

**ВЛИЯНИЕ НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА МИКРОБНОЕ СООБЩЕСТВО ПОЧВ
ТЕРРИТОРИИ НЕФТЕБАЗЫ Г. БАЛЫКЧЫ****Ч. М. Омургазиева, А. А. Каулбекова, С. Ж. Ибраева***Институт биологии НАН КР, Бишкек, Кыргызстан*

В результате проведенных микробиологических и химических исследований было выявлено, что исследованные пробы почв, отобранных с участка, где накопилось огромное количество керосина, обладают высокой токсичностью. Сильное загрязнение почвенных экосистем в зоне нефтяного загрязнения на территории нефтебазы г. Балыкчы привело к катастрофическому сокращению функционально важных групп почвенных микроорганизмов.

Ключевые слова: загрязнение почвы, тяжелые металлы, нефтепродукты, почвенные микроорганизмы

В 1998 году по решению Правительства Кыргызской Республики с целью сохранения богатого природного и культурного наследия, уникальной экологической системы озера Иссык-Куль принято Постановление о создании в пределах административных границ Иссык-Кульской области Кыргызстана биосферной зоны «Иссык-Куль». С тех пор биосферная зона «Иссык-Куль» является особо охраняемой природной территорией республики национального значения и занесена во всемирную сеть биосферных резерватов в рамках программы ЮНЕСКО «Человек и биосфера».

Озеро Иссык-Куль с давних пор играет особую роль в Центральной Азии, оно является святыней кыргызов и жемчужиной страны. Озеро бессточное, его длина 160 км, а ширина местами достигает до 60 км, расположено на высоте 1600 м. над ур. м. и является одним из крупнейших высокогорных озер мира.

К сожалению, при такой высокой значимости территории существует такая экологическая проблема, как нефтяное загрязнение почв и реальная опасность поступлений этих загрязнений через грунтовые воды непосредственно в озеро Иссык-Куль.

Как известно, загрязнение нефтепродуктами неизбежно приводит к техногенному воздействию, они обладают высокой степенью токсичности и представляют большую опасность как для человека, так и для биосферы в целом. Длительный период воздействия на природные комплексы ведет к масштабным экологическим катаклизмам: изменению сейсмотектонических условий геологической среды, водного режима, деградации биологических ресурсов, созданию парникового эффекта [2-4].

Загрязнение окружающей среды нефтью и нефтепродуктами нарушает и угнетает все жизненные процессы: подавляется дыхательная активность и микробное самоочищение [1], изменяется естественное соотношение численности микроорганизмов и направление обмена веществ, происходит накопление загрязняющих веществ в виде трудноокисляемых продуктов. В зонах техногенного воздействия основная масса поступающего загрязнения нефтью и нефтепродуктами, как правило, находится в системе «атмосфера-гидросфера-педосфера», а именно, в трех компонентах экосистем: приземный слой атмосферы, поверхностные воды и почвенный покров. В результате загрязнения нефтью и нефтепродуктами компонентов экосистем через воздушную, водную и почвенную среды происходит поступление загрязнителей в биологические циклы и в отдельные живые орга-

низмы, их дальнейшая трансформация, аккумуляция, перераспределение и перемещение.

Многие исследователи [16; 12; 13] отмечают, что легкая фракция нефти оказывает сильное токсическое действие на микробные сообщества и почвенных животных.

Известно, что бактерии играют решающую роль в самоочищении почвы от загрязнения углеводородами нефти, однако высокие концентрации нефтепродуктов могут ингибировать рост микрофлоры и подавлять процессы самоочищения [1]. Поэтому актуальностью данной работы является микробиологический контроль почв на территориях, загрязненных нефтепродуктами, чтобы при необходимости проводить биоремедиационную процедуру, в том числе обработку почвы штаммами углеводородокисляющих бактерий.

Целью данной работы являлось изучение микрофлоры образцов почв и водной среды территории нефтебазы г. Балыкчи, загрязненных нефтепродуктами, и выделение штаммов бактерий, активных деструкторов углеводородов для использования в микробной ремедиации.

Объекты и методы исследования

Отбор почвенных и водных образцов для микробиологических исследований и химических анализов произведен на территории нефтебазы г. Балыкчи (координаты: 42°27'13,44" N; 76°12'12,91" E; Height (m): 1630) Иссык-Кульской области (Кыргызская Республика), где произошла авария в 1990-е годы.

Город Балыкчи является воротами к жемчужине Кыргызстана – озеру Иссык-Куль. Расположен на северном берегу западной оконечности озера, в 175 км юго-восточнее Бишкека.

В районе города Балыкчи климат умеренно континентальный. Почвенный покров Прииссыккулья в основном представлен следующими типами почв: серо-бурые, светло-бурые, светло-каштановые, каштановые, темно-каштановые и черноземы. Согласно почвенному районированию Иссык-Кульской области [8], на территории нефтебазы «Балыкчы» наибольшее распространение получили светло-бурые, светло-каштановые, имеющие характер пустынного ландшафта в виде щебнистых и каменисто-галечниковых отложений.

Отбор почвенных проб произведен точечным методом в соответствии с требованиями ГОСТ 17.4.3.01-2017 и ГОСТ 17.4.4.02-2017.

Всего было исследовано 35 почвенных и 20 водных образцов.

Эколого-микробиологические исследования водных и почвенных образцов подверженных нефтяному загрязнению были проведены в лаборатории Экологической микробиологии Института биологии НАН КР.

Методы микробиологических исследований. В загрязненных и контрольных почвах численность микроорганизмов, представителей различных эколого-трофических и таксономических групп определяли методом посева на питательные среды. Общую численность колониеобразующих единиц (КОЕ) бактерий определяли на мясопептонном агаре (МПА), актиномицетов – на крахмало-аммиачном агаре (КАА), свободноживущие азотфиксирующие бактерии – на среде Эшби. Микромицеты определяли на среде Чапека, подкисленной молочной кислотой [9; 7].

Перед посевом для десорбции микроорганизмов с почвенных частиц водно-почвенные суспензии обрабатывали на качалке в течение 10 мин. и затем готовили серию последовательных разведений. Посевы инкубировали при 24⁰С в термостате 3-7 суток, затем проводили подсчет и микроскопирование выросших колоний.

Идентификацию бактерий и грибов до рода проводили на основании изучения культуральных и микроморфологических признаков [5; 7].

Количественные химические анализы (КХА) водных и почвенных образцов на токсикологические характеристики проведены в аттестованной по международным стандартам химико-аналитической лаборатории «Invitro» (г. Москва), методом атомно-адсорбционным, инверсионной вольтамперометрии, атомно-эмиссионным, ИК-спектроскопией, а также высокоэффективных жидкостных хроматографий (ВЭЖХ). Все аналитические и опытные работы выполнялись согласно ГОСТам и по специальным методикам (табл.1.).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием современных программ Microsoft Excel.

Результаты исследований и их обсуждение

В середине 1990 годов в городе Балыкчы на нефтебазе, в результате разрушения изношенных труб, нефтепродукты начали вытекать в грунт. Тогда утечка около 600 тонн (примерно 4,4 тыс. баррелей) нефтепродуктов, в основном дизельного топлива или керосина привела к загрязнению территории примерно в один гектар неподалеку от берега оз. Иссык-Куль. В 2009-2010 годах разлив повторился в данном районе, хотя тогда база уже находилась в ведении компании «Газпром нефть Азия». Уклон по направлению к озеру и близость грунтовых вод способствовали продвижению нефтяного пятна из года в год к линии прибоя и оно достигло опасной близости. Загрязненный участок лишен растительности, отдельные деревья уже засохли и безжизненны, на местах видны маленькие и большие маслянистые пятна, ощущается характерный запах (рис.1).

. Катастрофической ситуацией в этой проблеме является то, что утечка произошла вблизи озера Иссык-Куль, всего в 20 метрах от побережья.



Рис.1. Загрязненная нефтепродуктами территория в городе Балыкчы (фото Ч.Омургазиевой, 2019)

Особая озабоченность выражается тем, что при поступлении загрязнителей в почвы песчаного гранулометрического состава наблюдается их активная миграция с последующим накоплением в нижних горизонтах, а также выход в грунтовые воды [3].

Таким образом, в результате проведенных микробиологических и химических исследований было выявлено, что исследованные пробы почв, отобранные с участка, где накопилось огромное количество керосина, обладают высокой токсичностью, что согласно рассмотренным градациям [4], соответствует сильному, умеренно опасному, высокому загрязнению. Глубина проникновения в отдельных местах достигает до 3,6 метра. Способность к самоочистке исследуемых загрязненных почв не высокая, но в исследованных почвенных пробах были выявлены ослабленные и «истощенные» колонии азотобактеров, «предвестники» и чувствительные индикаторы загрязнения почв тяжелыми металлами [14; 10], нефтепродуктов и других токсических веществ.

Содержание нефтепродуктов и тяжелых металлов в почвах исследуемых участков представлено в таблице. Как показывают результаты химических исследований, содержание нефтепродуктов в отобранных почвенных пробах, где накопилось огромное количество нефтепродукта – более чем в 10 раз (3100мг/кг почвы) выше нормы, подвижная форма свинца превышает ПДК в 1-2 раза, а также обнаружено повышенное содержание подвижной формы марганца в 2 раза (150 мг/кг). Тогда как содержание других особо опасных токсических элементов: кадмий, ртуть, хром, никель и медь в пределах нормы (таблица).

Таблица Содержание тяжелых металлов и нефтепродуктов (мг/кг почвы) в загрязнённых почвах территории нефтебазы г.Балыкчы

№	Показатели и единицы измерения	Результаты анализа	ПДК, (ГН 2.1.7.2041-06)	ОДК, (валовое содержание) ГН 2.1.7.2511-09	Нормативный документ на методику измерений
1	pH солевой выт, ед. pH	7,3	-	-	ГОСТ 26483-85
2	Медь	22*	-	33 (песок) 66 (pH<5,5) 132 (pH> 5,5)**	ФР.1.31.2013.14150
		<0,9**	3,0	-	
3	Цинк	50*	-	55 (песок) 110 (pH<5,5) 220 (pH> 5,5)**	ФР.1.31.2013.14150
		4,9**	23	-	
4	Марганец	330*	1500	-	ФР.1.31.2013.14150
		150**	60 (pH 4,0) 80 (pH 5,1-6,0) 100 (pH> 6,0)	-	
5	Свинец	20*	32	32 (песок) 65 (pH<5,5) 130 (pH> 5,5)**	ФР.1.31.2013.14150
		8,3**	6,0	-	
6	Ртуть	0,005*	2,1	-	ПНД Ф 16.1: 2.23-2000
7	Мышьяк	8,0	2,0	2 (песок) 5 (pH<5,5) 10 (pH> 5,5)	ФР.1.31.2013.14150
8	Кадмий	<0,05*	-	0,5 (песок) 1,0 (pH<5,5) 2,0 (pH> 5,5)	ФР.1.31.2013.14150
9	Никель	15*	20	20 (песок) 40 (pH<5,5) 80 (pH> 5,5)	ФР.1.31.2013.14150
		0,8**	4,0	-	
10	Хром	0,5**	6,0	-	ФР.1.31.2013.14150
16	Нефтепрод.	3100	300**	-	ПНД Ф 16.1: 2.22-98
17	Бенз(а)пирен	0,038	0,02	-	ПНД Ф 16.1: 2.2: 2.3: 3.62-09
18	Нитраты ***	11	130	-	ПНД Ф 16.1.8-98
19	Фториды ***	2,1	10,0	-	ПНД Ф 16.1.8-98

Примечание: *- валовая форма; ** - подвижная форма; *** - водорастворимая форма.

С загрязненных нефтепродуктами почв нами была исследована аборигенная местная микрофлора. Здесь почвенная микрофлора подверглась существенному изменению, количество микроорганизмов по сравнению с контролем сильно или катастрофически сократилось. Результаты также показывают, что в почвах данной территории (нефтебазы) рост и развитие многих агрономически важных, а также и других хемоорганотрофных микроорганизмов сильно подавлен, встречались только один или два вида углеводородокисляющих бактерий рода *Pseudomonas*, наблюдались единичные колонии слабо развитых микрококков, а рост микроскопических грибов и актиномицетов не обнаружен.

Увеличение количества определенных видов углеводородокисляющих бактерий в загрязненной нефтепродуктами почве связано с гибелью чувствительных к данному загрязнению видов или большинства групп микроорганизмов. В целом, при небольших дозах уменьшается численность целлюлозолитических мик

роорганизмов и бактерий, использующих минеральные формы азота, и возрастает количество углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ), но также возможна стимуляция развития каждой составляющей микробного ценоза [11]. Таким образом, нами были выявлены углеводородокисляющие бактерии рода *Pseudomonas*, проявляющее доминирующее положение в данной загрязненной почвенной среде (рис.2.В), где концентрация подвижной формы свинца, марганца превышают в несколько раз ПДК, а также значительное превышение нефтепродуктов от нормы более чем 10 раз (3100мг/кг почвы).

Многочисленными исследованиями [2; 15] также было показано, что почвенная микрофлора может служить критерием степени загрязнения почв тяжелыми металлами, в том числе и нефтепродуктами. Почвенные бактерии изменяют количественный и видовой состав в зависимости от степени загрязнения их мест обитания. Однако, это не единственные представители микрофлоры почв, активно реагирующие на загрязнение почв нефтью и нефтепродуктами. Так, в этом отношении стоит упомянуть о таких почвенных

представителях, как грибы: их численность является надежным показателем степени угнетения почвенной экосистемы [17; 18].



А



Б



В

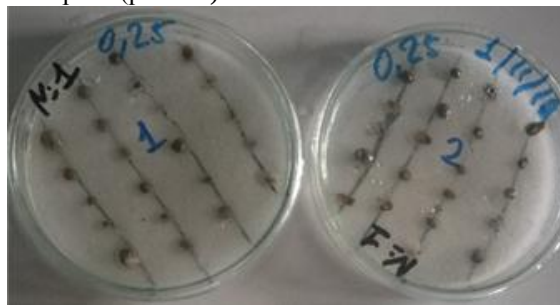
Рис.2. Отбор образцов (А) загрязненных почв с территории, где произошло авария (Б); обильный рост колоний углеводородокисляющих бактерий (В)

Для установления ингибирующего действия нефти на микробные сообщества можно использовать такие показатели, как длина грибного мицелия, численность грибных спор, профильное распределение микромицетов, жизнеспособность грибных пропагул, соотношение спор грибов и дрожжеподобных клеток.

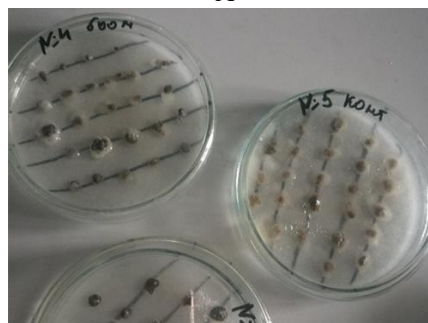
С удалением от источника загрязнения (1-5 км) уже наблюдается активная жизнедеятельность видов родов почвенных бактерий, актиномицетов и микроскопических грибов, таких как *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Acremonium*. Исследуемые почвы относятся к светло-бурым, светло-каштановым полупустынного типа растительности, более засушливого климата, из-за постоянного умеренного и сильного ветра. Климат исследуемого района в предгорных поясах колеблется от континентального, умеренно континентального до почти морского, благодаря значительной неровности рельефа и наличию озера Иссык-Куль.

В качестве индикаторного микроорганизма, чувствительного к различным токсикантам, включая

нефтепродукты и тяжелые металлы [14] исследовали наличие бактерий рода *Azotobacter* в загрязненных образцах почвы. Исследования показали, что рост азотобактера сильно сократился под воздействием токсического действия нефти (рис.3.А), тогда как в контрольном образце количество их составляет 95-100% рост (рис.3.Б).



А



Б

Рис.3. Азотобактеры в загрязненных нефтепродуктами (А) и контрольных (Б) образцах почв, отобранных на территории нефтебазы г. Балыкчы

По результатам химических анализов, в водных образцах содержание особо опасных токсических элементов, таких как свинец, ртуть, кадмий, мышьяк, а также бенз(а)пирен и нефтепродуктов не выявлено, но стоит беспокоиться о приближении вышеупомянутых больших маслянистых пятен нефтепродукта к побережью озера Иссык-Куль.

В озере Иссык-Куль при исследовании поверхностных вод в районе нефтезагрязнений территории нефтебазы культивированием было выявлено микробное сообщество с доминированием бактерий-деструкторов нефти из родов *Pseudomonas*, *Micrococcus* и *Rhodococcus* (рис.4.). В отличие от других бактерий, родококки были найдены не только в водной поверхности, но и в почвенных образцах того же района. Так, микробиологические исследования водных образцов побережья озера Иссык-Куль в г. Балыкчи выявили активный рост углеводородокисляющих бактерий рода *Rhodococcus*, которые обычно присутствуют в загрязненных водах органическими отходами.

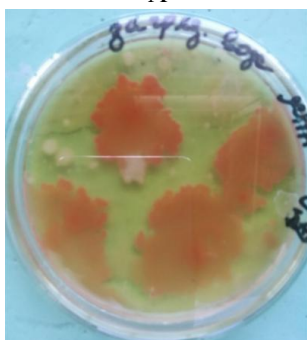
Отдельные представители данного рода способны использовать в качестве единственного источника углерода широкий спектр органических веществ, в том числе углеводороды, опасные с точки зрения экологии, в связи с этим, их изучение имеет не только научное, но и прикладное значение [6]. Родококки способны окислять высокомолекулярные n-алканы и

сложные хлорорганические соединения, которые трудно поддаются биодegradации.

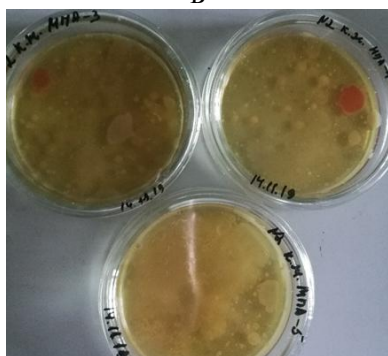
Следует отметить, что усиление антропогенной нагрузки на почвы территории нефтебазы приводит к уменьшению питательных элементов (органических и минеральных), нарастанию олиготрофности, что выражается в резком снижении микробной биомассы и увеличении удельной дыхательной активности микробных сообществ



А



Б



В

Рис.4. Отбор образцов для микробиологических исследований из поверхностных вод (А) прибрежной зоны оз. Иссык-Куль; Б, В – колонии на чашках Петри, высеванные из водных образцов этой зоны.

Сапротрофные популяции бактерий, обладающие высокой плотностью и агрессивностью, могут переходить к вынужденному паразитизму и вызывать инфекционные заболевания растений.

Под воздействием нефтепродуктов в комплексе почвенных микроскопических грибов может увеличиваться доля условно-патогенных и аллергенных для человека видов, таких, как *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani*, *Paecilomyces variotii* и др. Нефтяное загрязнение может также спо-

собствовать накоплению в почве микроскопических грибов, вызывающих заболевания растений и выделяющих фитотоксины.

Это говорит о том, что такое положение может привести к снижению интенсивности микробной трансформации органических веществ, что может иметь негативные последствия для различных представителей флоры и фауны, а также для здоровья населения, проживающего в этом районе.

Литература

1. Ананьева Н.Д. Микробиологические аспекты самоочищения и устойчивости почв. М.: Наука, 2003. – 233 с.
2. Баландина А. В., Еремченко О.З. Микробная ремедиация нефтезагрязненных агродерново-карбонатных почв и техногенных поверхностных образований в подзоне южной тайги: монография. Пермь, 2016. – 100 с.
3. Безносиков В.А. Лодыгин Е.Д., Кондратенко Б.М. Экологическая оценка почв в районе эксплуатации нефтяных месторождений в условиях севера //Международный экологический форум «Сохраним планету Земля»: сборник докладов. СПб. Центральный музей почвоведения им. В.В. Докучаева, 2004. – С. 144-148.
4. Голованов, А. И. Рекультивация нарушенных земель /А. И. Голованов, Ф. М. Зимин, В. И. Сметанин. М.: Колос, 2009. – С. 325.
5. Краткий определитель бактерий Берги (под ред. Хоулт Дж.). М.: Мир, 1980. – 495с.
6. Лихошвай А.В. Микробные сообщества, участвующие в деградации углеводородов в озере Байкал /Т.И. Земская, О.В. Шубенкова, С.М. Черницына, А.В. Ломакина, А.В. Лихошвай, О.Н. Павлова //Материалы «IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов». Новосибирск, 2008. – С.136.
7. Лысак Л.В., Добровольская Т.Г., Скворцова И.Н. Методы оценки бактериального разнообразия почв и идентификации почвенных бактерий. М.: МАКС пресс, 2003. – С. 120.
8. Мамытов А.М., Ройченко Г.И. Почвенное районирование Киргизии. Фрунзе: Изд-во АН Кирг. ССР, 1961. – 154с
9. Методы почвенной микробиологии и биохимии: учебное пособие / Под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд-во МГУ, 1991. – 304с.
10. Мынбаева Б.Н. Биологический мониторинг загрязнения урбаноземов тяжелыми металлами (на примере г.Алматы): Автореф. дисс. докт. биол. наук. Бишкек, 2015. – С. 45.
11. Мязин В.А. Разработка способов повышения эффективности биоремедиации почв Кольского Севера при загрязнении нефтепродуктами (в условиях модельного эксперимента): дисс... канд. биол. наук. Петрозаводск, 2014. – 159с.
12. Оборин А.А. Трансформация нефтяных углеводородов почв, загрязненных нефтью // Влияние промышленных предприятий на окружающую среду. Пушино, 1984. – С. 121–123.

13. Оборин А.А., Хмурчик В.Т., Илларионов С.А. Нефтезагрязненные биогеоценозы. Пермь, 2008. – 511 с.
14. Омургазиева Ч.М. Влияние тяжелых металлов на почвенные микробоценозы и их функционирование: дис.канд.биол.наук. Бишкек, 2007. –161с.
15. Омургазиева Ч.М., Урпоева Р.Д. Скрининг и исследование почвенных микромицетов, устойчивых к свинцу //Вестник КНУ им.Ж. Баласагына: Серия /Естественные науки, Бишкек, 2020. – 4(92). – С.156-163.
16. Пиковский Ю.И. Геохимические особенности техногенных потоков в районах добычи нефти // Техногенные потоки вещества в ландшафтах и состоянии природных экосистем. М., 1981. – С. 134–148.
17. Полянский А.М., Головченко А.В., Полянская Л.М. Новые критерии для микробиологического мониторинга загрязненных нефтью почв // Новые технологии для очистки нефтезагряз. вод, почв, переработки и утилизации нефтешламов: тезисы. докл. М., 2001. – С. 81–83.
18. Хабибуллина Ф.М. Почвенная микробиота естественных и антропогенно нарушенных экосистем северо-востока европейской части России: Автореф. дис. докт. биол. наук. Сыктывкар. – 2009. – 40 с.