

1. Введение. Загрязнение почв земель лесного фонда нефтью и продуктами ее трансформации ведет к потере биопродуктивности, деградации ландшафтов, надолго выводит природные территории из хозяйственного использования. Необходимость восстановления земель, требует экспериментального определения концентраций загрязнителя, при которых сохраняется способность природных экосистем к самовосстановлению, установления критериев позволяющих не только экологически, но и экономически обосновано применять различные методы ликвидации последствий нефтяных разливов, обеспечивающих скорейшее восстановление свойств почв, их возврат в хозяйственный оборот. Исходя из вышесказанного разработка нормативов допустимого остаточного содержания нефти и продуктов ее трансформации в почвах (ДОСНП), является необходимым этапом, обеспечивающим эффективное и своевременное проведение рекультивационных и иных восстановительных работ. Норматив ДОСНП должен исключать возможность поступления загрязнителей в сопредельные среды и допускать вовлечение земельных участков в хозяйственный оборот с возможными ограничениями [1]. Учитывая сложность изучаемых объектов исследования, направленные на разработку нормативов ДОСНП, должны опираться на данные о совокупности свойств почвы и биологических процессов, обуславливающих детоксикацию и разложение нефти и нефтепродуктов (НП) в почве с учетом целевого назначения земель [2, 3, 4, 5]. Целью настоящей работы являлось получение экспериментальных данных для обоснования и разработки нормативов ДОСНП после проведения рекультивационных и иных восстановительных работ для почв лесного фонда Республики Татарстан.

2. Экспериментальная часть. При проведении лабораторных экспериментов использовались образцы дерново-подзолистых (ДП), светло-серых лесных (ССЛ), серых лесных (СЛ), темно-серых лесных (ТСЛ), дерново-карбонатных выщелоченных (ДКВ), дерново-карбонатных оподзоленных (ДКО) почв и черноземов оподзоленных (ЧО) фоновых (контрольных) и загрязненных сернистой нефтью почв (горизонты А). Опытные варианты с заданными концентрациями НП готовились путем смешивания в различных соотношениях загрязненных и фоновых образцов соответствующих почв. Концентрация НП в опытных образцах почв в экспериментах варьировала от 0,47 до 35,70 г/кг. Микробиологические исследования выполнены с использованием общепринятых методов почвенной микробиологии [6,7]. Численность микроорганизмов оценивали методом посева почвенной суспензии на жидкие (метод предельных разведений) и плотные (чашечный метод Коха) питательные среды, с последующим подсчетом выросших колоний [7]. Определяли: общую численность микроорганизмов (ОМЧ), численность спорообразующих и углеводородокисляющих (УОМ) микроорганизмов, азотофиксаторов, нитрификаторов, актиномицетов, микромицетов при различных уровнях остаточного содержания нефти в почве. Зоотестирование почв осуществляли в

соответствии с [8]. В качестве тест-объекта использовали рекомендованный стандартом вид - *Enchytraeus crypticus*. Подготовку водной вытяжки из почв и биотестирование на *Ceriodaphnia affinis* и *Paramecium caudatum* проводили согласно [9, 10]. Дыхательную активность и коэффициент микробного дыхания (QR) определяли аналогично [3]. Определение каталазной активности почвы проводили согласно [11], уреазной согласно [12]. Активность каталазы выражали в мг H_2O_2 /г почвы, уреазы в мкгN/г·час. Вегетационные хронические эксперименты проводили в соответствии с [13]. В качестве тест-объектов использовали два вида растений пшеницу яровую (*Triticum vulgare*) и горох посевной (*Pisum sativum*). Всхожесть использованных семян составляла 95%. Диапазон концентраций НП в опытных вариантах рассматриваемых почв для хронических экспериментов определялся по результатам предварительного тестирования в острых опытах с использованием в качестве тест-объекта семян пшеницы яровой (*Triticum vulgare*). Постановка хронических вегетационных экспериментов осуществлялась в лабораторных условиях при 16-ти часовом освещении «фитолампами» с интенсивностью 6000+1000 Лк. Температура окружающего воздуха составляла 23-26° С. Влажность почвы поддерживалась на уровне 60% от полной влагоемкости. Для выравнивания условий местоположение вегетационных сосудов ежедневно меняли. Конечный учет сухой биомассы растений проводили на 42 день после появления всходов пшеницы и гороха [13]. Для поиска действующих значений использовали регрессионный анализ, который проводили при условии, что статистически отличающимися от контроля являются не менее 3 значений рассматриваемых концентраций.

3. Результаты и обсуждение

3.1 Физико-химические свойства исследуемых почв Согласно гранулометрическому составу исследуемые почвы относятся к тяжелосуглинистым и глинистым. Почвы характеризуются высоким и средним содержанием органического вещества. Анализ обеспеченности питательными элементами выявил повышенное содержание подвижного фосфора в ДП, ССЛ и СЛ почвах, относительно низкое в ДКВ и ДКО, ТСЛ почвах и черноземе оподзоленном ЧО. Содержание подвижного калия в почвенных образцах, кроме ЧО, было высокое.

3.2. Влияние концентрации НП на численность микроорганизмов Для микрофлоры почвы НП выступают с одной стороны, как источник углерода, а с другой - как загрязняющие вещества с токсичными свойствами [14]. В связи с этим их поступление в почву может, как стимулировать, так и угнетать жизнедеятельность микроорганизмов [15, 16]. Реакция почвенной биоты на загрязнение нефтью зависит от дозы загрязнителя, почвенно-климатических условий и различается для разных групп почвенных микроорганизмов [17]. Согласно [18], «пороговой является та концентрация нормируемого вещества, которая вызывает любые достоверные отрицательные изменения нескольких показателей (более 1)». Для микробиологических показателей действующей концентрацией химического вещества считают ту,

которая оказывает выраженное угнетающее действие не менее чем на 50% по отношению к контролю. Полученные результаты позволили сделать вывод, что по микробиологическим показателям действующими концентрациями НП для ДП почв являются концентрации выше 11,41 г/кг, ДКВ - выше 5,74 г/кг, ССЛ - выше 8,00 г/кг, ТСЛ выше 4,98 г/кг, ЧО - выше 9,95 г/кг. Для СЛ, ДКО почв по микробиологическим показателям во всем испытанном диапазоне концентраций (до 14,1 и 11,47 г/кг, соответственно) не зафиксированы одновременные достоверные отрицательные изменения более чем по одному показателю (рис. 1).

Рис. 1 - Численность микроорганизмов при варьировании содержания НП в дерново-карбонатной оподзоленной почве (кратность отклонения от контроля, раз)

3.3 Определение плодовитости *E. crypticus* в хронических опытах

Почвообитающие животные успешно используются в системе мониторинга почв, как высокочувствительные индикаторы их состояния. Исследования последних десятилетий, показали, что представители семейства *Enchytraeidae* являются наиболее подходящими при оценке условий обитания живых организмов в почве.

Анализ полученных на *Enchytraeus crypticus* экспериментальных данных не выявил влияния максимально испытанных (ДКВ и ДКО - 11.47 г/кг, ДП - 11.41 г/кг, ССЛ и СЛ - 5.20 г/кг, ТСЛ - 4.98 г/кг, ЧО - 9.95 г/кг) концентраций на плодовитость тест-объекта. Рассчитанные критерии Фишера не превышали стандартных табличных значений, что указывало на отсутствие достоверной разницы между рассматриваемыми концентрациями для исследованных типов почв и, вероятно, связано отсутствием в рекультивированных испытуемых образцах легких фракций нефти [19].

3.4 Влияние водной вытяжки из почв на выживаемость гидробионтов

При биотестировании водной вытяжки из почв на равноресничной инфузории *Paramecium caudatum*, при всех испытанных концентрациях нефтепродуктов в изучаемых образцах почв (максимальные ДКВ и ДКО - 11,47 г/кг, ДП - 22,83 г/кг, ССЛ - 35,70 г/кг, СЛ - 14,10 г/кг, ТСЛ - 14,93 г/кг, ЧО - 14,93 г/кг) токсическое действие водной вытяжки не было выявлено.

Анализ токсичности по отношению *Ceriodaphnia affinis* показал, что эффект острого токсического действия (смертность 50% и более тест-организмов) проявляется только на водной вытяжке из серой лесной почвы, содержащей НП в концентрации 14,1 г/кг.

3.5 Биохимическая активность почв

3.5.1 Параметры дыхательной активности почв

Почвенное дыхание является интегральным показателем, адекватно отражающим состояние почв. Величины базального и субстратного дают представление о запасах и доступности питательных веществ, активности почвенного микробного сообщества, его устойчивости к присутствующим поллютантам, позволяя тем самым определить экологическое состояние почвы. К числу значимых эколого-физиологических показателей, отражающих состояние почв, относится коэффициент микробного дыхания (QR), который вычисляется из значений базального и субстрат-индуцированного дыхания почв [20]. Результаты представленных в работе и ранее проведенных

экспериментов [2-5, 21] позволили сделать вывод, что значения QR на уровне 0,3-0,5 определяют не только активное протекание процессов минерализации органики в нефтезагрязненных почвах, но и обеспечивают быстрое устранение разбалансированности и восстановление стабильности почвенного микробного сообщества. Анализ опытных величин QR показал, что в загрязненных образцах ДП и ДКВ почв, даже при концентрациях НП выше 11,0 г/кг они не превышали значения 0,4, что свидетельствует о сохранении активности почвенного биоценоза, достаточно высокой его устойчивости к испытанным концентрациям поллютанта. Согласно общепринятым представлениям [22, 23], такие значения QR отражают достаточно благополучное состояние почвенных сообществ. Рассматривая значения QR чистых и нефтезагрязненных ССЛ, СЛ, ДКО почв и ЧО образцы, в которых содержание НП варьирует в интервале от 5,0 до 5,7 г/кг ($QR = 0,30-0,46$), можно считать испытывающими «незначительное антропогенное воздействие». При более высоких концентрациях поллютанта коэффициент микробного дыхания составлял 0,65-1,12, что указывало на «разбалансированность» происходящих в почвенных микробиоценозах процессов. Значения QR в образцах загрязненной ТСЛ почвы, содержащей до 14,93 г/кг НП, варьировали в интервале от 0,22 до 0,46 и характеризовали активную минерализацию нефтяных компонентов, при достаточно высокой устойчивости микробного пула почвы.

3.5.2 Параметры ферментативной активности почв

Немаловажную роль в процессе детоксикации и минерализации УВ нефти играет ферментативная активность почвенного микробиоценоза. В многочисленных работах [24-27] продемонстрировано, что активность ферментов является чутким индикатором уровня загрязненности почв, отражает интенсивность протекания основных биохимических процессов. По динамике ферментативных реакций, может быть спрогнозирована активность и состояние почвенного микробиоценоза с окислительно-восстановительными процессами, происходящими при участии ферментов, в том числе и каталазы, связан распад нефтяных углеводов. Активность каталазы в почве зависит от степени и срока загрязнения, вида нефтепродукта, типа почвы [24, 25, 28]. По данным ряда авторов, на ранних сроках загрязнения почвы нефтью почвах активность каталазы снижается [25, 26, 28, 29]. Активность уреаз является одним из важнейших показателей биологической активности почв [30], т.к. они, во-первых, меньше подвержены воздействию других экологических факторов а, во-вторых, прослеживается четкая зависимость их активности от степени загрязнения почв [25]. Проведенные эксперименты показали, что в опытах на ДП, ССЛ, СЛ, ТСЛ и ЧО во всем испытанном диапазоне концентраций поллютанта не наблюдается ингибирования каталазной активности (рис. 2). Что касается ДКО почвы, то при концентрации нефтепродуктов выше 5,74 г/кг ее каталазная активность подавлялась. Каталазная активность ДПВ почвы практически не менялась во всем испытанном диапазоне концентраций НП. Снижение

активности фермента более чем на 25% зафиксировано при концентрациях НП 5,74 и 9,95 г/кг (рис. 2). Экспериментальные данные продемонстрировали, что увеличение концентрации НП в ДП, ССЛ, ТСЛ ДКО, ДКВ и ЧО способствовало росту уреазной активности (рис. 3). В случае с СЛ почвой повышение концентрации НП до 4,98 г/кг и выше приводило к 9-14% снижению активности фермента. Рис. 2 - Каталазная активность почв при различном содержании НП
 Рис. 3 - Уреазная активность почв при различном содержании НП

3.6 Определение фитопродуктивности растений в хронических вегетационных опытах В хронических экспериментах, наиболее высокая урожайность пшеницы была отмечена в вариантах с ТСЛ и ДКО почвами. Максимальный прирост биомассы гороха был отмечен на ДКО, СЛ и ДП почвах. Минимальная урожайность, как на горохе, так и на пшенице была зафиксирована на ЧО. В целом для всех вариантов опыта была характерна обратная зависимость между урожайностью растений и содержанием НП в почве. При определении действующих концентраций, приводящих к 50% снижению урожайности (ДК50) использовался регрессионный анализ. Полученные уравнения и рассчитанные концентрации представлены в табл. 1. Таблица 1 - Расчет концентраций НП в почвах (г/кг), приводящих к 50% снижению урожайности растений

Тип	Пшеница	Горох
Уравнение ДК50	$y = -0,0579x + 0,5371$	$y = -0,0527x + 0,9681$
ДП	4,87	4,91
ССЛ	$y = -0,0481x + 0,3708$	$y = -0,0481x + 0,3708$
ДКВ	4,81	4,81
ТСЛ	$y = -0,0743x + 0,7674$	$y = -0,0743x + 0,7674$
ДКО	4,83	4,83
ЧО	$y = -0,0136x + 0,3315$	$y = -0,0136x + 0,3315$
ДКО	10,16	10,16
ДКВ	$y = -0,0193x + 0,7611$	$y = -0,0193x + 0,7611$
ДКО	16,54	16,54
ЧО	$y = -0,052x + 0,6162$	$y = -0,052x + 0,6162$
ДКО	6,17	6,17
ЧО	$y = -0,036x + 0,663$	$y = -0,036x + 0,663$
ДКО	14,16	14,16
ЧО	$y = -0,0313x + 0,2951$	$y = -0,0313x + 0,2951$
ДКО	4,80	4,80
ЧО	$y = -0,0868x + 0,7997$	$y = -0,0868x + 0,7997$
ДКО	4,72	4,72
ЧО	$y = -0,0524x + 0,5472$	$y = -0,0524x + 0,5472$
ДКО	5,15	5,15
ЧО	$y = -0,0953x + 0,9073$	$y = -0,0953x + 0,9073$
ДКО	4,80	4,80
ЧО	$y = -0,0227x + 0,275$	$y = -0,0227x + 0,275$
ДКО	6,40	6,40
ЧО	$y = -0,035x + 0,5205$	$y = -0,035x + 0,5205$
ДКО	4,75	4,75

Для ДП, ССЛ, ДКВ и ДКО односемядольное (пшеница) и двусемядольные (горох) растения характеризовались сопоставимой чувствительностью к поллютанту. В вариантах с ЧО горох, а в вариантах с СЛ, ТСЛ почвами пшеница проявляли более высокую чувствительность к присутствию НП в почве.

3.7 Критерии для расчета нормативов допустимого остаточного содержания нефти и продуктов ее трансформации для земель лесного фонда Нормативы ДОСНП устанавливаются с учетом вида дальнейшего использования земельных участков после проведения рекультивационных и иных восстановительных работ [1]. При их разработке для земель лесного фонда должны учитываться их устойчивость к негативным факторам, способность к самоочищению за счет активного протекания химических и биологических процессов деструкции нефти и нефтепродуктов, сохранение основы почвенного биоценоза и поддержание его жизнедеятельности при условии отсутствия токсикологического и иного воздействия на сопредельные среды и территории. Основываясь на этих и ранее полученных данных [2-5, 21], в основу расчета норматива ДОСНП для земель лесного фонда Республики Татарстан были положены следующие постулаты и критерии: 1. Для нормирования необходимо установить концентрации НП в почвах и грунтах, выше которого почва не может

сама справиться с загрязнением, когда ее потенциал самоочищения не работает.

2. Пороговой является та концентрация нормируемого вещества, которая вызывает любые достоверные отрицательные изменения нескольких показателей (более 1): для микробиологических показателей, которые учитываются методом посева почвенной суспензии, действующей считается концентрация, оказывающая выраженное действие не менее чем на 50% по отношению к контролю; для биохимических показателей действующей считается концентрация ингибирующая активность на 25% и более [18]. 3. Значения коэффициента микробного дыхания (QR) на уровне 0,3-0,5 определяют активное протекание процессов минерализации органических веществ (в т.ч. нефтяных углеводов) в почве, при незначительной разбалансированности и достаточно высокой стабильности почвенного микробного сообщества [3, 4, 5]. 4. По динамике ферментативных реакций, являющихся чутким индикатором уровня загрязненности почв, может быть спрогнозирована активность и состояние почвенного микробоценоза [24-27]. 5. Рекомендуемая концентрация нефтепродуктов в почве не влияет на процессы самоочищения и почвенный микробоценоз и обуславливает переход этого вещества в подземные и поверхностные воды в количестве, не превышающем ПДК для воды [2, 4, 18]. 6. При рекомендуемых концентрациях НП не должно происходить кардинальных изменений комплекса почвенных свойств, обуславливающих функционирование почвенной экосистемы и исключаться массовая гибель мезо- и микрофауны. 7. Скорость роста корней в остром опыте и урожайность высших растений в хроническом эксперименте снижается не более чем на 50% (ДК50). Из учитываемых при нормировании показателей, лимитирующей является наименьшая концентрация, которая и принимается как норматив ДОСНП для земель лесного фонда после проведения рекультивационных и иных восстановительных работ.

4. Заключение

Примененная в ходе выполнения работы методическая схема скрининга почв, отличающихся уровнем остаточного содержания нефти, с использованием микробиологических, биохимических, токсикологических, физико-химических и биопродукционных (лабораторно-вегетационный эксперимент) критериев обеспечивает высокую достоверность полученных в ходе экспериментов результатов. Следует отметить, что фитопродукционный фактор, как правило, является лимитирующим при определении допустимого уровня содержания нефти и продуктов ее трансформации в почве (табл.2).

Таблица 2 - Остаточные концентрации НП в почвах, не оказывающие отрицательного воздействия по биохимическим и токсикологическим параметрам (г/кг)

Почва	QR	Ферментативная активность	Токсичность, ДК50	Каталаза	Уреаза	Острая	Хрон.	ДП
22,83	22,83	11,41	6,93	4,87	ССЛ	5,20	8,00	14,93
10,13	4,81	СЛ	5,20	14,10	14,93	6,04	10,16	ТСЛ
14,93	14,93	11,43	6,17	ДКВ	11,47	4,98	11,47	22,50
4,72	ДКО	5,74	5,74	11,47	11,16	4,80	ЧО	4,98
14,93	14,93	21,74	5,00	Хронические вегетационные опыты по оценке				

фитопродуктивности позволили выявить статистически достоверные взаимосвязи между урожайностью фитомассы и остаточным содержанием нефти в почве. В тоже время, минимальные лимитирующие концентрации НП для СЛ почвы были получены по значениям коэффициента микробного дыхания (QR), а для ТСЛ почвы по зоотоксичности и микробиологическим показателям (5,2 и 5,0, соответственно). Таким образом, для тяжелосуглинистых и глинистых почв лесного фонда Республики Татарстан в качестве норматива ДОСНП были рекомендованы следующие концентрации: - для дерново-карбонатных выщелоченных – $4,7 \pm 1,2$ г/кг; - для светло-серых лесных, дерново-карбонатных оподзоленных – $4,8 \pm 1,2$ г/кг; - для дерново-подзолистой – $4,9 \pm 1,2$ г/кг; - для темно-серых лесных и чернозема оподзоленного – $5,0 \pm 1,3$ г/кг; - для серых лесных – $5,2 \pm 1,3$ г/кг. Учитывая, что погрешность методов определения массовой доли нефтепродуктов в почве, допущенных для целей государственного экологического контроля составляет 25%, считали целесообразным установить единый норматив ДОСНП для всех исследованных почв лесного фонда Республики Татарстан равный 5,0 г/кг. Результаты проведенных исследований явились основой утвержденных региональных нормативов ДОСНП по Республике Татарстан [31].