

На правах рукописи

АХМЕТЗЯНОВА ЛЕЙСАН ГАББАСОВНА

АЛГОРИТМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЗОПАСНОГО ДЛЯ РАСТЕНИЙ И МИКРООРГАНИЗМОВ  
СОДЕРЖАНИЯ НЕФТЕПРОДУКТОВ В РЕКУЛЬТИВИРУЕМОЙ ПОЧВЕ

03.02.08 – экология

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

КАЗАНЬ, 2011

Работа выполнена на кафедре прикладной экологии факультета географии и экологии  
Федерального государственного автономного образовательного учреждения  
высшего профессионального образования  
«Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Научные руководители: доктор химических наук, профессор  
Латыпова Венера Зиннатовна

доктор биологических наук, профессор  
Селивановская Светлана Юрьевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор  
Киреева Наиля Ахняфовна,  
кандидат биологических наук, доцент  
Зарипова Сания Кашафовна

Ведущая организация: Казанский государственный аграрный  
университет

Защита диссертации состоится «9» июня 2011 г. в 10.00 часов на заседании  
Диссертационного Совета ДМ 212.081.19 при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский)  
федеральный университет» по адресу: 420008, Республика Татарстан, г. Казань, ул.  
Кремлевская, д. 18, ауд. 209 (восточное крыло главного здания).

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им Н.И. Лобачевского по  
адресу: г. Казань, ул. Кремлевская, д.35.

Автореферат разослан «09» мая 2011 г.

Ученый секретарь Диссертационного Совета,  
кандидат биологических наук, доцент



Р.М. Зелеев

**Актуальность работы.** Углеводороды нефти являются широко распространенными промышленными поллютантами, поступающими в окружающую среду вследствие нефтяных разливов при добыче, транспортировке и хранении нефти. Ответная реакция экосистем на нефтяное загрязнение обусловлена совокупностью множества факторов: поликомпонентностью состава нефти, находящейся в процессе постоянного изменения, наличием в её составе токсичных веществ, гетерогенностью состава и структуры самой экосистемы, многообразием и изменчивостью внешних факторов (Звягинцев, 1989б, Марфенина, 1991, Caravaca and Roldan, 2003, Яковлев с соавт., 2009).

В технологии очистки почвы от нефтяного загрязнения активно развиваются направления, использующие биологические методы. При этом основным условием биодegradации углеводородов является развитие почвенной микробной биомассы (Margesin and Schinner, 2005, Наумова с соавт., 2008, Lee et al., 2008). Увеличение аборигенной микробной биомассы и ее активности путем внесения дополнительных питательных веществ, удобрений, аэрации и увлажнения, а также интродукция углеводородоокисляющих микроорганизмов стимулирует процессы деструкции нефти (Margesin and Schinner, 2001, Namkoong et al., 2002, Rayner et al., 2007, Tibbett et al., 2010, Wang et al., 2011).

Индикатором эффективности рекультивации нефтезагрязненной почвы служит изменение состояния почвенного сообщества. В качестве индикаторов часто используют респираторную, ферментативную активность почвы, а также численность и биомассу микроорганизмов (Song and Bartha, 1990, Phillips et al., 2000, Dawson et al., 2007, Кураков с соавт., 2006, Киреева с соавт., 2009, Новоселова, 2009, Gandolfi et al., 2010, Tahg et al., 2010). Помимо этого многие исследователи высказываются о возможности использования фитотоксичности, оцениваемой на основании реакции тестовых растений, в качестве показателя восстановления почвы после загрязнения углеводородами нефти (Phillips et al., 2000, Labud et al., 2007, Serrano et al., 2009).

Процесс рекультивации почвы считается завершенным, когда почвенное микробное сообщество восстанавливает свой исходный статус, а также снижается уровень фитотоксичности почвы. Однако при проведении практических работ такие обширные исследования не представляются возможными, поэтому основным показателем, регистрирующим эффективность рекультивации, является содержание нефтепродуктов. В то же время необходимо отметить, что в настоящее время остаточное содержание нефтепродуктов, достижение которого считалось бы достаточным для завершения процесса рекультивации, не определено. Проблему осложняет и тот факт, что в процессе рекультивации образуются различные продукты трансформации нефтяных углеводородов, а также вещества, выделяемые микроорганизмами, нехарактерными для аборигенного сообщества (Киреева с соавт., 2005), токсичность и концентрация которых зависит от времени загрязнения почвы и способа выбранной рекультивации.

**Цель настоящей работы** - разработать подход для установления содержания нефтепродуктов в рекультивируемой серой лесной почве, безопасного для микробного сообщества и растений, на основе лабораторного моделирования и последующего статистического анализа.

**Задачи исследования.**

1. Осуществить лабораторное моделирование процессов рекультивации серой лесной почвы, загрязненной товарной нефтью в дозах 1-15%, с использованием следующих приемов: рыхление, внесение опилок и мочевины, перегноя и биопрепарата «Деворойл», и оценить их влияние на скорость деструкции углеводов.

2. Оценить изменение состояния микробного сообщества серой лесной почвы в процессе рекультивации на основе анализа общей микробной биомассы, численности гетеротрофных и углеводородокисляющих микроорганизмов.

3. Определить изменение биологической активности сообщества серой лесной почвы на основе анализа респираторной, дегидрогеназной и уреазной активностей в процессе рекультивации нефтезагрязненной почвы.

4. Установить эффекты нефтяного загрязнения в отношении уровня фитотоксичности почвы в зависимости от дозы загрязнения, способа рекультивации и длительности процесса.

5. Определить алгоритм и подготовить программу для определения безопасного содержания нефтепродуктов в серой лесной почве, подвергнутой различным способам рекультивации.

**Научная новизна.** Впервые предложен алгоритм для определения безопасного для растений и почвенных сообществ содержания нефтепродуктов в почве, подвергнутой рекультивации, который включает лабораторное моделирование процессов рекультивации, получение экспериментальных данных о состоянии микробных сообществ и фитотоксичности созданных в процессе моделирования образцов, различающихся содержанием продуктов трансформации нефти, и последующий статистический анализ результатов. Статистический анализ заключается в построении нелинейных моделей для проверки гипотезы о совпадении параметров опыта и контроля в зависимости от концентрации нефтепродуктов (используется статистика «отношения шансов») в предположении, что каждый параметр характеризует состояние сообщества почвы как целого. Выявлено, что внесение нефти в дозе до 15% приводит к увеличению микробной биомассы и численности углеводородокисляющих микроорганизмов, длительность эффекта зависит от исходного содержания нефти. Показано, что с увеличением дозы внесенной нефти увеличивается уровень фитотоксичности, возрастает продолжительность негативного эффекта, становятся достоверными различия в эффектах, вызванных разными способами рекультивации.

**Практическая значимость работы.** Полученные в диссертационной работе результаты являются основой способа определения норматива допустимого

остаточного содержания нефтепродуктов в серой лесной почве. Данные о содержании нефтепродуктов в почве, подвергнутой рекультивации, не представляющем опасность для почвенных сообществ и растений, могут быть использованы при разработке проектов рекультивации и восстановления нарушенных земель. Предложенный подход к определению безопасного содержания продуктов трансформации нефти, образующихся при ремедиации, используется при выполнении работ ООО «Экосфера» и ЗАО «Биосфера и технология» (справки прилагаются).

Разработанная компьютерная программа выявления безопасного содержания нефтепродуктов в серой лесной почве может быть использована для разработки нормативов остаточного содержания нефтепродуктов для других типов почв.

Результаты исследований используются при проведении практических работ по курсу «Экологическое нормирование» на кафедре прикладной экологии Казанского (Приволжского) федерального университета (КФУ).

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. разработанный алгоритм, включающий лабораторное моделирование различных процессов рекультивации для создания почвенных образцов с различающимися продуктами трансформации углеводов, получение эмпирических данных о состоянии микробного сообщества и фитотоксичности почвы и последующий статистический анализ полученных результатов, позволяет установить содержание нефтепродуктов в почве, подвергнутой рекультивации, не представляющее опасность для почвенных сообществ и растений.

2. внесение нефти в дозе до 15% и рекультивация почвы приводит к разнонаправленным эффектам в отношении микробного сообщества и растений: на начальном этапе происходит увеличение уровня респирации, общей микробной биомассы, численности гетеротрофных и углеводородокисляющих микроорганизмов при одновременном снижении всхожести и развития тестовых растений, а в последующем - снижение биологической активности микробного сообщества и улучшение характеристик тестовых растений.

3. применение различных приемов рекультивации нефтезагрязненных почв вызывает немонокотное изменение уровня фитотоксичности почвы.

**Связь работы с научными программами и личный вклад автора в исследования.** Диссертационная работа выполнена в соответствии с основным научным направлением КФУ «Теория и методы изучения охраны окружающей среды. Экологические основы природопользования» по теме «Биогеохимические исследования фундаментальных закономерностей переноса вещества и энергии в экосистемах при дестабилизирующем воздействии внешних возмущений» (№ гос.рег. 01.200609676) и поддержана грантом РФФИ\_регион № 09-04-97036/2009(РФФИ) «Влияние абиотических факторов на живые организмы в природных и лабораторных условиях с целью установления пределов толерантности и оценки устойчивости организмов к внешним воздействиям». Личный вклад автора в работу состоит в выполнении

экспериментальной части диссертации, обсуждении результатов и формулировании выводов на их основе. Соавторами публикаций являются научные руководители - д.х.н., профессор, заведующая кафедрой прикладной экологии Латыпова В.З. и д.б.н., профессор Селивановская С.Ю, сотрудники кафедры прикладной экологии к.х.н. Валеева Г.Р., Латыпов М.К., к.х.н. Семанов Д.А.

**Апробация работы.** Материалы работы докладывались на 1-м экологическом форуме Прикамья (Набережные Челны, 2007); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Окружающая среда и устойчивое развитие регионов: новые методы и технологии исследований» (Казань, 2009); Международной научно-практической конференции «Химия и экология: развитие науки и образования» (Москва, 2010); II Международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Прогрессивные технологии и перспективы развития» (Тамбов, 2010); II Всероссийской научно-практической конференции «Современные проблемы экологического права и природоохранного законодательства: вопросы теории и практики» (Чебоксары, 2010); II Международной научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы науки и техники» (Уфа, 2010); V Международной научно-практической конференции «Промышленность и экологическая безопасность» (Казань, 2010).

**Публикации.** Основные результаты диссертации изложены в 3 статьях и 5 тезисах докладов.

**Структура и объем диссертации.** Работа изложена на 125 страницах, содержит 8 таблиц и 36 рисунков, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждений, выводов, списка литературы, включающего 210 источников, из которых 75 на иностранном языке, и приложения.

**Благодарности.** Автор выражает большую признательность научным руководителям – д.х.н., проф., зав. каф. прикладной экологии факультета географии и экологии КФУ В.З. Латыповой и д.б.н., проф. С.Ю. Селивановской за поддержку и внимательное отношение к работе; д.б.н., к.ф.-м.н., проф. А.А. Савельеву за помощь в проведении статистической обработки результатов; сотрудникам кафедры за помощь и теплую рабочую атмосферу.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Глава 1 Обзор литературы**

В обзоре литературы приведены характеристики фракционного состава и физико-химических свойств нефти и нефтепродуктов, отражены основные механизмы, а также геохимические аспекты деградации нефти в природных условиях. Представлены данные о влиянии нефтяного загрязнения на агрофизические свойства почв.

Основная часть обзора литературы посвящена влиянию загрязнения почв углеводородами и различных методов рекультивации на характеристики почвенного микробного сообщества: численность гетеротрофных и углеводородокисляющих

микроорганизмов, микробную биомассу, респираторную и ферментативную активностей почв, а также на спектр различных культурных и дикорастущих растений.

Произведен анализ публикаций, посвященных современным механизмам и способам рекультивации нефтезагрязненных территорий. Особое внимание уделено биологическим способам ремедиации: биостимуляции и биоаугментации.

## **Глава 2 Материалы и методы исследования**

Объекты исследования, схема эксперимента. Объектом исследования являлась серая лесная почва на желто-бурых карбонатных делювиальных суглинках (Номенклатура..., 2008), а также микробные сообщества почвы и растения.

Для создания модельных образцов проводили искусственное загрязнение почвенных образцов, отобранных в фоновых районах РТ, товарной нефтью в дозе 1, 2, 3, 10 и 15% от массы почвы. Контролем служила незагрязненная почва. Загрязнение почвы проводили товарной нефтью, добываемой на территории Республики Татарстан (УПС «Бастрык» НГДУ «Прикамнефть» ОАО «Татнефть»). Плотность нефти составила  $0,885 \text{ г/см}^3$ , содержание серы – 2,3%, парафинов - 3,3%, воды – 10%, механических примесей - 0,07%. В опыте использовали следующие способы рекультивации нефтезагрязненных почв: применение азотного удобрения (мочевина) с опилками в качестве структурообразователя (варианты М), органического удобрения в виде перегноя (зрелый 1-годичный навоз) (варианты П), промышленного биопрепарата «Деворойл» (варианты Д) и рыхление почвы (варианты Р). Дозы внесения минеральных и органических азотных удобрений в нефтезагрязненные почвенные образцы рассчитаны по ВРД 39-1.13-056-2002 (ВРД ..., 2002). Количество вносимого биопрепарата «Деворойл» определяли согласно руководству по применению (Биологический..., 2008). Повторность опыта трехкратная.

Аналитические методы. Определение содержания нефтепродуктов проводили методом ИК-спектрии с предварительной экстракцией четыреххлористым углеродом (ПНД Ф 16.1:2.2.22-98, 1998). Органический углерод определяли по методу Тюрина в модификации ЦИНАО (ГОСТ 26213-91, 1992). Определение общего азота проводили фотометрическим методом «индофеноловой зелени» по ЦИНАО (ГОСТ 26107-84, 1984). Определение подвижных соединений фосфора и калия проводили фотометрическим методом по Кирсанову в модификации ЦИНАО (ГОСТ 26207-91, 1992). Значения рН определяли потенциометрическим методом в водном (1:1) экстракте (ГОСТ 26483-85, 1985). Анализ гранулометрического состава почвы проводили по методике Качинского с помощью катетометра В-630 (Вадюнина, Корчагина, 1986, ГОСТ 27593-88 (2005), 2005).

Определение фитотоксичности почвы. Фитотоксичность загрязненной почвы определяли в соответствии с ГОСТ Р ИСО 22030-2009, 2010. Фитотоксичность оценивали на основании сравнения длины наземной части, длины второго листа и

фитомассы сухого вещества тест-растений, выращенных на загрязненных и контрольных почвенных образцах.

Методы оценки состояния почвенного микробного сообщества. Респираторную активность почвенного микробного сообщества оценивали путем титриметрического определения количества  $\text{CO}_2$ , выделившегося после поглощения щелочью (Microbiological..., 2006). Суммарную микробную биомассу ( $C_{\text{mic}}$ ) вычисляли на основе субстрат-индуцированной респираторной активности (Microbiological..., 2006). Уреазную активность оценивали фотометрически по количеству ионов аммония, образующихся в результате восстановления мочевины (Хазиев, 2005). Дегидрогеназную активность оценивали колориметрически по количеству формазана (ТТФ), образующегося в результате восстановления 2,3,5–трифенилтетразолийхлорида (ТТХ) (Хазиев, 2005). Численность гетеротрофных микроорганизмов определяли путем посева на мясо-пептонный агар, численность углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ) определяли методом предельных разведений на жидких средах с нефтью в качестве единственного источника углерода (Руководство ..., 1983).

Статистические методы анализа. Измерение всех параметров проводили не менее чем в трехкратной повторности. Достоверность различий полученных результатов оценивали с использованием коэффициента Стьюдента ( $P > 0,95$ ). Для имитации результатов экспериментов применен метод рандомизации (Efron and Tibshirani, 1993, Davison, 1997). Для нелинейного описания показателей во времени использованы нелинейные обобщенные аддитивные модели (generalized additive models, GAM) (Hastie, 1990). Для написания программы выявления в почве содержания нефтепродуктов, не оказывающего негативный эффект, использовали программный пакет R (R: A language..., 2000).

### **Глава 3 Результаты и обсуждение**

Характеристика исходной почвы. На первом этапе серая лесная почва, отобранная на фоновой территории, была охарактеризована по содержанию органогенных элементов и гранулометрическому составу. Установлено, что содержание органического углерода в исследуемой почве составило 5,4 %, азота общего – 0,3 %,  $\text{K}_2\text{O}$  – 108,6 мг/кг,  $\text{P}_2\text{O}_5$  – 114,0 мг/кг, pH 6,2. Анализ гранулометрического состава позволил отнести исследуемую почву к иловато-пылеватой средней глине.

Изменение содержания нефтепродуктов и агрохимические показатели серой лесной почвы, загрязненной нефтью в дозах 1, 2, и 3%. Для определения содержания нефти, которое бы не оказывало негативного влияния на почвенные сообщества, моделировали различные способы рекультивации, относящиеся к методам биостимуляции и биоаугментации. Предполагали, что результатом применения разных способов рекультивации будет являться не только разная скорость деструкции нефтяных углеводородов, но и образование разных интермедиатов в процессе трансформации нефтяных компонентов. Такой подход позволяет моделировать почвенные образцы с нефтяным загрязнением разного возраста, различными

промежуточными компонентами и, как следствие, различными эффектами в отношении почвенной биоты.

При анализе содержания нефтепродуктов обнаружено, что через 6,5 месяцев после внесения нефти в дозе 1% содержание нефтепродуктов составило 1,10, 1,76, 1,25 и 2,01 г/кг для образцов 1Р, 1М, 1П и 1Д соответственно. При сравнении воздействия способов рекультивации можно отметить, что их существенного влияния на конечное содержание нефтепродуктов не выявлено.

Похожая картина выявлена при анализе изменения содержания нефтепродуктов при 2%-ном загрязнении. В то же время, в отличие от меньшей концентрации, процесс деструкции наблюдали и на заключительных этапах эксперимента. Кроме того, необходимо отметить, что при данном уровне загрязнения наиболее эффективным оказался такой рекультивационный прием как внесение перегноя.

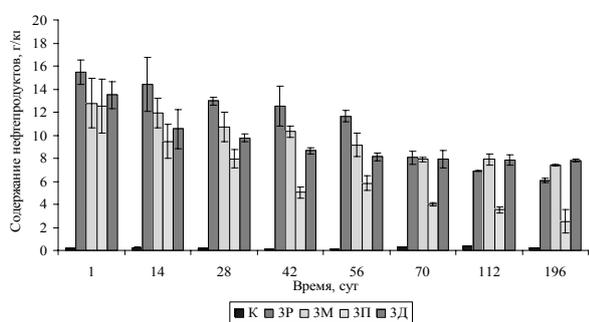


Рис. 1 Изменение содержания нефтепродуктов при загрязнении серой лесной почвы нефтью в дозе 3% и разных способах рекультивации

Анализ почвенных образцов, загрязненных нефтью в дозе 3% (рис. 1), показал, что к концу исследования произошло заметное снижение содержания нефтепродуктов до 2,51 г/кг в варианте 3П. В остальных вариантах также произошло снижение нефтепродуктов на 79,8, 75,2 и 73,9 % (в вариантах 3Р, 3М и 3Д), однако конечное содержание оказалось в 2,4, 3,0 и 3,1 раза выше по сравнению с вариантом с внесением перегноя.

В целом процесс снижения содержания углеводородов во всех вариантах имел схожую динамику, в которой можно выделить две фазы. В течение первой фазы, длившейся 4 месяца, происходило быстрое снижение содержания нефтепродуктов в почве (от 73 до 90% от внесенной нефти). Во второй фазе (с 4 по 7 месяц) снижение содержания нефтепродуктов составило 1,5-37%. Первая фаза связана с испарением легколетучих фракций нефти, а также с первоначальным разложением легкодоступных углеводородов, после чего во второй фазе микроорганизмы приступают к утилизации углеводородов с более сложным строением и меньшей доступностью. Подобную картину наблюдали и другие авторы (Jørgensen et al., 2000, Namkoong et al., 2002, Marin et al., 2005, Sarkar et al., 2005, Ros et al., 2010).

В контрольных почвенных образцах через сутки от начала эксперимента содержание  $C_{орг}$  составляло 5,4% и достоверно далее не изменялось (рис. 2). Загрязнение почвы нефтью привело к увеличению содержания  $C_{орг}$ .

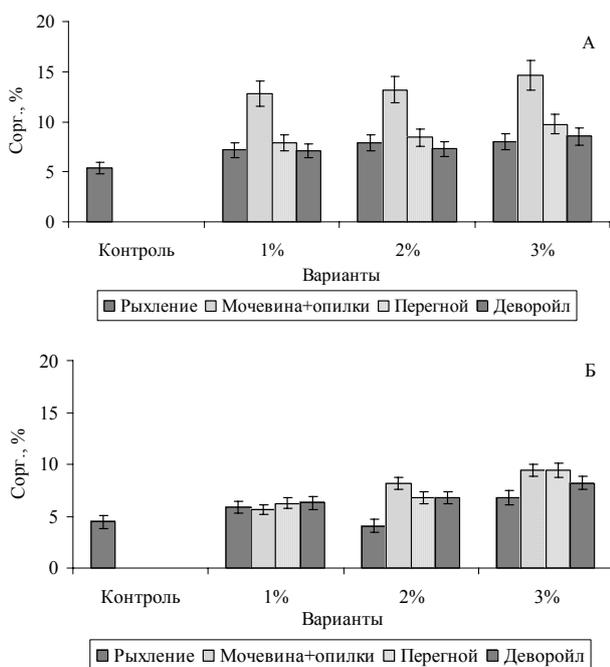


Рис. 2 Содержание  $C_{орг}$  в почвенных образцах, отобранных в начале (А) и конце (Б) эксперимента при 1, 2 и 3% загрязнении серой лесной почвы

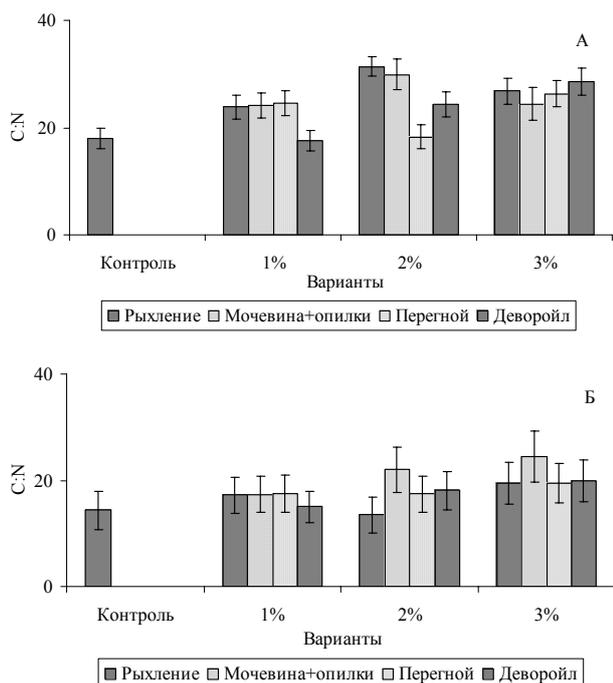


Рис. 3 Отношение C:N в почвенных образцах, отобранных в начале (А) и конце (Б) эксперимента при 1, 2 и 3% загрязнении серой лесной почвы

В вариантах с нефтяным загрязнением в начале эксперимента C:N было выше оптимальных значений и связано с внесением нефти. К концу эксперимента (рис. 3Б) в опытных образцах значение C:N приблизилось к таковому в контроле. Аналогичные

Так в вариантах с применением рыхления (в этом случае другие органические субстраты не добавляли) содержание органического углерода увеличилось в 1,3, 1,5, 1,5 раза по сравнению с контролем для вариантов с внесением нефти в количестве 1, 2, 3% (варианты 1Р, 2Р, 3Р) соответственно.

К концу эксперимента в опытных вариантах при дозе нефти 1 и 2% отмечено заметное снижение содержания  $C_{орг}$ . В вариантах с 3% дозой загрязнения содержание  $C_{орг}$  для всех опытных образцов не снизилось до уровня контрольного варианта. Наиболее интенсивное снижение содержания  $C_{орг}$  отмечается для вариантов рекультивации с применением мочевины и опилок. Скорее всего, меньшая скорость снижения  $C_{орг}$  при загрязнении в количестве 3% связана с токсическим действием нефти на почвенные микроорганизмы, что согласуется с данными ряда авторов (Киреева с соавт., 2001, Колесников с соавт., 2006).

Через сутки с момента загрязнения содержание  $N_{общ}$  в контрольном образце находилось на уровне 0,3%. Внесение нефти не привело к достоверному изменению его содержания. К концу эксперимента достоверное изменение содержания  $N_{общ}$  в почвенных образцах наблюдалось только для вариантов 1М, 2М, 3М - 39,6, 15,9, 36,7% соответственно.

В начале эксперимента отношение C:N для незагрязненных почвенных образцов составило 17,9 (рис. 3А).

зависимости были отмечены в работах Новоселовой Е.И. (2004), Киреевой Н.А. с соавторами (2001, 2005).

Микробная биомасса и численность гетеротрофов и углеводородокисляющих микроорганизмов серой лесной почвы при нефтяном загрязнении в дозах 1, 2 и 3%. В незагрязненной почве микробная биомасса ( $C_{mic}$ ) на протяжении эксперимента варьировалась в интервале 0,25-0,64 мг  $C_{mic}$ /г. Внесение в почву нефти в дозе 1% приводило к увеличению уровня  $C_{mic}$  во всех вариантах опыта. Однако динамика изменения  $C_{mic}$  различалась при применении четырех способов рекультивации. Наибольшей амплитудой колебания уровня  $C_{mic}$  характеризовался такой способ рекультивации, как внесение перегноя.

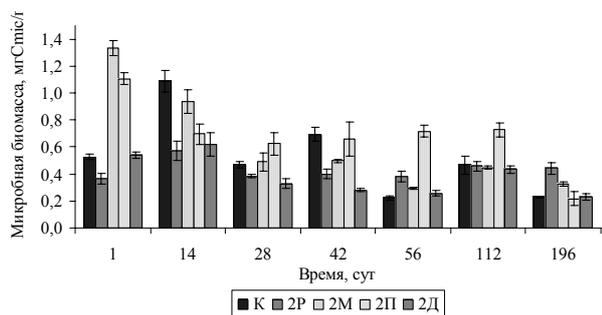


Рис. 4 Изменение микробной биомассы в серой лесной почве, загрязненной нефтью (2%), при различных способах рекультивации

Только в случае вариантов 2П и 2М обнаружено увеличение  $C_{mic}$  при внесении нефти в количестве 2%, уровень которой оказался 1,11 и 1,34 мг  $C_{mic}$ /г (рис. 4). В двух других вариантах не обнаружено стимулирующего эффекта нефти, более того, на 14 и 42 сутки исследования выявлено, что уровень  $C_{mic}$  оказался ниже контрольного варианта.

При загрязнении почвы нефтью в количестве 3% выявлен уровень  $C_{mic}$ , превышающий контрольный в 1,4, 1,2, 1,4 и 1,3 раза для вариантов 3Р, 3М, 3П и 3Д соответственно.

В следующие два месяца исследования обнаружено, что уровень  $C_{mic}$  в опытных вариантах либо превышает уровень контроля (варианты 3М, 3П, 3Д на 14, 28, 42 сутки), либо достоверно не отличается от контроля. К концу эксперимента  $C_{mic}$  опытных образцов 3Р и 3М оказалась на уровне контрольного варианта. В варианте 3Д уровень  $C_{mic}$  был ниже контроля и составил 55% от контрольного значения, а в варианте с применением перегноя (3П) наоборот был выше контроля в 1,6 раза. Скорее всего, флуктуационные изменения биомассы во времени связаны с сукцессионными процессами в почвенном микробном сообществе. Увеличение  $C_{mic}$  вследствие загрязнения почвы углеводородами нефти описано в работах многих авторов (Margesin et al., 2000, Caravaca and Roland, 2003, Marin et al., 2005, Lee et al., 2008).

Известно, что нефть, являясь органическим веществом, может выступать в качестве питательного субстрата для микроорганизмов, что приводит к росту их численности и, в итоге, к самоочищению почвы (Исмаилов, 1989, Margesin et al., 2000, Gandolfi et al., 2010). Численность гетеротрофных микроорганизмов в незагрязненной серой лесной почве в течение эксперимента колебалась в интервале  $5,45 \cdot 10^5$  -  $1,34 \cdot 10^7$  (рис. 5А). Эффект от внесения нефти в дозах 1 и 2% проявился на 14 сутки. Наибольшее

увеличение численности (в 466 раз) отмечено для варианта с применением перегноя (1П). По истечении двух месяцев от начала эксперимента достоверно более высокие значения сохраняются в варианте 2М и 2П, в двух других опытных вариантах значения численности гетеротрофов колебались на уровне контроля.

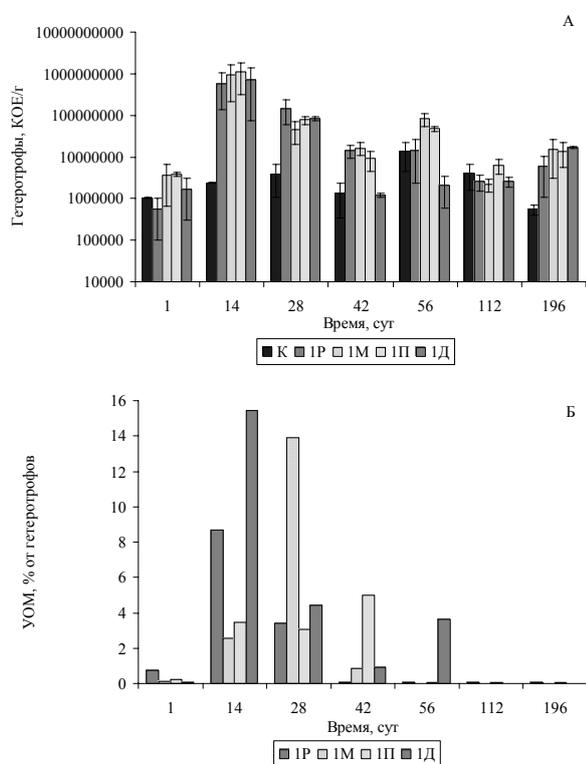


Рис. 5 Изменение численности гетеротрофных микроорганизмов (А) и УОМ (Б) в серой лесной почве, загрязненной нефтью (1%), при различных способах рекультивации

При анализе содержания УОМ при загрязнении почвы нефтью в дозе 3% выявлено, что, в целом, их доля от общей численности гетеротрофных микроорганизмов оказалась меньше, чем при более низких дозах загрязнения. В то же время стимулирующий эффект нефтяных углеводов оказался более пролонгированным.

Респираторная и ферментативная активности серой лесной почвы при нефтяном загрязнении в дозах 1, 2 и 3%. Уровень респираторной активности используется для характеристики процесса деградации органического вещества в почве при биоремедиации (Balba et al., 1998, Jorgesin et al., 2000, Lee et al., 2005). В незагрязненной почве респираторная активность на протяжении эксперимента имела значения в интервале 0,09-0,39 мгСО<sub>2</sub>/г\*24 ч.

Увеличение респираторной активности в вариантах 1М и 1Д наблюдали уже на первые сутки эксперимента (1,03 и 0,68 мгСО<sub>2</sub>/г\*24 ч), в варианте 1П - на 14 сутки, в

Наибольшее увеличение численности гетеротрофов при 3% загрязнении также наблюдали на 14 сутки. эксперимента, однако увеличение по сравнению с контролем было не столь значительным: в 32 и 83 раза в вариантах 3П и 3М и всего в 3,4 раза в варианте 3Р.

Традиционно при оценке эффективности процессов биоремедиации определяют содержание УОМ в почве (рис. 5Б). На 14-28 сутки во всех опытных вариантах при 1 и 2% загрязнении отмечалось увеличение доли УОМ в общем числе гетеротрофных микроорганизмов (максимум до 27%).

Резкое увеличение численности УОМ в течение первых 15 дней с момента загрязнения отмечали при загрязнении почвы в количестве 5,0 и 7,5 г/кг (Margesin et al., 2000, Lee et al., 2008). Содержание УОМ к завершению эксперимента находилось на уровне сотых долей процента.

варианте 1Р стимулирующего эффекта отмечено не было. Через месяц от начала эксперимента наблюдали снижение уровня респираторной активности опытных вариантов, и к концу эксперимента во всех вариантах значение респираторной активности находилось на уровне контроля.

В первые сутки эксперимента в варианте 2Р отмечалось угнетение респираторной активности в 1,6 раза по сравнению с контролем, в то время как для вариантов 2М и 2П эмиссия CO<sub>2</sub> была в 2 раза выше, чем для незагрязненной почвы; в варианте 2Д дыхание не отличалось от контроля. На 14 сутки значения респираторной активности во всех опытных вариантах были выше активности незагрязненной почвы, а на четвертый

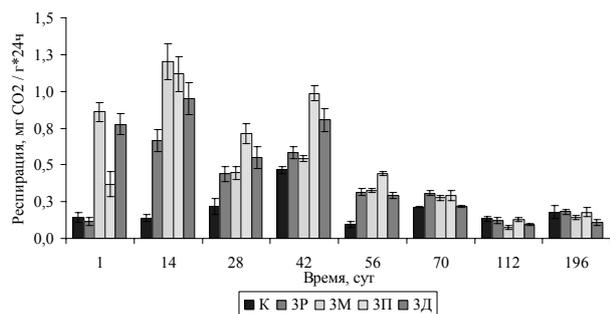


Рис. 6 Изменение респираторной активности серой лесной почвы, загрязненной нефтью (3%), при различных способах рекультивации

месяц эксперимента происходило ее снижение до уровня, отмечаемого в незагрязненной почве.

Наибольшее количество выделяемого CO<sub>2</sub> в образцах с 3% нефти отмечалось через две недели от начала эксперимента (рис. 6). В опытных вариантах 3Р, 3М, 3П уровень респираторной активности оказался выше контроля вплоть до 70 сутки эксперимента, а затем снизился до уровня контрольного варианта.

Почвенные ферменты выступают катализаторами в важнейших процессах метаболизма, включая разложение органического вещества и детоксикацию ксенобиотиков. Дегидрогеназная активность незагрязненной почвы в течение опыта изменялась в пределах от 13,14 до 29,15 мг формазана/кг. При внесении нефти увеличение дегидрогеназной активности почвы в течение первого месяца сменялось ее снижением, а в вариантах 1М и 1Д даже угнетением, на дальнейшем этапе эксперимента. При этом для примененных способов рекультивации была характерна разная амплитуда колебания активности. Увеличение дозы нефтяного загрязнения в 2 раза привело к угнетению активности дегидрогеназы в варианте 2Р (рис. 7).

Изменение дегидрогеназной активности в вариантах 2Д и 2М имело динамику, аналогичную вариантам с теми же способами рекультивации при 1% загрязнении, однако угнетение активности наблюдалось уже на 28 сутки эксперимента. Только применение перегноя в качестве ремедианта позволяло сохранить уровень дегидрогеназной активности нефтезагрязненной почвы в течение всего эксперимента на уровне контроля или выше него.

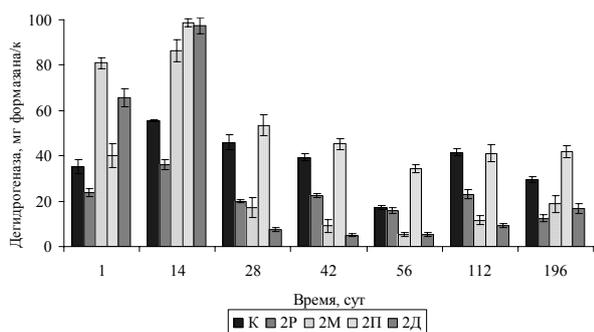


Рис. 7 Изменение дегидрогеназной активности серой лесной почвы, загрязненной нефтью (2%), при различных способах рекультивации

оказался в среднем на 57% ниже контрольных значений на протяжении всего эксперимента. Увеличение дегидрогеназной активности после внесения нефти с последующим снижением ее уровня отмечали и другие авторы (Namkoong et al., 2002, Гафарова, Зарипова, 2005, Lee et al., 2008, Serano et al., 2009).

Уреазная активность почвы является показателем, характеризующим процессы превращения азотсодержащих соединений. Уреазная активность почвы, не подвергнутой нефтяному загрязнению, в течение эксперимента имела значения в интервале 225,4-606,4 мг NH<sub>3</sub>/кг\*24ч. Внесение в почву нефти в дозе 1% привело к ее увеличению во всех вариантах рекультивации сразу после загрязнения, а на 14 сутки уреазная активность в вариантах 1Д, 1Р и 1П достигла максимальных значений и была выше контроля в 6,7, 18,2, 5,5 раз соответственно. Необходимо отметить, что в вариантах 1Д и 1М на 56 сутки уровень уреазной активности снижается до уровня контроля, а в варианте 1П даже по истечении 7 месяцев уреазная активность имеет значения достоверно выше контроля.

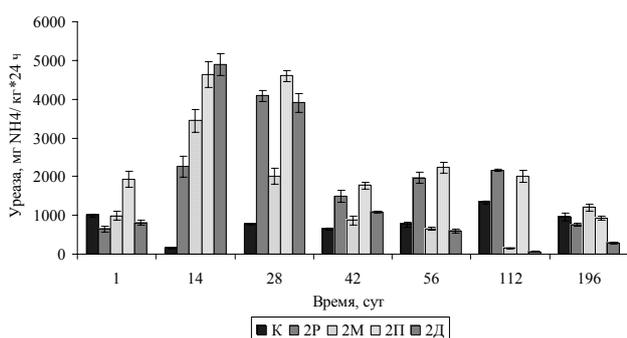


Рис. 8 Изменение уреазной активности серой лесной почвы, загрязненной нефтью (2%), при различных способах рекультивации

После загрязнения почвы нефтью в количестве 2% (рис. 8) на 1 сутки эксперимента увеличение уреазной активности отмечено только для варианта 2П (2352,7 мг NH<sub>3</sub>/кг\*24 ч). Тем не менее, через две недели с начала эксперимента высокие значения уреазной активности отмечались во всех опытных вариантах. К концу эксперимента уреазная активность вариантов 2Р, 2М, 2П имела значения, достоверно не отличимые от контроля, а в варианте 2Д была в 3,5 раза ниже контроля.

Через день после загрязнения серой лесной почвы нефтью в количестве 3% уровень уреазной активности в вариантах 3Р и 3М был в 1,7 и 2,5 раза ниже, а в

вариантах ЗП и ЗД в 2,9 и 4,9 раза выше контроля соответственно. По истечении 7 месяцев в вариантах ЗР, ЗП, и ЗД значение уреазной активности было выше контрольных в 2,6, 2,9, 3,5 раза, а в варианте ЗМ – ниже в 5,3 раза.

Увеличение активности уреазы, дегидрогеназы и респираторной активности согласуется с результатами других авторов (Рахимова с соавт., 2005, Marin et al., 2005).

Фитотоксичность серой лесной почвы при нефтяном загрязнении в дозах 1, 2 и 3%. Для оценки изменения фитотоксичности в динамике процесса рекультивации почвенные образцы засеивали семенами пшеницы (*Triticum sativum*) и через 14 суток выращивания определяли высоту побега растений, длину второго листа и биомассу растений. Уровень фитотоксичности оценивали по ингибированию определяемых показателей по сравнению с таковыми у растений, выращиваемых на контрольной (незагрязненной) почве.

Установлено, что при загрязнении почвы нефтью в количестве 1% негативное действие на длину побегов наблюдалось только в вариантах 1М и 1Р рекультивации и только на начальном этапе эксперимента. Начиная с 56 суток, во всех опытных вариантах отмечено увеличение высоты побега по сравнению с контролем в среднем на 30%. При определении фитотоксичности почвы на основании измерения длины второго листа обнаружены аналогичные тенденции. Достоверное снижение фитомассы тест-растений наблюдали только на 1 день с момента загрязнения: 41,4, 46,3, 38,9 и 29,8% для вариантов 1Р, 1М, 1П, и 1Д соответственно.

Увеличение степени загрязнения почвы нефтью приводит к изменениям в реакции тест-растений. При загрязнении в количестве 2% угнетение развития растений наблюдали в вариантах рекультивации 2Д и 2М в течение 1,5 месяцев. В двух других вариантах (2П и 2Р) даже на первые сутки эксперимента не отмечалось достоверных отличий от контроля. В образцах, отобранных через день после загрязнения, в варианте 2Д не происходило формирование второго листа (фитотоксичность 100%). Негативный эффект в вариантах 2Р, 2М и 2Д, оцененный на основании указанного параметра, наблюдался вплоть до 42 сутки, но имел тенденцию к снижению. Меньший негативный эффект обнаружен в случае оценки изменения фитомассы.

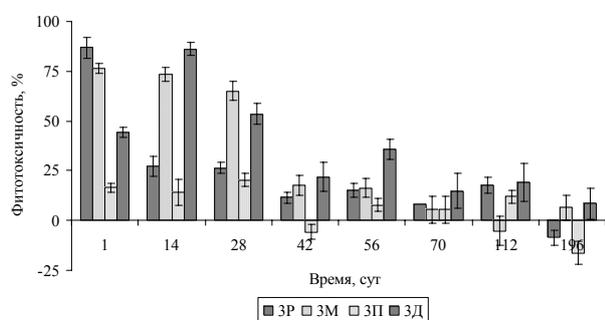


Рис. 9 Фитотоксичность образцов серой лесной почвы при различных способах рекультивации, оцененная на основании высоты побега, при 3% загрязнении

Более длительное и выраженное негативное воздействие нефтяного загрязнения наблюдали при загрязнении почвы нефтью в количестве 3% (рис. 9). Так, образцы вариантов ЗР, ЗМ и ЗД, отобранные на первые сутки, демонстрировали фитотоксичность, определенную на основании высоты побега, - 86,9, 76,5 и 44,2% соответственно. Наименьшая фитотоксичность образцов была характерна для варианта с применением перегноя (ЗП).

Как и при определении высоты побега, максимальная фитотоксичность (по параметру длина второго листа) в первый день после загрязнения обнаружена в вариантах ЗР и ЗМ (100 и 65,5% соответственно). В варианте ЗД максимальная фитотоксичность обнаружена на 14 сутки (84,7%). При этом фитотоксический эффект, в отличие от вариантов с более низким содержанием нефти, наблюдали до 112 суток. в вариантах ЗР и ЗД и до 56 суток в варианте ЗМ. Выявленная закономерность, заключающаяся в том, что фитотоксичность не убывает монотонно, подтверждается при рассмотрении варианта ЗП. Немонотонное изменение фитотоксичности выявлено и при ее определении на основании показателя фитомасса. Установлено, что негативный эффект на фитомассу наблюдался до 42-56 суток. Исключение составил вариант с применением перегноя, в котором ингибирующего эффекта на фитомассу не обнаружено. Таким образом, при более высоком уровне загрязнения нефтью влияние рекультивационных мероприятий на фитотоксичность почвы становится более значимым.

Изменение содержания нефтепродуктов и агрохимических показателей в серой лесной почве, загрязненной нефтью в дозах 10 и 15%. Как указывалось ранее, основной целью моделирования процессов ремедиации нефтезагрязненных почв было получение образцов с различным содержанием интермедиатов, в которых бы биологические показатели достоверно отличались от таковых в контроле. Проведенные исследования почвенных образцов, загрязненных нефтью в дозах 1, 2 и 3%, не позволили нам получить достаточного для последующего математического моделирования количества таких образцов, поэтому на следующем этапе было проведено загрязнение почвы нефтью в дозе 10 и 15%. В качестве приема рекультивации было использовано рыхление, поскольку этот способ является наименее затратным, при этом в процессе рыхления происходит аэрация субстрата, необходимая для биохимического окисления углеводов оксигеназами микроорганизмов, которое осуществляется с участием молекулярного кислорода (Marin et al., 2005).

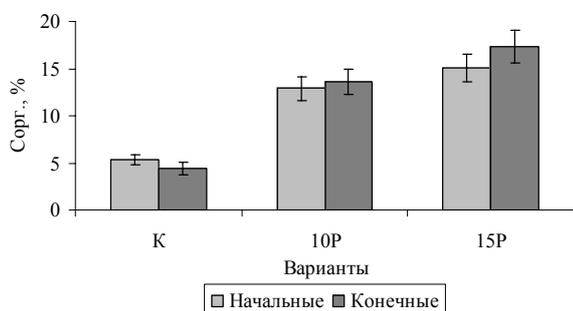


Рис. 10 Содержание  $C_{орг}$  в почвенных образцах, отобранных в начале и конце эксперимента при 10 и 15 % загрязнении серой лесной почвы

Лабораторное моделирование осуществляли в течение 5 месяцев. Через месяц после загрязнения содержание нефтепродуктов в опытных вариантах 10P и 15P составило 39,1 и 58,3 г/кг. К концу эксперимента в почве опытных вариантов 10P и 15P было зафиксировано следующее содержание нефтепродуктов: 21,7 и 44,0 г/кг.

В контрольных почвенных образцах содержание  $C_{орг}$  составляло 5,4%, внесение нефти привело к увеличению  $C_{орг}$  в 2,4 и 2,8 раза по сравнению с контролем (рис.10).

К концу эксперимента, в отличие от вариантов с меньшей дозой загрязнения, в вариантах 10P и 15P его содержание остается практически на начальном уровне. Этим подтверждается токсический эффект нефти в отношении почвенных микроорганизмов.

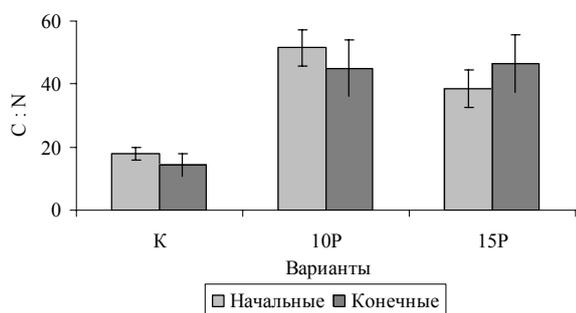


Рис. 11 Отношение C:N в почвенных образцах, отобранных в начале и конце эксперимента, при 10 и 15 % загрязнении серой лесной почвы

Отношение C:N для контрольных серых лесных почв имело значение 17,9, что соответствовало интервалу, в котором активно функционируют почвенные микроорганизмы (рис. 11). В вариантах 10P и 15P, аналогично вариантам с меньшими дозами загрязнения, это отношение увеличилось и составило 51,5 и 38,5. Поскольку в почвах вариантов 10P и 15P не происходило достоверного снижения содержания  $C_{орг.}$ , соотношение

C:N к концу эксперимента было по-прежнему выше контрольных значений в 3,1 и 3,3 раза.

Микробная биомасса, численность гетеротрофных и углеводородокисляющих микроорганизмов серой лесной почвы при нефтяном загрязнении в дозах 10% и 15%. В незагрязненной почве микробная биомасса ( $C_{mic}$ ) на протяжении эксперимента имела значения в интервале 0,18-0,60 мг  $C_{mic}$ /г. Аналогично вариантам с меньшей дозой загрязнения, внесение в почву нефти приводило к увеличению уровня биомассы. Наибольшее увеличение в 2,5 раза отмечалось в варианте 15P на 28 суток. Уровень  $C_{mic}$  в опытном варианте с 10% загрязнением, за исключением первой точки наблюдений, находился на уровне контрольного варианта.

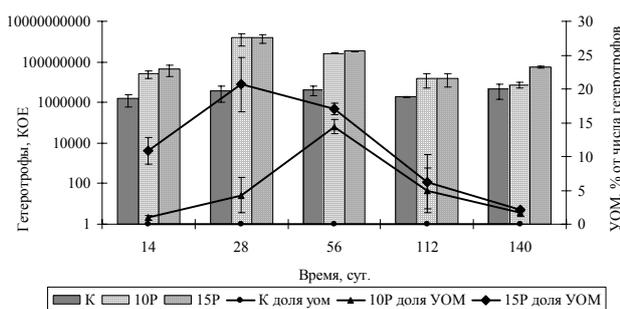


Рис. 12 Изменение численности гетеротрофов и УОМ в серой лесной почве, загрязненной нефтью (10 и 15%)

Численность гетеротрофных микроорганизмов в незагрязненной серой лесной почве в течение эксперимента колебалась в интервале  $1,55 \cdot 10^6$ - $4,7 \cdot 10^6$  (рис. 12). Наибольшее увеличение численности (в 412 и 406 раз) отмечено через месяц с момента загрязнения. По истечении пяти месяцев в варианте 10P численность гетеротрофов находилась на уровне контроля, а в варианте 15P их

численность по-прежнему его превышала. В почвенных образцах также отмечено увеличение численности УОМ, однако, в отличие от вариантов с меньшими дозами загрязнения (1P, 2P и 3P), к концу эксперимента доля УОМ имела значения 1,64 и 2,06 %. Такое различие в результатах связано с тем, что в вариантах с более высоким исходным содержанием нефти к концу эксперимента содержание нефтепродуктов еще остается высоким.

Респираторная и ферментативная активности серой лесной почвы при нефтяном загрязнении в дозах 10 и 15%. Максимальное различие в уровнях респираторной активности опытных и контрольного варианта было отмечено на 56 сутки. Через 4 месяца эксперимента уровень респираторной активности загрязненных почв по-прежнему был выше контрольных значений в 1,5 раза. Полученные результаты свидетельствуют о различиях в ответной реакции микробных сообществ в почвах с высоким и низким исходным содержанием нефти. Так, при высоком уровне загрязнения (10 и 15%) даже за 4 месяца не происходит восстановления функциональной активности сообщества до исходного уровня.

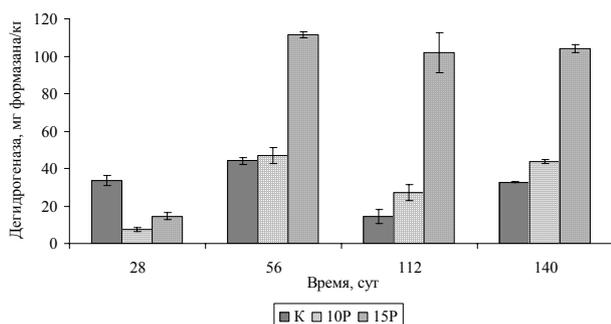


Рис. 13 Изменение дегидрогеназной активности серой лесной почвы, загрязненной нефтью (10 и 15 %)

При внесении нефти в дозе 10 и 15% наблюдали снижение дегидрогеназной активности в течение первого месяца в 4,5 и 2,3 раза соответственно (рис. 13). Ко второму месяцу в варианте 10P уровень дегидрогеназной активности восстановился, а в варианте 15P даже увеличился в 2,5 раза по сравнению с контролем. К концу эксперимента в вариантах 10P и 15P дегидрогеназная активность находилась на уровне 133 и 317% контрольных значений.

Как и в вариантах с меньшими дозами загрязнения, наблюдали достоверное увеличение уреазной активности по сравнению с контролем и ее немонокотное изменение. Так, по истечении 28 суток с момента загрязнения, уреазная активность опытных вариантов 10P и 15P оказалась выше контрольных значений в 6,5 и 10,5 раз, еще через месяц отмечалось снижение уреазной активности в 1,8 и 2,9 раза по сравнению с предыдущими значениями, а через 4,5 месяца уровень уреазной активности в загрязненной почве увеличился по сравнению с измерениями предыдущего месяца.

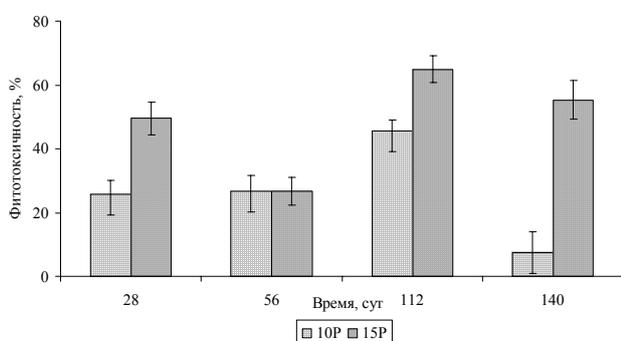


Рис. 14 Изменение фитотоксичности серой лесной почвы по показателю длины наземной части при загрязнении нефтью (10 и 15 %)

Фитотоксичность серой лесной почвы при нефтяном загрязнении в дозах 10 и 15%. Внесение нефти оказывало угнетающее действие на рост и развитие тест-растений. Ингибирующий эффект имел дозо-зависимый характер во всех точках измерения, за исключением 56 суток, в которые фитотоксичность образцов достоверно не различалась. Максимальная фитотоксичность установлена на 112 сутки.

К концу эксперимента фитотоксичность, оцененная по длине наземной части растения, в варианте 10P снизилась до значений 7,6%, в то время как в варианте 15P она оставалась по-прежнему высокой (55,3%). Увеличение токсичности с ее последующим снижением выявлено и при анализе сухой фитомассы растений.

Определение безопасного содержания нефтепродуктов в серой лесной почве методом статистического анализа. Анализ результатов, полученных на предыдущих этапах исследования, показывает, что различные способы рекультивации приводят к различным скоростям восстановления микробных сообществ почв и различным эффектам в отношении выращиваемых растений. Внесение нефтяных углеводородов вызывает дестабилизацию микробного сообщества, выражающуюся в увеличении амплитуды флуктуаций биологической активности почвы и увеличении численности как гетеротрофных микроорганизмов, так и организмов, специализирующихся на деструкции углеводородов. В то же время при высоких исходных концентрациях нефти наблюдается ингибирование ряда параметров почвенного микробиоценоза. При этом в большинстве случаев отсутствует зависимость функционирования микробного сообщества от дозы нефти. Отсутствие корреляции, скорее всего, связано с тем, что на отдельных этапах различных видов рекультивации нефтезагрязненных почв образуются интермедиаты, различающиеся по степени токсичности. Кроме того, вероятно и появление в почве токсичных соединений, являющихся продуктами метаболизма грибов и бактерий, которые начинают доминировать в составе сообществ при изменившихся за счет внесения нефти условиях среды (Киреева с соавт., 2000 а, 2001 б, 2003). Более однозначная картина получена при анализе изменения фитотоксичности почв, однако и в этом случае не удалось выявить содержание нефтепродуктов, которое можно было бы считать безопасным при всех проанализированных способах рекультивации.

Для установления интервалов искомой величины нами проведено математическое моделирование зависимостей изменения анализируемых параметров от концентрации нефтепродуктов. Исходной посылкой при этом являлось то, что безопасным содержанием является такое, при котором состояние микробного сообщества и уровень фитотоксичности является стабильным и достоверно не отличается от состояния почвы, не загрязненной углеводородами.

Для реализации этого подхода на первом этапе для каждого из параметров при каждом из способов рекультивации были созданы нелинейные модели, описывающие их значения в зависимости от концентрации нефтепродуктов, при этом используются обобщенные аддитивные функции, реализованные в пакете mgcv (Wood, 2004) статистической системы R (R Development Core Team, 2010). Поскольку эти модели включают зависимость от времени (иначе невозможно сравнение с контролем), дополнительно строили модель изменения концентрации во времени.

В связи с тем, что концентрация нефтепродуктов в контрольном варианте не изменялась в течение эксперимента, было решено строить модель изменения не

исходных параметров, а переменной, отражающей состояние почвенного сообщества в зависимости от концентрации нефтепродуктов в опыте. В качестве такой переменной, сопоставляющей результаты опыта и контроля, было решено использовать стандартную статистику OR (отношение шансов – определялись шансы выхода значений характеристик состояния микробного сообщества за установленные рамки по сравнению с контролем). Поскольку как для опыта, так и для контроля имелись повторные измерения, то в строку «Контроль» заносились результаты сравнения значений контроля между собой, а в строку «Опыт» - результаты сравнения данных опыта с контролем (табл. 1), где n – количество результатов измерений, существенно отличающихся от контроля (второе число индекса 1) и существенно не отличающихся от контроля (второе число индекса 2). Статистика OR вычислялась как

$$OR=(n_{11} / n_{12})/(n_{21} / n_{22}).$$

Таблица 1

Матрица для расчета отношения шансов

	Существенно отличаются от контроля	Не существенно отличаются от контроля
Опыт	n <sub>11</sub>	n <sub>12</sub>
Контроль	n <sub>21</sub>	n <sub>22</sub>

Для каждого параметра, характеризующего состояние почвы в определенный момент времени, проверялась статистическая гипотеза о том, что значения, полученные в опыте, отличаются от контроля не чаще, чем одни значения контроля от других, что позволяет говорить об отсутствии влияния нефтепродуктов на микробное сообщество почвы. Статистика, полученная при проверке этой гипотезы (левая граница доверительного интервала отношения шансов), относилась к концентрации нефтепродуктов для опыта в этот момент времени.

В предположении, что гипотеза имеет место (или не имеет места) для всех параметров для одного, либо всех способов рекультивации одновременно, все полученные таким образом данные объединялись в единую матрицу, для которой строилась модель положения статистики по отношению к критическому значению указанной гипотезы в зависимости от концентрации нефтепродуктов. Если доверительный интервал области содержал единицу, то результаты опыта нельзя было считать существенно отличимыми от результатов контроля. Результирующая модель положения границы критической области использовалась для комплексного анализа состояния почвы и определения концентрации, которую можно считать безопасной. Анализ обработки данных для вариантов с разными способами рекультивации по отдельности позволил определить значения содержания нефтепродуктов, начиная с которых параметры, характеризующие микробное сообщество почв и влияние почвы на растения, достоверно не отличаются от контроля, то есть почвенные сообщества восстанавливаются. Установлено, что использование разных способов рекультивации

приводит к тому, что состояние почвенного сообщества восстанавливается при различном содержании нефтепродуктов. Так, наиболее высокая концентрация (7,78 г/кг) установлена для такого способа рекультивации как рыхление, тогда как при внесении перегноя требуется большее снижение содержания нефтепродуктов (до 3,54 г/кг) для достижения сообществом стабильного состояния. Полученные результаты являются следствием различий в применяемых рекультивационных приемах, приводящих к образованию различных интермедиатов и изменениям в почвенных характеристиках в целом (Phillips et al., 2000, Gogoi et al., 2003, Maila and Cloete, 2005, Labud et al., 2007).

Принимая во внимание, что при рекультивации почв в реальных условиях чаще всего применяется комплекс приемов, на заключительном этапе был проведен анализ совокупности данных по всем способам рекультивации (рис. 15). Выявлено, что интервал содержания продуктов трансформации нефти, образующихся при изученных способах рекультивации нефтезагрязненной серой лесной почвы, начиная с которого содержание нефтепродуктов можно было бы считать безопасным для сообщества серой лесной почвы, составляет 3,08-4,83 г/кг.

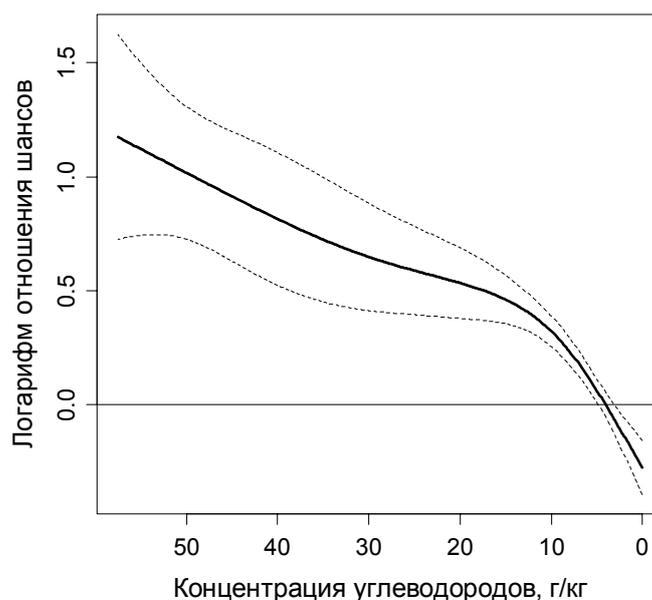


Рис. 15 Модель положения левой границы 95% доверительного интервала отношения шансов, рассчитанного по комплексу показателей

## ВЫВОДЫ

1. Установлено, что скорость снижения нефтепродуктов в серой лесной почве зависит от их исходного содержания, применяемого приема (способа) рекультивации и имеет двухфазный характер. Максимальная скорость элиминации углеводородов отмечена в первые 4 месяца и составила 73-90% при начальной концентрации нефтепродуктов 1-3%. Увеличение исходного содержания нефти до 10-15% приводит к снижению скорости деструкции нефти (70%). По эффективности деструкции

углеводородов проанализированные приемы рекультивации составляют ряд: перегной > рыхление > мочевины и опилки > «Деворойл».

2. Показано, что внесение в почву углеводов в дозе 1-3% приводит к увеличению микробной биомассы в 2-4 раза по сравнению с контролем, уровень которой снижается до значений в незагрязненной почве через 2 месяца рекультивации, что косвенно свидетельствует о деструкции углеводов, служащих питательным субстратом. При исходной дозе загрязнения 10 и 15% стимулирующий эффект отмечен в течение всего периода исследования. Загрязнение почвы углеводородами приводит к увеличению численности углеводородокисляющих бактерий при всех дозах загрязнения. Максимальный стимулирующий эффект отмечен на 14-28 сутки при 2% дозе загрязнения при использовании в качестве рекультивации перегноя и мочевины с опилками.

3. Установлено, что в результате нефтяного загрязнения происходит увеличение уровня базальной респираторной активности, причем продолжительность периода стимуляции активности коррелирует с уровнем загрязнения. Выявлено снижение дегидрогеназной активности серой лесной почвы при дозах загрязнения 10-15% в течение первого месяца при всех приемах рекультивации. При меньших дозах (1-3%) в тот же период установлено увеличение дегидрогеназной активности с последующим снижением до уровня контрольного варианта. При всех вариантах рекультивации отмечалось увеличение уреазной активности, уровень которой превышал контрольный до конца исследования, за исключением вариантов с начальными дозами загрязнения 1 и 2%. При этих дозах внесения нефти наблюдали снижение уреазной активности, начиная с 56 суток эксперимента.

4. Обнаружено, что в течение первых 2 месяцев серая лесная почва оказывает фитотоксический эффект в отношении тест-растения пшеницы *Triticum sativum* при всех исследованных дозах загрязнения нефтью. С увеличением дозы внесенной нефти увеличивается уровень фитотоксичности, возрастает продолжительность негативного эффекта, становятся достоверными различия в эффектах, вызванных разными способами рекультивации. Выявлено немонокотное изменение уровня фитотоксичности в процессе рекультивации почвы.

5. Разработан алгоритм определения безопасного для растений и почвенных микроорганизмов содержания нефтепродуктов в почве, подвергнутой рекультивации. Алгоритм включает моделирование различных процессов рекультивации для создания почвенных образцов с различающимися продуктами трансформации углеводов, получение эмпирических данных о состоянии микробного сообщества и фитотоксичности почвы и последующий статистический анализ полученных результатов. Статистический анализ заключается в построении нелинейных моделей для проверки гипотезы о совпадении параметров опыта и контроля в зависимости от концентрации нефтепродуктов (используется статистика «отношения шансов») в предположении, что каждый параметр характеризует состояние сообщества почвы как целого.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Ахметзянова Л.Г.** Информативные показатели фитотоксичности серой лесной почвы в условиях загрязнения нефтью / И.В. Леонтьева, **Л.Г. Ахметзянова**, Г.Р. Валеева // Ученые записки Казанского университета. Естественные науки. – 2008. – Т. 150, кн. 4. - С. 214-219.
2. **Ахметзянова Л.Г.** Лабораторное моделирование рекультивации нефтезагрязненных почв для определения допустимого остаточного содержания нефтепродуктов / **Л.Г. Ахметзянова**, С.Ю. Селивановская, В.З. Латыпова // Ученые записки Казанского университета. Естественные науки. – 2010. – Т. 152, кн. 4. - С. 68-78.
3. **Ахметзянова Л.Г.** Характер распределения различных фракций нефтепродуктов в зависимости от типа почв / В.З. Латыпова, М.К. Латыпов, **Л.Г. Ахметзянова**, Р.Р. Айдаралиева, И.В. Леонтьева // Труды Всероссийской научной конференции с международным участием «Окружающая среда и устойчивое развитие регионов: новые методы и технологии исследований». – Казань: Изд-во «Отечество». – 2009. – С. 137-140.
4. **Ахметзянова Л.Г.** Экспериментальное исследование опасности нефтезагрязненных почв для подземных вод / М.К. Латыпов, **Л.Г. Ахметзянова**, Г.Р. Валеева, С.В. Котова, Д.А. Семанов, В.З. Латыпова // Материалы Международной научно-практической конференции «Химия и экология: развитие науки и образования». – Москва, 2010. – С. 114-117.
5. **Ахметзянова Л.Г.** Лабораторное моделирование рекультивации нефтяного загрязнения / **Л.Г. Ахметзянова** // Сборник трудов научной конференции II Международной научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы науки и техники». Том I. – Уфа: Нефтегазовое дело, 2010. - С.76-77.
6. **Ахметзянова Л.Г.** Влияние серой лесной почвы, загрязненной сернистой нефтью, на продуктивность почв / **Л.Г. Ахметзянова** // Материалы II Международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Прогрессивные технологии и перспективы развития». – Тамбов: Изд-во ООО «ТР-принт», 2010. - С. 86-88.
7. **Ахметзянова Л.Г.** Оценка допустимого содержания нефтепродуктов в почве с использованием пшеницы посевной (*Triticum sativum*) / **Л.Г. Ахметзянова** // Сборник научных статей II Всероссийской научно-практической заочной конференции «Колбасовские чтения: Современные проблемы экологического права и природоохранного законодательства: вопросы теории и практики» / Под ред. А.В. Димитриева, Е.А. Синичкина. – Чебоксары: типография «Новое время», 2010. – С. 59-60.
8. **Ахметзянова Л.Г.** Биогеохимические аспекты экологической безопасности продуктов растениеводства / Г.Р. Валеева, **Л.Г. Ахметзянова**, И.В. Леонтьева // Материалы 1-го экологического форума Прикамья. - Набережные Челны: Издательско-полиграфический центр Камской государственной инженерно-экономической академии, 2007. - С.78-79.