

4. Maschenko E.N., Gablina S.S., Tesakov A.S., Simakova A.N. The Sevsk woolly mammoth (*Mammuthus primigenius*) site in Russia: Taphonomic, biological and behavioral interpretations // *Quaternary international*. – 2006. – V. 142–143. – P.147–165.

5. Лазарев П.А. Крупные млекопитающие антропогена Якутии. – Новосибирск: Наука, 2008. – 160 с.

6. Лазарев П.А., Боекорев Г.Г., Томская А.И. и др. Млекопитающие антропогена Якутии. – Якутск: ЯНЦ СО РАН, 1998. – 167 с.

Поступила в редакцию 04.02.2013

УДК 631.311.8:5796 (571.55)

Разработка биологического способа восстановления нефтезагрязненных мерзлотных почв

М.М. Неустроев

*Разработан эффективный биологический способ очищения нефтезагрязненных мерзлотных почв с применением аборигенных нефтеокисляющих штаммов бактерий *Bacillus subtilis*.*

Ключевые слова: нефть, почва, восстановление, штаммы бактерий *Bacillus subtilis*, овсяница красная «Мюрюнская», птичий помет.

*An effective biological method to clean oil-contaminated permafrost soils using local oil oxidizing bacteria strains *Bacillus Subtilis* is worked out.*

Keywords: oil, soil, restoration, strains of bacteria *Bacillus Subtilis*, red fescue *Murunsкая*, bird's droppings.

Трудно переоценить значение микроорганизмов в круговороте веществ, который осуществляется в природе. В результате способности воздействовать на разнообразные субстраты, нередко накапливая при этом в среде те или иные продукты метаболизма, и быстро расти в разных условиях микроорганизмы вызывают существенные изменения в окружающей среде. Они играют важнейшую роль в превращении многих веществ в почве и водоемах, участвуют в формировании и разрушении месторождений ряда полезных ископаемых, а также других природных процессах. Без многих процессов, которые осуществляют микроорганизмы в природе, жизнь на Земле давно бы прекратилась или приняла другие формы. Наглядным примером значения микроорганизмов в природе является их активное участие в разложении в почве органических веществ. В результате деятельности микроорганизмов происходит также освобождение окружающей среды от ряда загрязняющих и ядовитых веществ, в частности пестицидов [1].

Увеличение объемов нефти, строительство нефтепроводов и нефтеперерабатывающих заводов приводят к возрастанию риска загрязнения окружающей среды нефтью и нефтепродук-

тами. Почвы, которые обладают огромной адсорбирующей способностью, аккумулируют в себе большую часть нефтяных загрязнений, изменяются их физические, агрохимические и микробиологические характеристики. В результате снижается эффективность и значимость сельскохозяйственных угодий. Нефть и многие продукты ее переработки чрезвычайно токсичны, канцерогенны и персистентны, т.е. разрушаются крайне медленно, в частности в Сибири с ее холодным климатом.

Восстановление почвы – сложный и длительный процесс, так как из трех основных составляющих природной среды компонентов – почвы, воды, воздуха – именно почва способна аккумулировать и закреплять токсические вещества. Особенно проблематично восстановление нефтезагрязненных мерзлотных почв в суровых природно-климатических условиях Крайнего Севера.

Нефть и нефтепродукты вызывают депрессию функциональной активности флоры и фауны. И это воздействие в природно-климатических условиях Якутии усугубляется присутствием в почвенном профиле длительной сезонной мерзлоты. При высокой степени нефтезагрязнения ингибируется жизнедеятельность большинства микроорганизмов, включая их ферментативную активность. Поэтому управление процессами биodeградации нефтепродуктов должно быть направлено, прежде всего, на активизацию мик-

робных сообществ и создание оптимальных условий их существования [2].

В последние годы широко используются микробиологические методы рекультивации, основанные на применении высокоэффективных штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов. Важнейшим фактором, влияющим на активность процесса разрушения углеводов в почве нефтеокисляющими микроорганизмами, являются почвенно-климатические условия. Эффективная деструкция углеводов микроорганизмами, внесенными в почву, возможно лишь в тех случаях, когда они найдут в почве благоприятные условия для жизнедеятельности и развития [3].

Изучение литературных источников показывает, что в последние десятилетия взамен сокращения минеральных удобрений и химических средств отмечаются активный поиск и разработка высокоэффективных универсальных микробных препаратов, конструированных из полезных эндофитных и ризосферных бактерий. Действующим началом микробных препаратов чаще являются представители родов *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Rhizobium*, продуцирующие различные вторичные метаболиты [4–7]. Среди них особый интерес представляют бактерии рода *Bacillus*, которые составляют от 30 до 36% микробной ризосферной и эндофитной популяции [8]. В микробиоценозе мерзлотных почв Якутии доминируют бактерии рода *Bacillus*, которые являются одной из перспективных групп в биотехнологии [9]. Следовательно, поэтому очень важно изучение их нефтеокисляющих свойств, так же при восстановлении нефтезагрязненных почв используют травянистые растения (овсяницы, пыреи, мятлики и т.д.), которые улучшают структуру и увеличивают воздухопроницаемость почв. При подборе растений, используемых при фиторекультивации нефтезагрязненных земель, также необходимо учитывать их устойчивость к нефти и приспособленность к местным почвенно-климатическим условиям [10].

Исходя из вышеизложенного, разработка эффективных биологических способов восстановления нефтезагрязненных почв в условиях Крайнего Севера с изысканием и использованием аборигенных нефтеокисляющих бактерий крайне актуальна.

Материалы и методы

Научно-исследовательская работа проводилась на кафедре ВМСБиОХ БГФ СВФУ им. М.К. Аммосова, в лаборатории по разработке микробных препаратов ГНУ ЯНИИСХ Россель-

хозакадемии, определение нефти и нефтепродуктов – в ГБУ РИАЦЭМ при МОП РС(Я) и ИПНГ СО РАН.

Определение количества микробных клеток проводили методом посева на твердые среды (чашечный метод Коха), который предусматривал приготовление разведений, проведение посева поверхностным способом, подсчет выросших колоний. В качестве питательных сред использовали мясо-пептонный агар (МПА) для определения общего числа микроорганизмов и спорообразующих аэробных бактерий (после прогрева до 80 градусов в течение 15 мин); среду Чапека – для микроскопических грибов; Эндо – для энтеропатогенов; среду Байерд-Паркера – для стафилококков; среду с бромтимоловым синим – для иерсиний.

Количество микроорганизмов определяли в колониеобразующих единицах (КОЕ) в 1 г почвы. Родовую и видовую идентификацию микроорганизмов проводили согласно «Справочнику по микробиологическим, вирусологическим методам исследований» (1982 г.), «Определителю бактерий по Берджи» (1997 г.), «Практикуму по микробиологии» (1987 г.), так же использовали «Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий группы *Bacillus subtilis* – *mesentericus* из организма человека и животных» (1980 г.). Отбор и подготовку почвенных образцов проводили согласно «Методам почвенной микробиологии и биохимии» (1991 г.).

Поставлены микровегетационные опыты в лабораторных и полевых условиях с целью разработки способов восстановления нефтезагрязненных почв с применением аборигенных штаммов бактерий рода *Bacillus*.

Результаты и обсуждения

При выполнении НИР испытано 23 штамма бактерий рода *Bacillus*, выделенных из мерзлотных почв и палеомикрофлоры. В результате проведенных исследований отобраны и испытаны (в лабораторных опытах, проведенных на почвенном субстрате) в качестве нефтедеструкторов 6 штаммов бактерий рода *Bacillus*: *Bac. mycoideus*, *Bac. pumilus*, *Bac. subtilis* ТНП–3, *Bac. subtilis* ТНП–5, *Bac. subtilis* Оймякон 6/1, *Bac. subtilis* Колыма 7/2к. Проведенные лабораторные опыты показали, что наиболее выраженными нефтеокисляющими свойствами обладают *Bacillus subtilis* Колыма 7/2к и *Bacillus subtilis* Оймякон 6/1. В качестве биотеста, характеризующего степень рекультивации, а также возможного активного агента фитомелиорации, использовали районированный сорт овсяницы красной «Мюрюнская», любезно предос-

тавленной зав. лабораторией селекции и семеноводства многолетних трав ЯНИИСХ, к.с.-х.н. А.Г. Емельяновой.

Полевые опыты заложены на мерзлотной дерново-луговой почве в разнотравном злаковом лугу, вблизи (250 м) от естественного водоема в пригороде г. Якутска. Опыты начаты 18.06.2009 г. Разметили 18 квадратов по $0,5 \text{ м}^2$, которые внесли нефть из расчета $600 \text{ мл}/0,5 \text{ м}^2$. Повторность опыта трехкратная. В качестве органического носителя нефтеокисляющих бактерий использовали птичий помет из расчета 15 т/га или $375 \text{ г}/0,5 \text{ м}^2$. В качестве нефтеокисляющих микроорганизмов использовали предварительно отобранные штаммы бактерий *Bacillus subtilis* Оймякон 6/1 и *Bacillus subtilis* Колыма 7/2к, суспензии которых наносили методом мелкокапельного распыления на птичий помет из расчета $5 \times 10^9 \text{ КОЕ/мл}$ в дозе 500 мл на 375 г .

Варианты опыта:

1. Нефть + птичий помет + суспензия штамма *Bacillus subtilis* Колыма 7/2к (500 мл).
2. Нефть + птичий помет + суспензия штамма *Bacillus subtilis* Оймякон 6/1 (500 мл).
3. Нефть + птичий помет + суспензия штаммов *Bacillus subtilis* Оймякон 6/1 и *Bacillus subtilis* Колыма-7/2к (по 250 мл).
4. Нефть + суспензия штамма *Bacillus subtilis* Колыма /2к (250 мл).
5. Нефть + суспензия штамма *Bacillus subtilis* Оймякон 6/1 (250 мл).
6. Нефть (контроль).

С 1-го по 3-й варианты были перекопаны и посажена в качестве биотеста овсяница красная «Мюрюнская» по 50 семян на $0,5 \text{ м}^2$.

Взяты пробы почвы до и после заражения нефтью для микробиологических и в конце летнего сезона для химических исследований. Вели наблюдения в течение лета. 30.06.2009 г. посадили овсяницу, первые редкие всходы замечены 17.07.2009 г. у варианта 1. К концу июля появились также единичные всходы у вариантов 2, 3, отмечен единичный рост пырея (варианты 4, 5).

Во всех вариантах после загрязнения нефтью в течение лета не наблюдалось роста растений, кроме редкого роста овсяницы. В предварительных лабораторных микровегетационных опытах установлено, что применение аборигенных штаммов бактерий *Bacillus subtilis* ТНП-3 и *Bacillus subtilis* Оймякон 6/1 в сочетании с фиторекультивацией (посевом районированного сорта овсяницы красной «Мюрюнская») эффективно для очищения при невысоком ($49,8 \text{ г/кг}$) уровне загрязнения почвы нефтью. В наших опытах районированный сорт овсяницы красной



Единичные всходы овсяницы



Единичный рост пырея

«Мюрюнская» проявил толерантность к нефтезагрязнению, достигающему до $49,8 \text{ г/кг}$. Полученные результаты показывают, что в полевых опытах применено значительное загрязнение нефтью (до $135,143 \text{ г/кг}$), что оказывало ингибирующее воздействие на рост растений, включая биотест – овсяницу красную «Мюрюнская». Следует отметить, что у всех вариантов (с 1 по 5), обработанных птичьим пометом и микроорганизмами, к концу летнего периода не установлено запаха нефтепродуктов, в отличие от контроля (вариант 6). Результаты химических исследований почвы представлены в табл.1.

По результатам химических анализов почвы, взятых в конце сезона (сентябрь), за три месяца рекультивации с применением спорообразующих аэробных бактерий рода *Bacillus* в дозе $5 \times 10^9 \text{ КОЕ/мл}$ при расходе $250 - 500 \text{ мл/м}^2$, инокулированных на птичьем помете (из расчета 15 т/га) и без него, как показывает данные табл.1, содержание нефтепродуктов в почве снизилось до $645 - 102898 \text{ мг/кг}$. В контрольном варианте

Т а б л и ц а 1

**Результаты аналитических работ по количественному определению нефти
в почвенных пробах методом хлороформенной экстракции**

№	Условия опыта	Выход ХБ, %	Содержание НП, мг/кг	Снижение уровня загрязнения, %
1	Нефть+птичий помет + суспензия штамма <i>Bacillus subtilis</i> Колыма 7/2к 500	0,2273	2273	98,32
2	Нефть+птичий помет + суспензия штамма <i>Bacillus subtilis</i> Оймякон 6/1 500 мл	6,3103	63103	53,26
3	Нефть+птичий помет + суспензия штамма <i>Bacillus subtilis</i> Оймякон 6/1 и Колыма 7/2к (по 250 мл)	0,0847	847	99,38
4	Нефть+ суспензия штамма <i>Bacillus subtilis</i> Колыма 7/2к (250 мл)	0,0645	645	99,53
5	Нефть+ суспензия штамма <i>Bacillus subtilis</i> Оймякон 6/1 (250 мл)	10,2895	102895	23,8
6	Нефть (контроль)	13,5143	135143	

Примечание. ХБ – хлороформенный битумоид (экстракт), НП – нефтепродукты.

Т а б л и ц а 2

Результаты микробиологических исследований, КОЕ/г

№	Пробы для исследования	Общее микробное число	Спорообразующие бактерии	Эшерихии		Стафилококки		Иерсинии	Грибы
				Л +	Л -	патогенные	непатогенные		
1	Почва до загрязнения 18.06.09	$13,7 \times 10^3$	$35,0 \times 10^4$	$65,3 \times 10^2$	-	$3,3 \times 10^2$	-	-	-
2	Почва после загрязнения 24.06.09	$73,5 \times 10^4$	-	$97,4 \times 10^2$	-	$4,3 \times 10^2$	-	-	-

опыта, где нефтезагрязненная почва без обработки (вариант 6), содержание нефтепродуктов составляет 135143 мг/кг. Наилучшие результаты восстановления почвы от нефтезагрязнений получены в варианте 4 при применении суспензии штаммов бактерий *Bacillus subtilis* Колыма 7/2к из расчета 250 мл/м², деструкция нефти за три месяца достигла 645 мг/кг или составила 99,53%, а использование в сочетании с птичьим пометом (вариант 1) привело к снижению уровня загрязнения нефтепродуктами до 2273 мг/кг или 98,32%. Положительные результаты получены и при сочетании штаммов бактерий *Bacillus subtilis* Колыма 7/2к и *Bacillus subtilis* Оймякон 6/1, содержание нефтепродуктов при их применении снизилось до 847 мг/кг или деструкция нефти составила 99,38%.

Как показывает данные табл.2, после загрязнения почвы нефтью резко возросло в 53,6 раза общее микробное число, совершенно исчезли споровые формы спорообразующих аэробных бактерий, также отмечено небольшое увеличение количества эшерихий и стафилококков. На МПА, используемой для определения общего микробного числа, росли колонии, которые по культуральным свойствам соответствовали росту спорообразующих аэробных бактерий. При микроскопии колоний обнаружены грамположительные подвижные палочки, которые в последующем образовывали споры, были каталазоположительны и обладали всеми свойствами, типичными для спорообразующих аэробных бактерий рода *Bacillus*. Таким образом, при нефтяном загрязнении совершенно исчезли спо-

рообразующие аэробные бактерии в споровой (покоящийся) форме, и одновременно резко увеличилось количество этих бактерий в вегетативно-активной форме. Спорообразующие аэробные бактерии активно вырабатывают биологически активные вещества в вегетативной форме [11]. Следовательно, после загрязнения нефтью в почве резко возрастает количество спорообразующих бактерий рода *Bacillus* в вегетативной форме, и этот феномен отмечен нами впервые.

Полученные результаты исследований позволяют сделать вывод, что спорообразующие аэробные бактерии рода *Bacillus*, которые доминируют в микробиоценозе мерзлотных почв, обладают нефтеокисляющими свойствами и участвуют в процессе самоочищения мерзлотных почв от нефтяных загрязнений.

Результаты наших исследований согласуются с мнением других исследователей, что в условиях нефтяного стресса увеличивается число углеводородокисляющих микроорганизмов, прежде всего, *Pseudomonas* и *Bacillus*, которых и используют в качестве биопрепаратов при восстановлении [12].

Таким образом, исходя из результатов полевых опытов, можно заключить, что дополнительное введение эффективных, аборигенных нефтеокисляющих бактерий рода *Bacillus* не только усилило, но и ускорило естественный процесс самоочищения почвы от нефти.

На основании проведенных исследований штаммы бактерий *Bacillus subtilis* Колыма 7/2к и *Bacillus subtilis* Оймякон 6/1 паспортизированы

и депонированы во Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии (г. Санкт-Петербург), как перспективные для восстановления нефтезагрязненных мерзлотных почв.

Научная новизна разработки подтверждена получением патента РФ под №2446900 «Способ очистки мерзлотных почв от нефти спорообразующими бактериями *Bacillus subtilis*», зарегистрированного в Государственном реестре изобретений РФ 10.04.2012 г.

Литература

1. Заварзин Г.А. Лекции по природоведческой микробиологии. – М.: Наука, 2003. – 208 с.
2. Легостаева Я.Б. Показатели состояния мерзлотных почв при вторичном загрязнении нефтепродуктами / Я.Б. Легостаева, Б.С. Боесков // Наука и образование. – 2009. – №2. – С.16–21.
3. Ермоленко З.М. Влияние некоторых факторов окружающей среды на выживаемость внесенных бактерий, разрушающих нефтяные углеводороды / З.М.Ермоленко, В.А.Чугунов, В.Н.Герасименко // Биотехнология. – 1997. – №5. – С.10–18.
4. Петров В.Б. Микробиологические препараты в биологизации земледелия России / В.Б.Петров, В.К.Чеботарь, А.Е. Казаков // Достижения науки и техники АПК. – 2002. – №10. – С.16–20.
5. Compant S. Use of PGPR for biological control of plant diseases: principles, mechanisms of action and future prospects / S. Compant, B.Duffy, J.Nowak e.a Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – №9. – P.4951–4959.
6. Montesions E. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection // International Microbiology. – 2003. – №6. – P. 245–252.
7. Тихонович И.А. Кооперация растений и микроорганизмов: новые подходы к конструированию экологически устойчивых агросистем / И.А. Тихонович, Н.А. Проворов // Усп. совр. биологии. – 2007. – №4. – С.339–357.
8. Чеботарь В.К. Биохимические критерии оценки агрономически значимых свойств бацилл, используемых при создании микробиологических препаратов / В.К. Чеботарь, В.Б. Петров, А.И. Шапошников, Л.В. Кравченко // Сельскохозяйственная биология. – 2011. – №3. – С.119–122.
9. Тарабукина Н.П. Ветеринарно-санитарные мероприятия при инфекционных болезнях животных в условиях РС(Я) / Н.П.Тарабукина, М.П.Неустроев. – Якутск, 2000. – 191 с.
10. Гендрин А.Г. Экологическое сопровождение нефтегазовых месторождений / А.Г. Гендрин, Г.А. Надаховская, Т.Н.Сидоренко, Ю.П. Мыльников и др. – Новосибирск, 2005. – 112 с.
11. Смирнов В.В. Спорообразующие аэробные бактерии – продуценты биологически активных веществ / В.В. Смирнов, С.Р. Резник, И.П. Василевская. – Киев, 1982. – 270 с.
12. Киреева Н.А. Влияние загрязнения почв нефтью на физиологические показатели растений и ризосферную микробиоту / Н.А. Киреева, Е.И. Новоселова, А.С. Григориади // Агрохимия. – 2009. – №7. – С.71–80.

Поступила в редакцию 21.12.2012

УДК 634.738(571.56)

Особенности возрастных структур ценопопуляций брусники в лиственничных лесах Центральной Якутии

А.В. Татаринова

Приводятся результаты исследований возрастной структуры и урожайности ценопопуляции брусники обыкновенной (*Vaccinium vitis-idaea* L.). Дана оценка урожайности ценопопуляций брусники в зеленомошно-брусничном и разнотравно-брусничном лиственничниках Хангаласского улуса.

Ключевые слова: брусника обыкновенная, ценопопуляция, растительность, возрастная структура, урожайность, лиственничник.

The results of investigations of age structure and productivity of cowberry (Vaccinium vitis-idaea) cenopopulation in Hangalassky raion of Yakutia are presented. The estimation of the cowberry cenopopulation productivity for green-moss-cowberry and different grass-cowberry larch forests is given.

Key words: *Vaccinium vitis-idaea*, cenopopulation, vegetation, age structure, productivity, larch forest.

Важной характеристикой ценопопуляций является возрастной (онтогенетический) спектр,

который представляет собой результат внутрипопуляционного распределения особей по возрастным (онтогенетическим) состояниям. Определенное соотношение возрастных групп в ценопопуляциях дает достаточно четкое представление об общем жизненном состоянии популя-

ТАТАРИНОВА Айталиа Владимировна – н.с. отдела экологии северных городов АН РС(Я), aita_bgf@mail.ru.