{10^1}{10^1}$	$\frac{\text{ед. кл.}}{\text{ед. кл.}}$	$\frac{10^1}{10^2}$	$\frac{\text{ед. кл.}}{\text{ед. кл.}}$	$\frac{\text{ед. кл.}}{10^1}$
Денитрифицирующие	$\frac{\text{ед. кл.}}{\text{ед. кл.}}$	$\frac{10^2}{10^2}$	$\frac{\text{ед. кл.}}{\text{ед. кл.}}$	$\frac{10^2}{\text{ед. кл.}}$	$\frac{\text{ед. кл.}}{10^2}$	$\frac{\text{ед. кл.}}{\text{ед. кл.}}$	$\frac{10^2}{\text{ед. кл.}}$
Азотфиксирующие	$\frac{10^2}{10^3}$	$\frac{10^3}{10^2}$	$\frac{10^3}{10^2}$	$\frac{10^2}{10^2}$	$\frac{10^2}{10^2}$	$\frac{10^2}{10^2}$	$\frac{10^2}{10^3}$
Сульфатредуцирующие	$\frac{10^1}{10^2}$	$\frac{10^1}{10^2}$	$\frac{10^1}{10^2}$	$\frac{10^1}{10^2}$	$\frac{10^2}{10^2}$	$\frac{10^1}{10^2}$	$\frac{10^1}{10^2}$
Фосформинерализующие	$\frac{10^5}{10^4}$	$\frac{10^5}{10^4}$	$\frac{10^5}{10^4}$	$\frac{10^5}{10^4}$	$\frac{10^5}{10^4}$	$\frac{10^5}{10^4}$	$\frac{10^5}{10^4}$
Плесневые грибы	$\frac{10^2}{10^2}$	$\frac{10^3}{10^4}$	$\frac{10^3}{10^2}$	$\frac{10^3}{10^2}$	$\frac{10^3}{10^2}$	$\frac{10^3}{10^2}$	$\frac{10^3}{10^2}$
Дрожжи	$\frac{10^2}{10^3}$	$\frac{10^4}{10^3}$	$\frac{10^2}{10^2}$	$\frac{10^3}{10^2}$	$\frac{10^3}{10^2}$	$\frac{10^3}{10^2}$	$\frac{10^3}{10^2}$
Актиномицеты	$\frac{10^5}{10^4}$	$\frac{10^5}{10^4}$	$\frac{10^4}{10^4}$	$\frac{10^3}{10^2}$	$\frac{10^4}{10^3}$	$\frac{10^3}{10^3}$	$\frac{10^4}{10^3}$

* в числителе – в горизонте почвы 0-5 см, в знаменателе – 10-30 см

В целом в горизонте 10-30 см отмечено снижение численности аэробных микроорганизмов (табл. 2), связанное, вероятно, с более низким содержанием кислорода и гумуса в более глубоких горизонтах исследуемой почвы.

Установлено, что микрофлора почв за исследуемый период (2004-2007 гг.) испытывает возрастание антропогенной нагрузки, что проявляется в снижении численности аммонифицирующих микроорганизмов на 2 порядка, нитрифицирующих и денитрифицирующих – в среднем на 4 порядка (до ед. клеток) (табл. 2, рис. 1).

Наиболее чувствительными к воздействию антропогенной нагрузки оказались микроорганизмы круговорота азота, а именно - нитрификаторы I и II фазы, т.к. по мере приближения к источнику основного загрязнения их численность в исследуемых почвах снижается в среднем на 1-3 порядка (до ед. клеток).

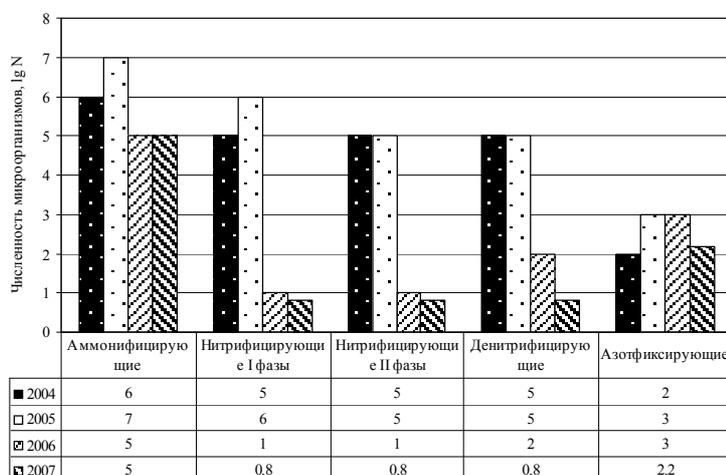


Рис. 1. Динамика численности микроорганизмов круговорота азота (усредненные данные) в почве АГК (2004-2007 гг.)

Кластеризация по уровню сходства (евклидову расстоянию) выявила три кластера (рис. 2): в 1-й, 2-й, 3-й вошли почвы, отобранные в районе эксплуатационных скважин АГКМ, а вариант № 7 – почва, отобранная в зоне установок предварительной подготовки газа (УППГ) в точке, наиболее удаленной от ГПЗ (10 км).

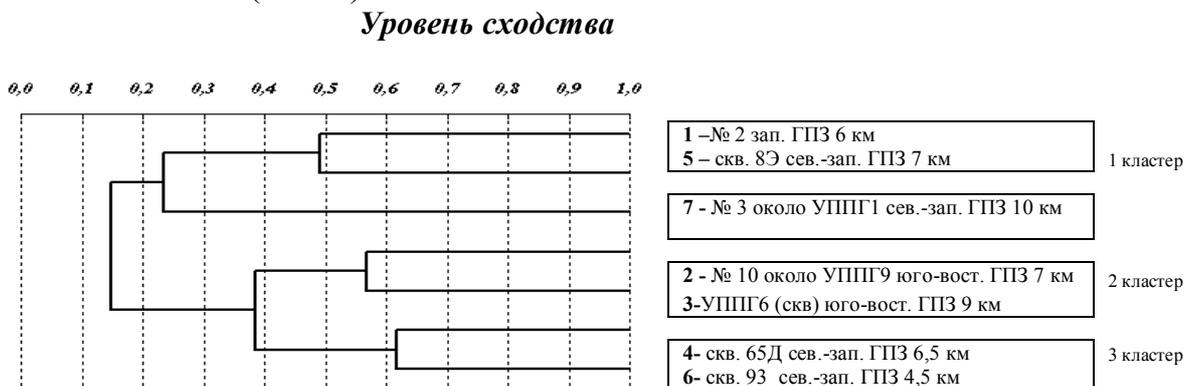


Рис. 2. Группировка отобранных образцов почв по комплексу химических и микробиологических параметров

Следовательно, сходство химических и микробиологических процессов в исследуемых почвах зависит от удаленности места отбора проб от основного источника загрязнения.

Химические и микробиологические показатели почв нефтебазы

Образцы почвы, отобранные на территории нефтебазы, значительно отличались по содержанию нефтяных углеводородов: наибольшая концентрация (116000 мг/кг) обнаружена в образцах почвогрунтов, отобранных непосредственно в местах хранения нефтепродуктов (около цистерн), достаточно высокие концентрации наблюдались также в пробах почв, отобранных около трубопровода (6000 мг/кг) и железнодорожных путей (9600 мг/кг). В пробах почвы, отобранных в 500 м от резервуаров, нефтяных углеводородов не обнаружено.

В результате исследований установлено, что почвенные образцы в целом обладают нейтральной и слабощелочной реакцией среды (рН 6,4-8,3). Содержат незначительные количества азота (0,05-0,07 %), содержание фосфора варьировало от 0,0095 до 0,165 %; по типу засоления относятся в основном к карбонатно-сульфатно-кальциевым. Содержание суммарной органики колеблется в широких пределах - от 1,67 до 22,86 % и зависит от удаленности места отбора проб от основных источников загрязнения.

Общее микробное число почвы (ОМЧ), содержащей 760-116000 мг НУ/кг почвы, составило в среднем 10^7 - 10^8 КОЕ/г (табл. 3).

Таблица 3

Численность физиологических групп микроорганизмов в пробах почв и почвогрунтов нефтебазы

Группы микроорганизмов	Численность микроорганизмов в исследуемых образцах почвы, КОЕ/г				
	около цистерн с НП (точка 1)	около ж/д путей (точка 2)	около трубопровода (точка 3)	200 м от эстакады (точка 4)	500 м от резервуаров (точка 5)
Сапротрофные	$6,8 \cdot 10^8$	10^7	10^7	10^7	$3 \cdot 10^7$
Аммонифицирующие	10^4	10^6	10^4	10^4	10^4
Нитрифицирующие I фазы	10^5	10^4	10^4	10^3	10^5
Нитрифицирующие II фазы	ед.кл.	ед.кл.	ед.кл.	10^2	10^3
Денитрифицирующие	10^5	10^5	10^5	10^4	10^2
Азотфиксирующие	$4 \cdot 10^2$	$4 \cdot 10^2$	$4,8 \cdot 10^2$	$1,6 \cdot 10^3$	$4,8 \cdot 10^2$
Фосформинерализующие	10^6	$7,6 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^6$	10^4	$2,1 \cdot 10^5$
Целлюлозоразрушающие	10^3	10^1	10^1	10^3	ед.кл.
Маслянокислые	10^3	10^4	10^5	10^3	10^3

Анализ количественного состава микрофлоры показал, что в почвах, сильно загрязненных нефтяными углеводородами (6000-116000 мг/кг), физиологические группы микроорганизмов ранжируются по убыванию

численности следующим образом (КОЕ/г): фосформинерализующие (10^5 - 10^6) > денитрифицирующие (10^5) > аммонифицирующие (10^4 - 10^6) > нитрифицирующие I фазы (10^4 - 10^5) > маслянокислые (10^3 - 10^5) > азотфиксирующие (10^2) > целлюлозоразрушающие (10^1 - 10^3) > нитрифицирующие II фазы (ед. клетки).

Наиболее чувствительной группой почвенных микроорганизмов к воздействию нефтяных углеводородов являются микроорганизмы круговорота азота: даже при незначительном содержании загрязнителя (760 мг/кг) численность нитрифицирующих микроорганизмов II фазы снижается на 1 порядок, денитрифицирующих - увеличивается на 2 порядка.

Кластерный анализ показал наличие двух групп вариантов (рис. 3): в первую (максимальный уровень сходства) вошли варианты с превышением ОДК нефтяных углеводородов в 6-116 раз; во 2-ю – варианты, для которых содержание НУ не обнаружено или их концентрация не превышает ОДК (760 мг/кг). Следовательно, удаленность места отбора проб от основного источника загрязнения является одним из значимых факторов, определяющих экологическое состояние почвенных экосистем на территории нефтебазы.



Рис. 3. Группировка отобранных образцов почв по комплексу химических и микробиологических параметров

Таким образом, при исследовании почв, длительное время испытывающих антропогенный пресс, установлено, что в почвах, прилегающих к АГК по мере приближения к территории ГПЗ увеличивается концентрация ионов хлора (42,55-59,57 мг/кг) и кальция (125,25-200,4 мг/кг), снижается содержание сульфат-ионов (10,0-60,0 мг/кг) и азота (0,00011-0,0006 %); в почвах на территории нефтебазы содержание НУ в местах хранения достигает 116 ОДК, транспортировки – 9,6 ОДК, перегрузки – 6 ОДК. В почвах АГК и нефтебазы, по мере приближения к основным источникам загрязнения, отмечено снижение численности нитрифицирующих микроорганизмов I и II фазы до ед. клеток. Однако исследования показали, что длительное антропогенное воздействие не приводит к полному подавлению функционирования почвенных микроорганизмов.

Для более полного понимания изменений, происходящих в почвах под воздействием дизельного топлива и серы (одни из наиболее значимых загрязнителей), осуществили постановку модельных опытов на основе светло-каштановой почвы, обладающей высоким плодородием и активно используемой в сельском хозяйстве на территории Астраханской области. Почва, используемая в эксперименте, отобрана вне зоны влияния промышленных предприятий. Отслеживание происходящих процессов в ходе экспозиции почв в модельных опытах осуществляли по химическим и микробиологическим показателям.

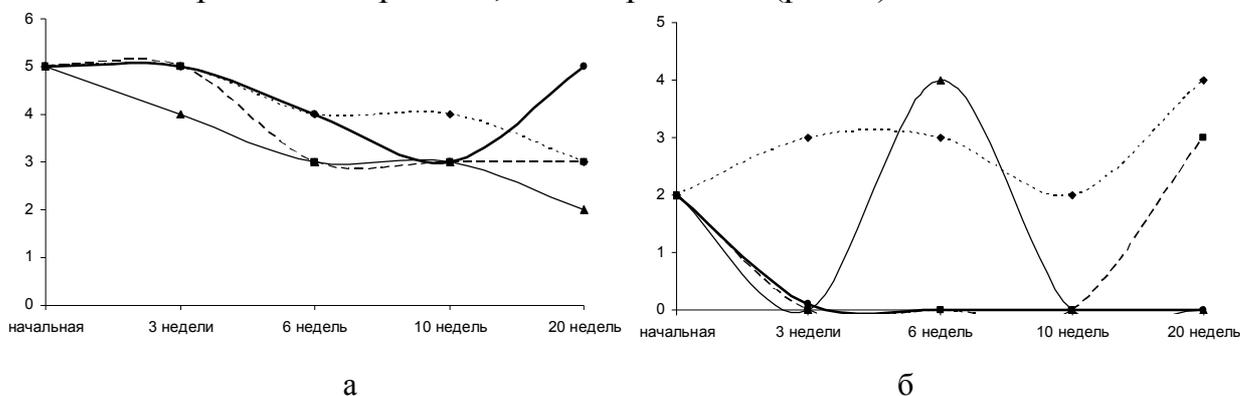
Оценка состояния почв в модельных опытах с внесением нефтяных углеводородов

Почва, используемая в эксперименте, обладает нейтральной реакцией среды (рН 7,0), содержит большое количество соединений азота (нитратного - 1,72; аммонийного - 9,07 мг/100 г) и фосфора (0,14 %).

В ходе экспозиции почв в модельных опытах установлено, что в почвах с внесением ДТ при температуре 30 °С обменная кислотность и содержание ионов карбонатов и бикарбонатов увеличиваются в 1,5-3,0 раза, повышается общая щелочность почв, тогда как при 5 °С содержание ионов хлора и сульфата снижается в 1,5 раза.

Численность микроорганизмов в отобранной для исследований почве составила (КОЕ/г): сапротрофы – 10^7 ; фосформинерализующие – 10^5 ; аммонифицирующие – 10^5 ; нитрифицирующие I и II фазы – 10^3 ; денитрифицирующие – ед. клетки; азотфиксирующие – 10^2 ; актиномицеты – 10^5 ; плесневые грибы – 10^2 ; дрожжи – 10^2 .

При определении микробного пула, емкости почвенной среды и амплитуды колебаний установлено, что устойчивость к внесению ДТ проявляют бактерии и дрожжи (за исключением варианта с 10 % ДТ при 30 °С), чувствительность - плесневые грибы и актиномицеты. При этом установлено, что внесение ДТ оказывает отрицательное влияние на численность морфологических групп микроорганизмов, особенно проявляющееся для актиномицетов при 30 °С, почвенных дрожжей при 5 °С, плесневых грибов как при 5 °С, так и при 30 °С (рис. 4).



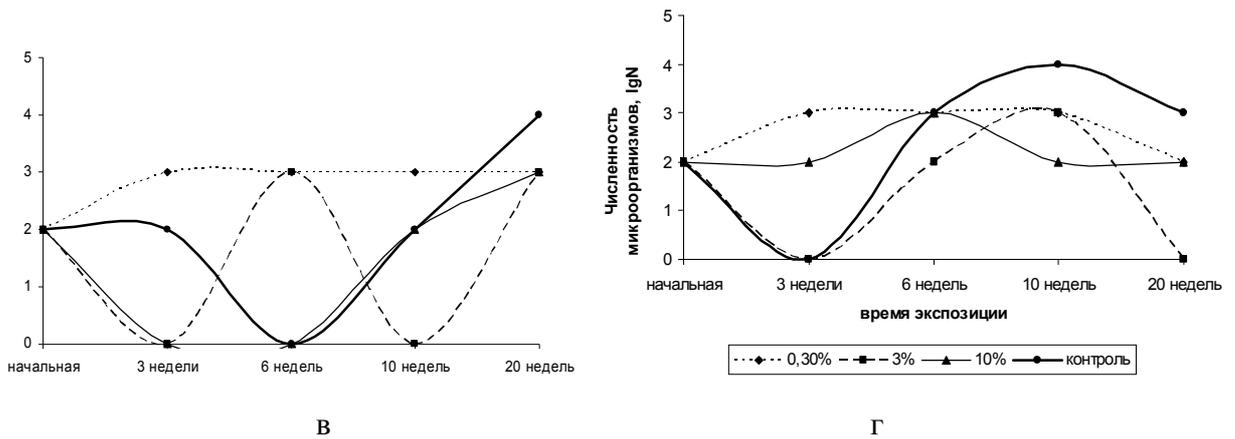


Рис. 4. Динамика численности морфологических групп микроорганизмов в вариантах модельных опытов с внесением ДТ: а) актиномицетов при 30 °С; б) дрожжей при 5 °С; в) г) плесневых грибов при 5 °С и 30 °С

Кроме этого, ДТ вызывает существенные изменения в составе комплекса плесневых грибов: на 20-й неделе экспериментальных исследований в выделяемой микобиоте в вариантах с внесением ДТ преобладают представители *p. Penicillium* (рис. 5), причем их обилие (%) коррелирует с увеличением концентрации ДТ (0,3 - 66,8; 3,0 - 83,3; 10,0 - 100,0). Тогда как на начальном этапе исследований в почвах отмечено присутствие *Mucor sp.* и *A. niger*.

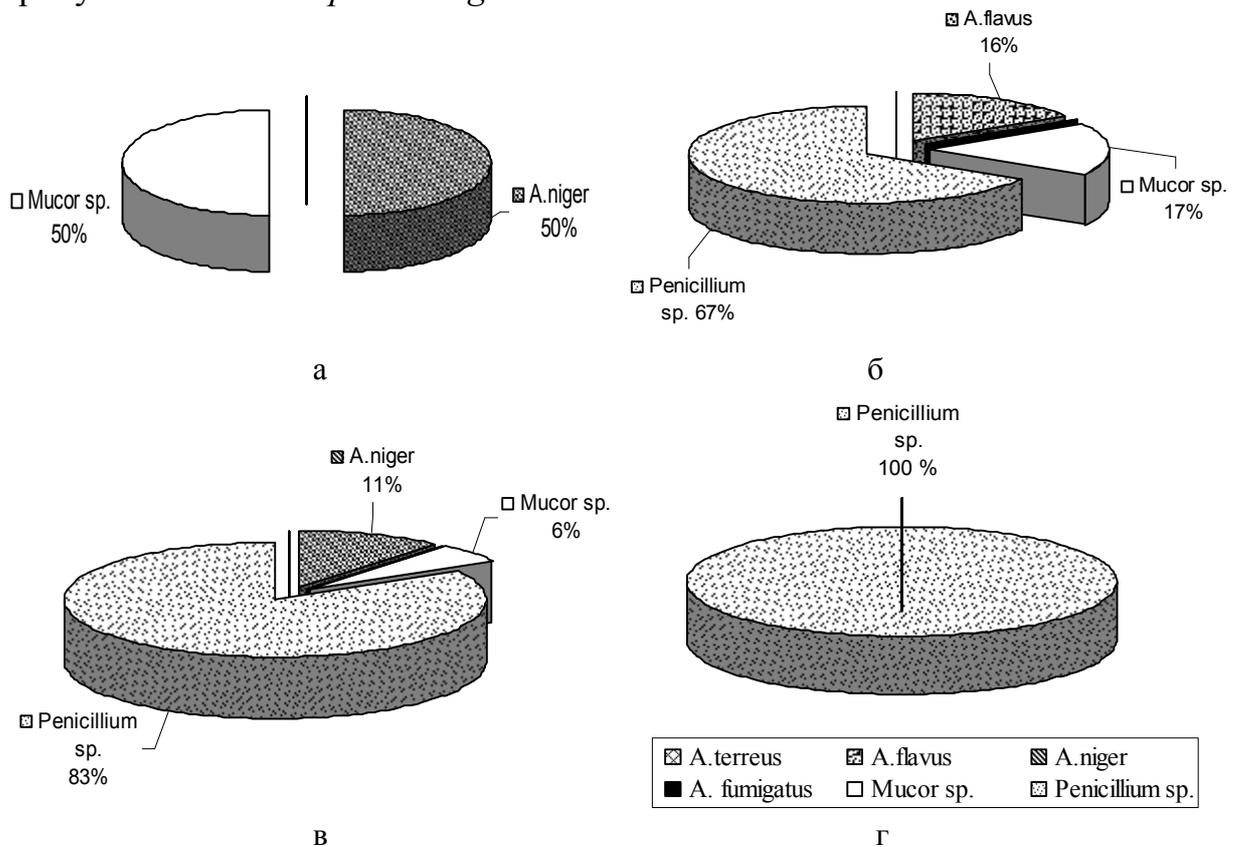


Рис. 5. Обилие плесневых грибов в вариантах модельных опытов с внесением ДТ через 20 недель эксперимента: а – исходная почва; б - 0,3 %; в - 3 %; г - 10 %

При температуре 5 °С сапротрофные и фосформинерализующие микроорганизмы реагируют на внесение 0,3 и 3,0 % ДТ значительным

снижением численности в течение первых 3-х и 6-ти недель экспонирования; тогда как 10 % ДТ не оказывает существенного влияния на данные группы микроорганизмов (рис. 6).

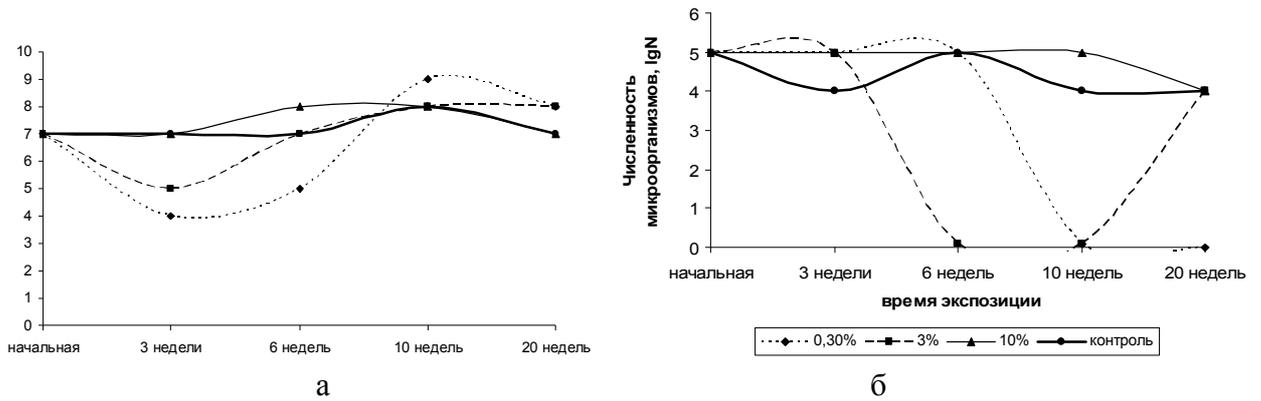
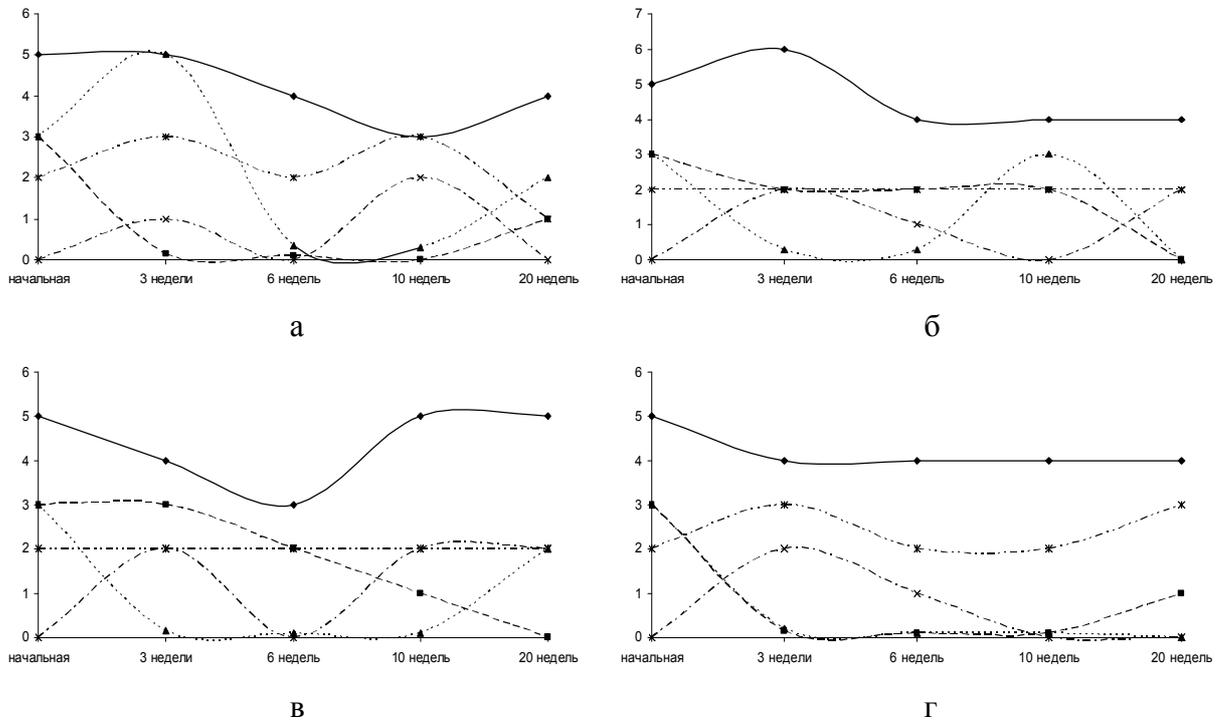


Рис. 6. Динамика численности микроорганизмов в вариантах модельных опытов с внесением ДТ, экспонировавшихся при температуре 5 °С: а) сапротрофных; б) фосформинерализующих

Кроме этого, при внесении 3,0 и 10 % ДТ отмечено снижение численности аммонификаторов до 10^3 - 10^4 КОЕ/г при 30 °С, нитрификаторов до ед. клеток, что свидетельствует о чувствительности данной группы микроорганизмов круговорота азота к углеводородному загрязнению. Внесение ДТ в концентрации 10 % способствует развитию денитрифицирующих и ингибированию азотфиксирующих микроорганизмов (рис. 7).



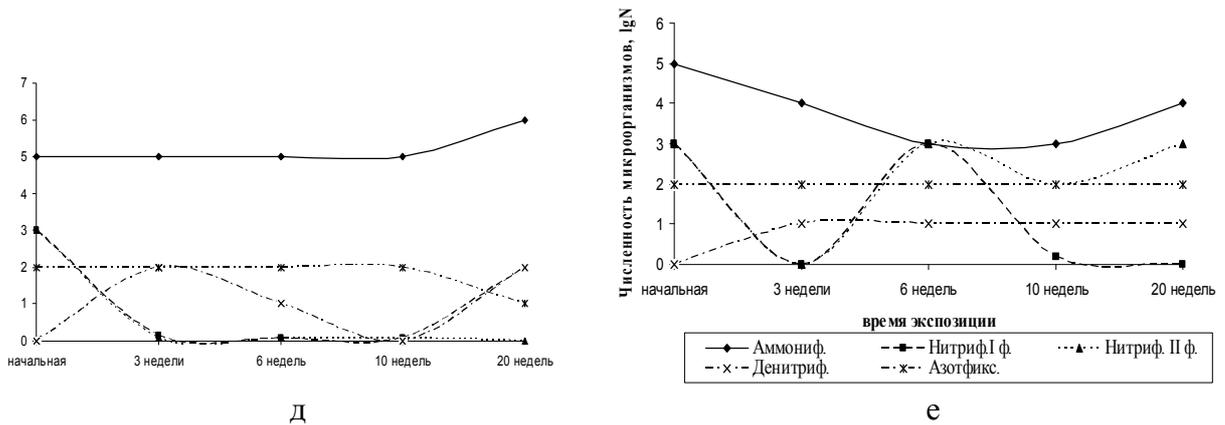


Рис. 7. Динамика численности микроорганизмов круговорота азота в вариантах модельных опытов с внесением ДТ (а, б - 0,3 %; в, г - 3 %; д, е - 10 %) при температуре: а, в, д - 5 °С; б, г, е - 30 °С

Сульфатредуцирующие микроорганизмы проявляют чувствительность к внесению ДТ, так как не обнаруживаются в вариантах модельных опытов с различными концентрациями ДТ.

По результатам экспериментальных данных определены корреляционные зависимости между численностью микроорганизмов и химическими показателями, отражающими влияние ДТ на микробиоценозы в исследуемых почвах в модельных опытах. Так, именно при внесении ДТ (по сравнению с контрольной почвой) отмечены отрицательные корреляционные взаимосвязи: для численности сапротрофов и содержанием ионов хлора ($r = -0,6578-0,8018$); актиномицетов ($r = -0,5613-0,8899$) и нитрификаторов I фазы ($r = -0,6001-0,8796$) к концентрациям ионов карбоната; плесневых грибов ($r = -0,0136-0,5011$) и нитрификаторов I фазы ($r = -0,375-0,7905$) к изменениям pH.

Положительные корреляционные взаимосвязи при внесении ДТ (по сравнению с контрольной почвой) установлены между содержанием сульфат-ионов и численностью фосформинерализующих микроорганизмов ($r=0,2049-0,8067$) и нитрификаторов I фазы ($r = 0,6516-0,9323$); гидролитической кислотностью ($r=0,9299-0,9682$) и численностью фосформинерализующих микроорганизмов.

Регрессионный анализ позволил установить, что при превышении 10 %-ной концентрации ДТ, вносимой в почву, прогностически можно предположить дальнейшее увеличение численности сапротрофных ($B_1 = -5,71-15,0$; $R^2 = 0,17-0,64$) и снижение численности фосформинерализующих микроорганизмов ($B_1 = +200,0-400,0$; $R^2 = 0,16-0,93$), нитрификаторов I фазы ($B_1 = +918,1-1904,7$; $R^2 = 0,42-0,86$) и актиномицетов ($B_1 = -1693,5-3252,8$; $R^2 = 0,31-0,79$).

Влияние серы на химические и микробиологические показатели почв в модельных опытах

В ходе экспозиции почв в модельных опытах с внесением серы при температуре 30 °С в 1,5-3 раза увеличивается обменная кислотность;

повышается общая щелочность почв, увеличивается содержание ионов сульфата (в 1,5 раза), карбонатов и бикарбонатов (в 2-3 раза), тогда как содержание ионов хлора снижается в 1,5 раза, нитратного азота - в 2 раза. При температуре 5 °С отмечено снижение рН и обменной кислотности в 2 раза.

При определении микробного пула, емкости почвенной среды и амплитуды колебаний установлено, что среди морфологических групп микроорганизмов устойчивость к внесению серы проявляют бактерии и дрожжи, чувствительность - плесневые грибы и актиномицеты.

Значительное негативное влияние серы установлено при температуре 5 °С для почвенных дрожжей, для актиномицетов - при 30 °С в первые 6 недель экспозиции (рис. 8).

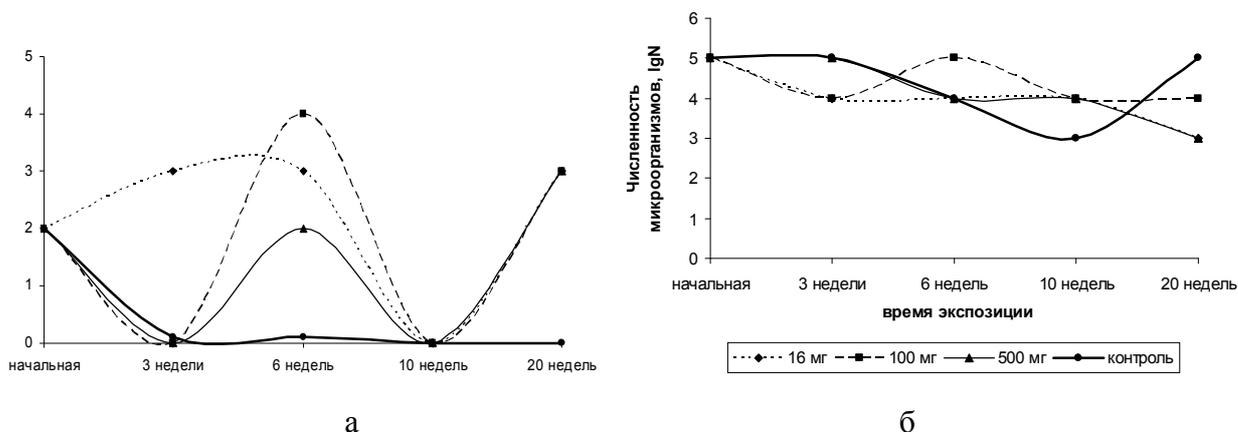


Рис. 8. Динамика численности микроорганизмов в вариантах модельных опытов с внесением серы: а) дрожжей при 5 °С; б) актиномицетов при 30 °С

Серa в концентрациях, превышающих ПДК в 3 раза, как при 5 °С, так и при 30 °С оказывает влияние на развитие плесневых грибов (рис. 9).

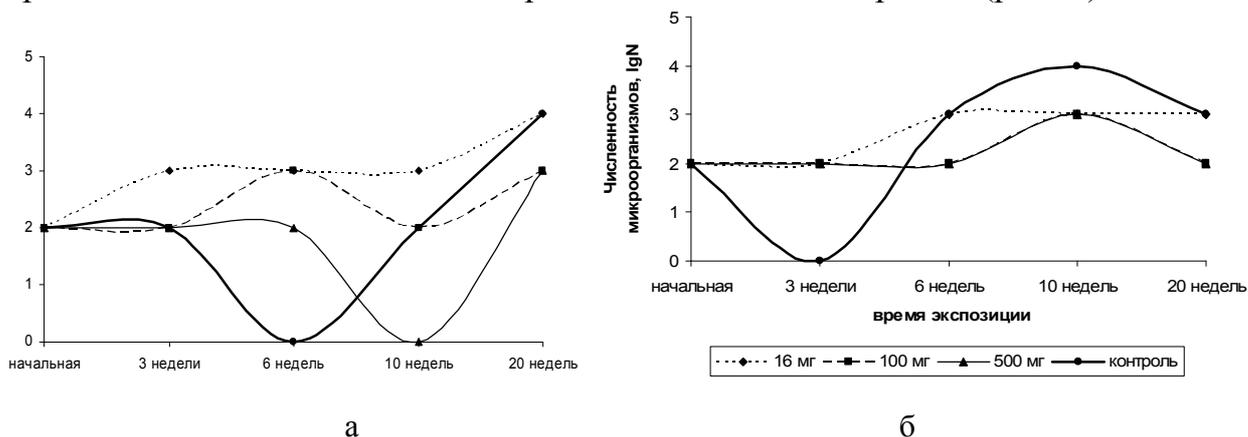


Рис. 9. Динамика численности плесневых грибов в вариантах модельных опытов с внесением серы, экспонированных при температуре: а) 5 °С; б) 30 °С

При этом происходит перестройка в комплексе микромицетов: в загрязненной почве появляются виды, не встречающиеся на начальном этапе исследования (*Penicillium sp.*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. fumigatus*) (рис. 10). Кроме этого, при внесении серы увеличивается число видов плесневых

грибов: *Trichoderma sp.*, *Penicillium sp.*, *Cladosporium sp.*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. fumigatus*.

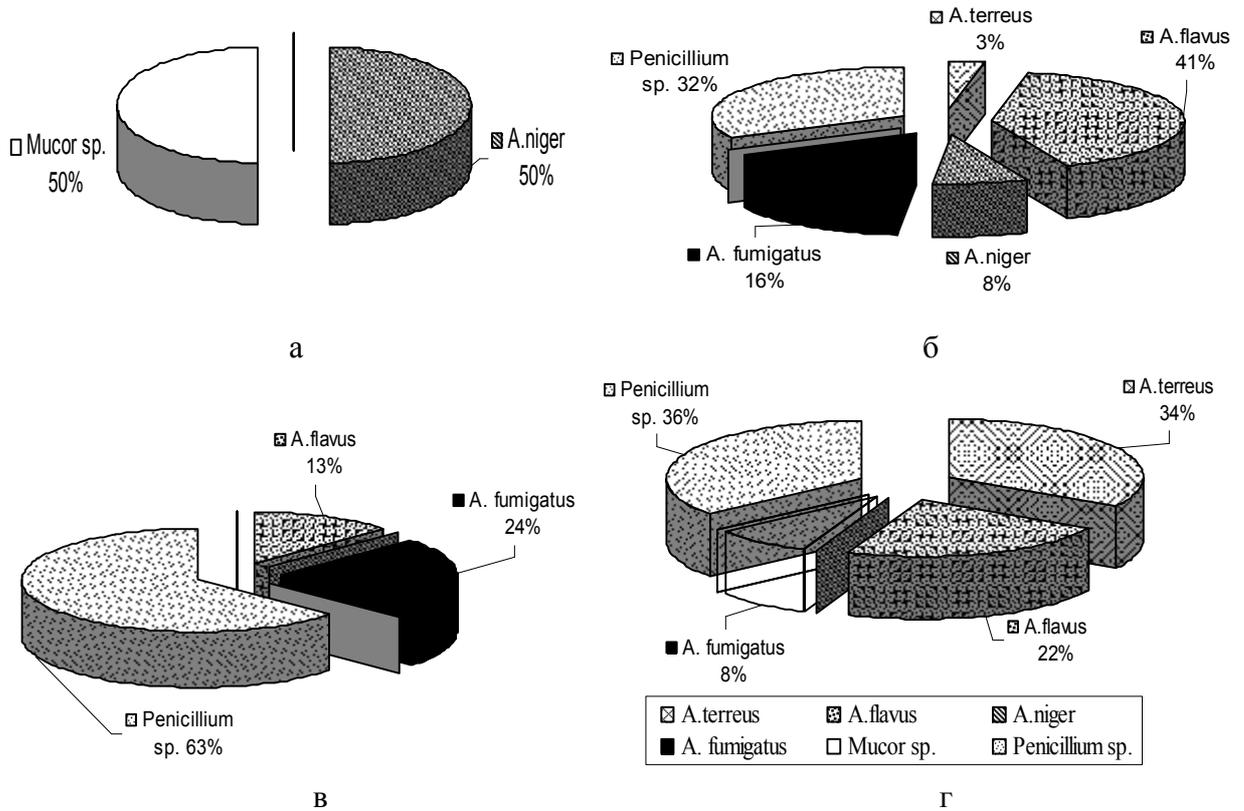


Рис. 10. Обилие плесневых грибов в вариантах модельных опытов с внесением серы при 5 °С, %: а - исходная почва; б - 16 мг/кг; в - 100 мг/кг; г - 500 мг/кг

Внесение серы практически не оказывает существенного влияния на численность сапротрофных микроорганизмов в почвах и вызывает значительное снижение численности фосформинерализующих микроорганизмов (рис. 11).

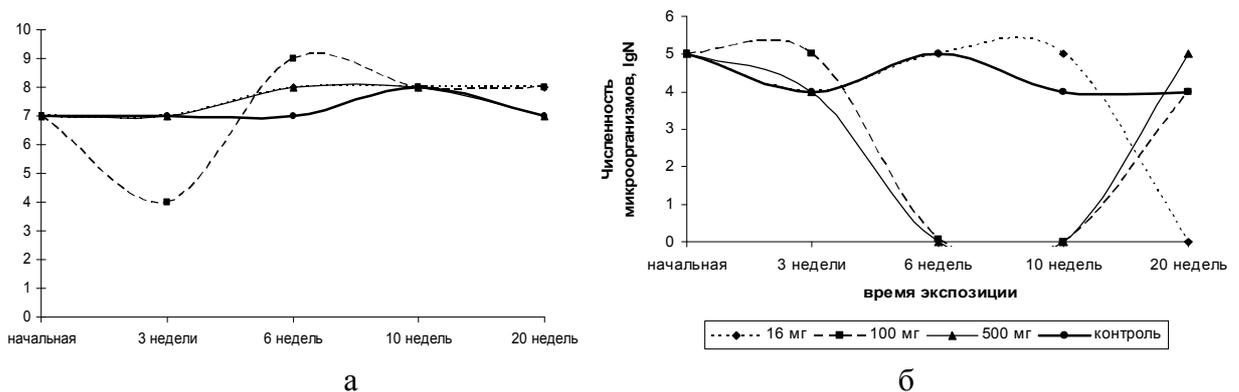


Рис. 11. Динамика численности микроорганизмов в вариантах модельных опытов с внесением серы, экспонированных при температуре 5 °С: а) сапротрофных; б) фосформинерализующих

При внесении серы отмечено снижение численности аммонифицирующих микроорганизмов до $10^4 - 10^5$, нитрификаторов I и II фазы - до единичных клеток/г, ингибирование денитрифицирующих и развитие азотфиксирующих микроорганизмов (рис. 12).

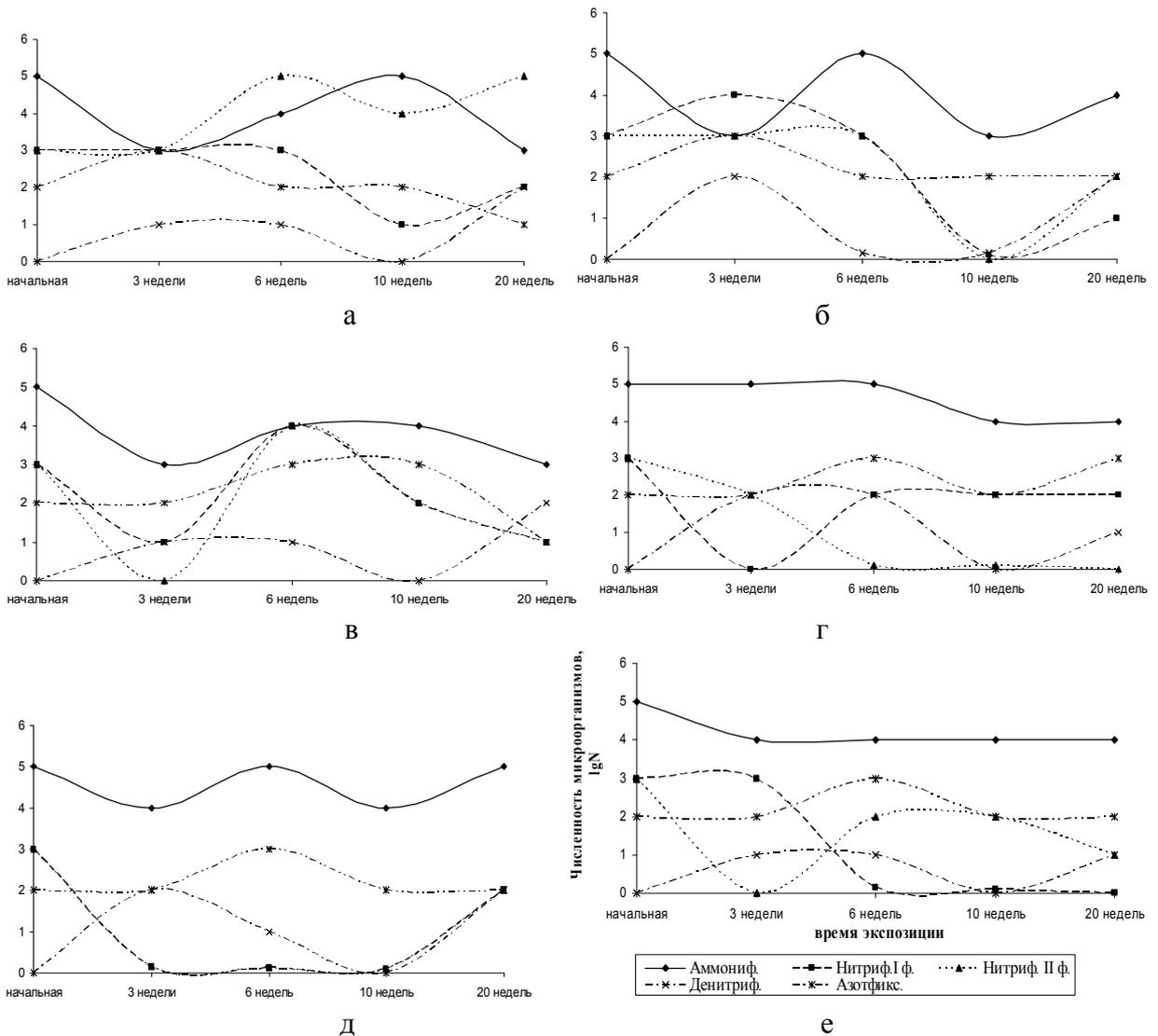


Рис. 12. Динамика численности микроорганизмов круговорота азота в вариантах модельных опытов с внесением серы (а, б – 16 мг/кг; в, г – 100 мг/кг; д, е - 500 мг/кг) при температуре: а, в, д - 5 °С; б, г, е - 30 °С

Внесение серы способствует также развитию сульфатредуцирующих микроорганизмов, так как в вариантах модельных опытов с различными концентрациями серы по сравнению с контрольной почвой отмечено более активное выделение сероводорода.

Кроме этого, сера вызывает существенные изменения в комплексе целлюлозолитиков: в загрязненных почвах отмечено присутствие видов *Penicillium sp.*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *Cytophaga sp.* и *Cellvibrio sp.*, не встречающихся в контрольных почвах.

По результатам эксперимента отмечают наиболее информативные корреляции между микробиологическими и химическими показателями: в условиях внесения серы отрицательные корреляционные взаимосвязи установлены для численности сапротрофов ($r = -0,7071-0,9128$), дрожжей ($r = -0,5031-0,6007$) и содержанием ионов хлора; актиномицетов ($r = -0,9078-0,9453$; $r = -0,5019-0,9338$) и нитрификаторов II фазы ($r = -0,5375-0,8853$; $r = -0,5713-0,8666$) к концентрациям ионов карбоната и сульфата

(соответственно); актиномицетов к изменениям рН ($r = -0,4722-0,8487$); нитрификаторов I фазы и общим фосфором ($r = -0,7484-1$).

Положительные корреляционные взаимосвязи установлены между гидролитической кислотностью и численностью фосформинерализующих микроорганизмов ($r = 0,25-0,9299$); численностью сапротрофов и содержанием сульфат- ($r = 0,7417-0,8587$) и карбонат-ионов ($r = 0,7461-0,8910$); численностью актиномицетов ($r = 0,8064-0,9985$) и нитрификаторов I фазы ($r = 0,8315-0,9316$) и концентрациями ионов хлора; численностью дрожжей и содержанием сульфат-ионов ($r = 0,6591-0,7311$) и изменениям рН ($r = 0,7528-0,9115$).

Регрессионный анализ показал, что в условиях внесения серы в концентрациях выше 500 мг/кг, прогностически можно предположить дальнейшее снижение численности актиномицетов ($B_1 = -1081,0-1405,6$; $R^2 = 0,82-0,89$), нитрификаторов I фазы ($B_1 = +20,0-25,0$; $R^2 = 0,83-0,86$), увеличение сапротрофных микроорганизмов ($B_1 = -10,0-20,0$; $R^2 = 0,5-0,83$) и дрожжей ($B_1 = +178,1-11514,4$; $R^2 = 0,56-0,83$).

Кластерный анализ влияния различных концентраций ДТ и серы на химические и микробиологические параметры почв в модельных опытах

Кластеризация по совокупности химических и микробиологических показателей вариантов почв, испытывающих воздействие ДТ и серы, привела к образованию двух кластеров (рис. 13).

Уровень сходства

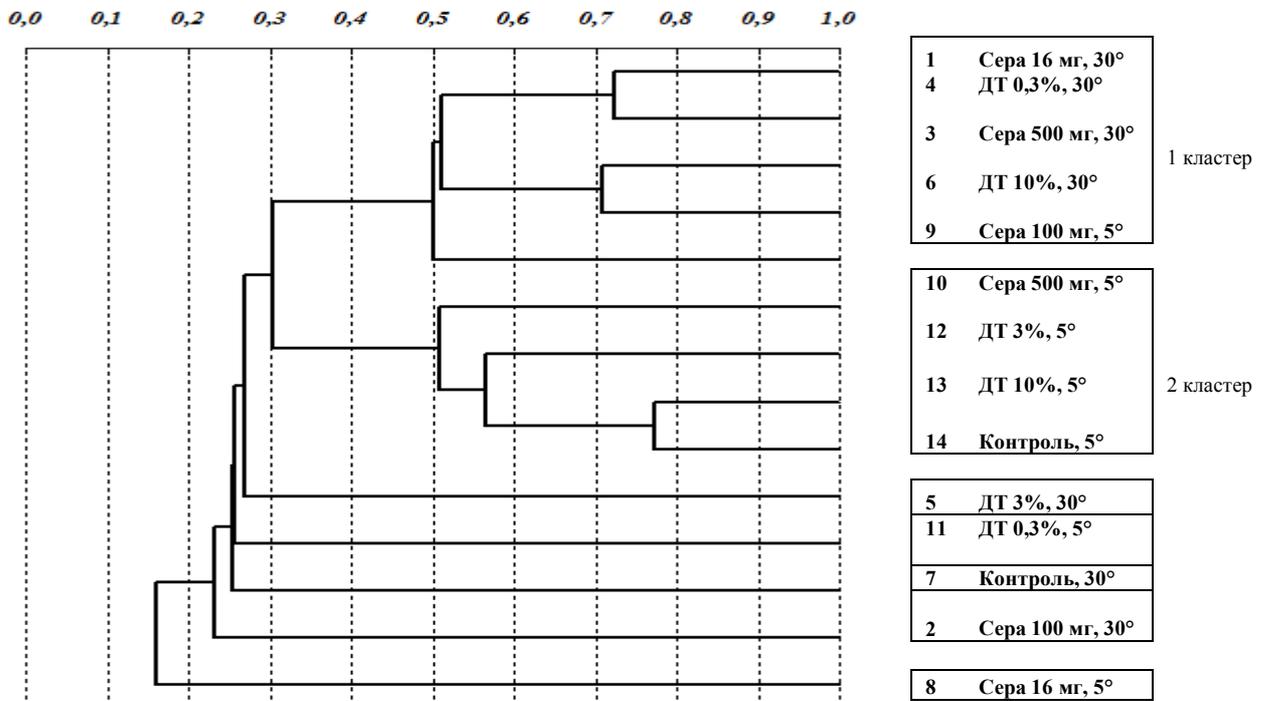


Рис. 13. Группировка вариантов почв по комплексу химических и микробиологических параметров ($\varphi \leq 0,5$)

В первый кластер объединились варианты с внесением как минимальных (сера – 16 и 100 мг/кг, ДТ – 0,3 %), так и максимальных (сера – 500 мг/кг, ДТ – 10 %) концентраций загрязнителей при температуре экспонирования 30 °С; во второй – варианты с максимальными концентрациями ДТ (3,0 и 10 %) и серы (500 мг/кг) и контрольная почва, выдержанные при 5 °С (рис. 13).

Таким образом, в ходе исследований установлено, что в условиях пониженной температуры (5 °С) при поступлении загрязняющих веществ (ДТ и сера) замедляется протекание химических и микробиологических процессов в почвах с максимальными концентрациями ДТ (3,0 и 10 %) и серы (500 мг/кг), где обнаруживается максимальный уровень сходства наблюдаемых параметров с контрольной почвой (уровень сходства наблюдаемых параметров 0,78).

ВЫВОДЫ

1. При изучении химических параметров установлено, что в почвах, прилегающих к АГК по мере приближения к территории ГПЗ увеличивается концентрация ионов хлора (42,55-59,57 мг/кг) и кальция (125,25-200,4 мг/кг) и снижается содержание сульфат-ионов (10,0-60,0 мг/кг) и азота (0,00011-0,0006 %); в почвах на территории нефтебазы содержание НУ в местах хранения достигает 116 ОДК, транспортировки – 9,6 ОДК, перегрузки – 6 ОДК.

2. По мере приближения к источнику основного загрязнения в почвах АГК и нефтебазы отмечено, что численность нитрифицирующих микроорганизмов I и II фазы снижается в среднем на 1-3 порядка (до ед. клеток).

3. Сравнительный анализ воздействия различных концентраций ДТ (0,3; 3,0 и 10 %) и серы (16,0; 100,0 и 500 мг/кг) на почвы в модельном эксперименте показал, что при 30 °С в 1,5-3,0 раза увеличивается обменная кислотность и содержание ионов карбонатов и бикарбонатов, повышается общая щелочность почв; при 5 °С снижаются обменная кислотность в 2 раза, содержание ионов хлора - в 1,5 раза. Кроме этого, при 30 °С и внесении серы отмечено увеличение в 1,5 раза содержания ионов сульфата, а при внесении ДТ при 5 °С - снижение их содержания в 1,5 раза.

4. Наибольшую чувствительность к загрязнению дизельным топливом и серой проявляют нитрифицирующие микроорганизмы I фазы и актиномицеты.

5. Интегральная оценка воздействия различных уровней загрязнения дизельным топливом и серой на химические и микробиологические параметры почв в модельных опытах показала, что в условиях пониженной температуры (5 °С) химические и микробиологические процессы в почвах с максимальными концентрациями ДТ (3,0 и 10 %) и серы (500 мг/кг) происходят аналогично контрольной почве (уровень сходства наблюдаемых параметров 0,78).

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Пархоменко А.Н., Сопрунова О.Б. Влияние нефти на микроорганизмы круговорота азота в почвах аридной зоны // Вестник Астраханского гос. тех. ун-та, Астрахань: Изд-во АГТУ, 2006. - № 3. – С. 178-182.

2. Пархоменко А.Н. Влияние нефтяных углеводородов на микробное разнообразие техногенных почв Астраханской области // Экология и биология почв: проблемы диагностики и индикации: Материалы международной науч. конференции. - Ростов-на-Дону: Ростиздат, 2006. - С. 382-384.

3. Пархоменко А.Н. Некоторые особенности круговорота фосфора в техногенных почвах Астраханской области // Проблемы сохранения и рационального использования биоразнообразия Прикаспия и сопредельных регионов: Материалы 4 международной научной конференции / Ассоциация ун-тов Прикаспийских государств. – Элиста: Изд-во КалмГУ, 2006. - С. 156-157.

4. Пархоменко А.Н., Сопрунова О.Б. Мониторинг состояния техногенных почв Астраханской области // Проблемы сохранения и рационального использования биоразнообразия Прикаспия и сопредельных регионов: Материалы 5 международной научно-практ. конф. / редкол.: Г.М. Борликов и др. – Элиста: КалмГУ, 2006. – С. 49-50.

5. Пархоменко А.Н. Особенности микробного разнообразия почв Астраханской области // Особенности биоразнообразия экосистем Нижнего Поволжья: Отчет о НИР (госбюджетный, промежуточный за 2006 год кафедры «Прикладная биология и микробиология»); руководитель Держинская И.С. - Астрахань, 2006. - С. 6-9. - № г.р.01.2.006 05245, инв. № 02.2.06 3305.

6. Пархоменко А.Н., Сопрунова О.Б. Влияние антропогенных факторов на структуру и численность микробных сообществ почв в модельном эксперименте // Современные проблемы загрязнения почв: Материалы II международной научной конференции (Москва, МГУ им. М.В. Ломоносова, 28 мая-1 июня 2007 г.). – М.: Изд-во МГУ им. М.В. Ломоносова, 2007. - т. 2. – С. 218-221.

7. Пархоменко А.Н. Изучение особенностей микробного пейзажа почв Волго-Ахтубинской поймы, испытывающих антропогенное воздействие // Биология – наука XXI века: Материалы 11 международной школы-конференции молодых ученых. - Пушкино, 2007. - С. 174.

8. Пархоменко А.Н. Изучение сукцессии микробных сообществ почвы в модельном эксперименте в условиях антропогенного загрязнения // Биология – наука XXI века: Материалы 11 международной школы-конференции молодых ученых. - Пушкино, 2007. - С. 173.

9. Пархоменко А.Н. Микроорганизмы в системе мониторинга состояния техногенных почв Астраханской области // 51-я научно-

практическая конференция профессорско-преподавательского состава Астраханского государственного технического университета: тез. докл. В 2 т. – Т. 1. Астрахань: Изд-во АГТУ, 2007. - С. 12-13.

10. Пархоменко А.Н., Сопрунова О.Б. Влияние загрязняющих веществ нефтегазового комплекса на структуру и численность микробных сообществ почв Нижнего Поволжья // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе (научно-технический журнал), 2008. - № 5. – С. 42-46.

11. Пархоменко А.Н., Сопрунова О.Б. Микроорганизмы как индикаторы экологических нарушений в почвах // Фундаментальные аспекты биологии в решении актуальных экологических проблем: Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения К.В. Горбунова (10-12 декабря 2008 г.). – Астрахань: ПолиграфКом, 2008. – С. 196-200.

12. Пархоменко А.Н. Микробный пейзаж окультуренных почв Астраханской области // Особенности биоразнообразия природных экосистем Нижнего Поволжья: Отчет о НИР (заключительный). - Астрахань, 2008. - С. 24-29. - УДК 34.35.25. - № г. р. 01200900158, инв. № 0220.0900153.

13. Пархоменко А.Н. Перспективы использования показателей комплекса микроорганизмов в почвенно-экологическом мониторинге // Наука и молодежь в развитии газовой промышленности-2009: тезисы докладов I открытой научно-практической конференции молодых работников. – Астрахань: Факел, 2009. – С. 65-66.

14. Пархоменко А.Н. Микробиологические показатели в оценке и прогнозировании состояния почв в условиях антропогенного воздействия // Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов: Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием (24-27 декабря 2009 г.). – М.: МАКС Пресс, 2009. – С. 145.

15. Пархоменко А.Н. О необходимости микробиологической диагностики почв, испытывающих антропогенное воздействие // Юг России: экология, развитие, 2010. - № 4. – С. 88-91.