

Дмитрий Валерьянович ТАРАБУКИН<sup>1</sup>

УДК 579.26

**МОДЕЛЬНАЯ РЕКУЛЬТИВАЦИЯ *EX SITU*  
И ОЦЕНКА ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ  
ЛЕСНЫХ ПОДЗОЛИСТЫХ ПОЧВ В УСЛОВИЯХ  
ПОВЫШЕННОГО НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ\***

<sup>1</sup> кандидат биологических наук, научный сотрудник,  
Институт биологии Коми научного центра  
Уральского отделения РАН (г. Сыктывкар)  
dvtarabukin@ib.komisc.ru

**Аннотация**

В модельных опытах по рекультивации *ex situ* лесной подзолистой почвы, загрязненной нефтью, апробированы различные стимулирующие факторы. В качестве факторов ускорения разложения нефти в почве использовали: повышенную влажность, температурный режим, неионогенное поверхностно-активное вещество (ПАВ) и минеральные удобрения. Содержание нефтепродуктов (НП) в почвенных образцах определяли через 30 и 60 суток после начала рекультивации. В результате не выявлено достоверных отличий ( $p > 0,05$ ) по содержанию НП между различными вариантами биостимуляции. Сделан вывод об устойчивости выбранного типа почв к нефтяному загрязнению и значительному потенциалу самовосстановления при благоприятных условиях.

Выявлена динамика биохимических параметров почвы на примере целлюлазной и протеазной активности. Целлюлазная активность фактически отсутствовала через 30 и 60 суток после внесения нефти в почву в варианте, моделирующем самовосстановление, и в варианте с добавлением ПАВ, однако сохранялась достаточно высокой в

---

\* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-05028 мк.

---

**Цитирование:** Тарабукин Д. В. Модельная рекультивация *ex situ* и оценка ферментативной активности лесных подзолистых почв в условиях повышенного нефтяного загрязнения / Д. В. Тарабукин // Вестник Тюменского государственного университета. Экология и природопользование. 2019. Том 5. № 1. С. 29-43.  
DOI: 10.21684/2411-7927-2019-5-1-29-43

опытах с добавлением минеральных удобрений. Протеазная активность определялась в почве при всех вариантах биостимуляции, однако имела пониженное по сравнению с контрольными значение.

#### Ключевые слова

Нефтезагрязненные почвы, рекультивация *ex situ*, биостимуляция, сурфактанты, целлюлазы, протеазы.

DOI: 10.21684/2411-7927-2019-5-1-29-43

#### Введение

Добыча и переработка нефти в Республике Коми является одной из ключевых отраслей промышленности, однако это приводит к усилению антропогенной нагрузки на лесные экосистемы, в частности из-за аварийных нефтеразливов. Ликвидация нефтяных загрязнений в лесных экосистемах является достаточно сложной проблемой ввиду удаленности от транспортной инфраструктуры и, как следствие, усложнения работ по рекультивации. При попадании больших количеств нефти в природную среду нарушаются устоявшиеся экологические взаимосвязи микроорганизмов, а также высших животных и растений. Нефтеразливы приводят к изменению физических свойств почв, нарушению воздухообмена, ухудшению циркуляции воды и, соответственно, уменьшению поступления различных питательных веществ, необходимых для обеспечения жизнедеятельности организмов почвы. Все это приводит к формированию нового биоценоза, адаптирующегося к техногенному загрязнению [17, 19].

Основной задачей в случае ликвидации нефтяного загрязнения является восстановление первоначального состояния экосистемы при минимальных затратах времени. Для этого применяют комплекс мер, включающих как биоаугментацию (внесение специализированных штаммов микроорганизмов), так и биостимуляцию, направленную на активацию аборигенных микроорганизмов, сохранивших жизнеспособность в условиях техногенного воздействия [9, 12, 15]. Многие биопрепараты, такие как «Ленойл», «Эко Сейв», «Биоойл», вышли на стадию коммерциализации и зарекомендовали себя как эффективные средства при восстановлении нефтезагрязненных почв. Как правило, для таких препаратов подбирают специальные штаммы микроорганизмов, которые обладают наибольшей эмульгирующей способностью. Микробные биоэмульгаторы представляют собой гликолипиды или липопроотеины [21, 24] и секретируются микроорганизмами во внешнюю среду с целью облегчения диффузии нефтепродуктов для последующего внутриклеточного окисления. Из недостатков биоаугментации можно назвать необходимость содержания целого биотехнологического комплекса для получения биопрепаратов, что сказывается на конечной стоимости рекультивационных работ. Более того, необходим строгий контроль на стадии получения эффективных штаммов ввиду наличия эффектов диссоциа-

тивных переходов в пределах одного изолированного вида микроорганизмов и, как следствие, появления неактивных по отношению к нефтепродуктам вариантов [14, 20].

Биостимуляция как метод восстановления нефтезагрязненных объектов более прост, чем биоаугментация, но требует знания о первичном состоянии микробных сообществ почв. Можно предположить, что аборигенные микроорганизмы наиболее устойчивы к действию как биотических, так и абиотических факторов среды ввиду естественного отбора наиболее устойчивых линий. К примеру, в работе [23] указано, что при добавлении специализированных штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов к нефтезагрязненной суглинисто-подзолистой почве эффект по снижению концентрации нефтепродуктов по сравнению с контролем слабо выражен, из чего следует, что аборигенная микробиота, присутствующая на месте, более эффективна при рекультивации, поэтому ее биостимуляция предпочтительней.

Цель настоящей работы: оценить влияние стимулирующих факторов на эффективность разложения нефти в верхних слоях лесной подзолистой почвы при моделировании рекультивации *ex situ*.

#### Объекты и методы исследования

Еловые леса Республики Коми являются преобладающими по площади [3]. В качестве объекта исследования использовали верхний слой (лесная подстилка и гумусово-элювиальный горизонт) подзолистой почвы глубиной 10 см, отобранный в ельнике зеленомошном в окрестностях Сыктывкара. Перед началом эксперимента слой почвы просеивали через сито с размером отверстий 3 мм. Образец почвы массой 30 г (влажность 35%) помещали в чашку Петри, добавляли 6 г нефти (Усинского месторождения), тщательно перемешивали. Далее были смоделированы следующие варианты рекультивации *ex situ* (таблица 1). Вариант 1 моделировал самовосстановление почвы, в образец была добавлена только водопроводная вода для установления определенного уровня влажности. В других вариантах опыта, помимо воды, вносили добавки, активизирующие процесс разрушения нефти. В качестве контроля служили почвенные образцы без внесения нефти.

Образцы почвы в чашках Петри помещали в воздушный термостат и инкубировали при 35 °С в течение 60 суток. В процессе инкубирования из чашек с образцами отбирали пробы через 10, 30 и 60 суток, сушили до воздушно-сухого состояния и измеряли целлюлазную и протеазную активность. Остаточное содержание НП определяли в пробах после 30 и 60 суток инкубирования.

Одна единица протеазной активности равнялась такому количеству ферментов в 1 г почвы, которое образовывало 1 мкг не осаждаемых трихлоруксусной кислотой растворимых белков при действии на 0,5% раствора бычьего сывороточного альбумина за 1 час [18]. Растворимые белки определяли модифицированным методом Лоури [4].

Одна единица целлюлазной активности равнялась такому количеству ферментов, которое образовывало 1 мкг восстанавливающих сахаров, образующих-

ся при действии 1 г почвенного образца на 1% раствора карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) за 1 час. Восстанавливающие сахара определялись методом Шомодьи — Нельсона [22]. Калибровочная прямая строилась по глюкозе.

Содержание НП в образцах почвы определяли гравиметрическим методом. Для этого из навески почвы последовательно делали серию экстракций НП хлороформом до достижения прозрачного раствора. Далее из полученного экстракта на водяной бане посредством холодильника отгоняли до конечного объема 20 см<sup>3</sup> избыток хлороформа. Оставшуюся часть экстракта выветривали в вытяжном шкафу до постоянной массы сухого остатка при температуре 25 °С. Затем полученный сухой остаток экстрагировали гексаном и полученный раствор вносили на хроматографическую колонку, заполненную оксидом алюминия массой 6 г. Колонку перед внесением экстракта предварительно промывали 10 см<sup>3</sup> чистого гексана. Объем гексана, затраченного на экстракцию сухого остатка, составлял 40 см<sup>3</sup>. Полученный элюат собирали в предварительно взвешенные бюксы и выветривали в вытяжном шкафу при 25 °С до постоянной массы. Разница между массой пустого бюкса и бюкса с сухим остатком принималась за значение НП. Анализ выполнялся в аккредитованной лаборатории «Экоаналит» Института биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН.

### Результаты и обсуждение

В принятых для рекультивации *ex situ* условиях происходило достаточно эффективное разложение нефти при начальной концентрации  $122 \pm 8,2$  мг/г

Таблица 1

Варианты рекультивации *ex situ* загрязненной (30%) нефтью почвы

Table 1

*Ex situ* recultivation options for oil polluted (30%) soil

№ опыта	Водопроводная вода (30 см <sup>3</sup> )	Удобрение (калий-азот-фосфатное, Диаммофоска, марка Б, ТУ-113-08-569-98), 0,4 г	Неионогенный ПАВ (Лаурилглюкозид), 6 мг
Вариант 1	+	–	–
Вариант 2	+	+	–
Вариант 3	+	–	+
Вариант 4	+	+	+
Контроль 1	+	–	–
Контроль 2	+	+	–
Контроль 3	+	–	+

(таблица 2). При этом в контрольных опытах значение НП через 30 суток не превышало 0,3 мг/г, а через 60 суток — 0,2 мг/г, поэтому в дальнейшем во внимание не принималось. Следует отметить, что основная масса определяемых НП разлагалась за 30 суток при достаточно высокой влажности и стабильной температуре. Незначительные изменения по снижению содержания НП в пробах после 60 суток говорят о том, что уменьшалась доля легкоутилизируемых компонентов нефти, и, как следствие, процесс утилизации замедлился. Также можно предположить, что сыграл фактор постепенного уменьшения содержания воды в почвенных пробах в процессе инкубации.

Анализ содержания НП в почвенных образцах на 30 и 60 сутки выявил незначительные отличия между вариантами биостимуляции (таблица 2), поэтому можно говорить о том, что в выбранном типе почвы содержится достаточно большой объем (титр) микроорганизмов, адаптирующихся к повышенной концентрации нефти и разлагающих ее без дополнительных добавок. В то же время для дальнейшей полной утилизации тяжелых фракций нефти наличие добавок в виде ПАВ имеет положительную тенденцию к увеличению скорости разложения (таблица 2, вариант 3, 60 суток). Бесспорно, одним из главных факторов интенсивного разложения нефтепродуктов является стабильный температурный режим в 35 °С и оптимальная влажность. В естественных условиях, особенно в северных регионах, таких условий достичь не представляется возможным, однако при проведении рекультивационных работ с извлеченным грунтом, к примеру в технологиях компостирования, проще достичь оптимальных параметров для интенсификации биоразложения нефтепродуктов.

Комплекс биохимических показателей ферментативной активности почвы используется для оценки эффективности биоремедиации загрязненных объектов [16]. В случае нефтяного загрязнения одним из наиболее показательных биохимических

Таблица 2

Table 2

**Остаточное содержание нефтепродуктов в образцах почвы**

**Residual oil content in soil samples**

№	Вариант 1	Вариант 2	Вариант 3	Вариант 4
<b>30 суток</b>				
Количество НП, мг/г образца почвы	77,2 ± 4,1	86 ± 6,2	79,8 ± 2,8	77,1 ± 5,5
Степень конверсии НП, %	≈37	≈30	≈35	≈37
<b>60 суток</b>				
Количество НП, мг/г образца почвы	75,4 ± 3,9	76,3 ± 5,5	70,3 ± 3,4	73,7 ± 1,8
Степень конверсии НП, %	≈39	≈38	≈43	≈41

мических параметров является дегидрогеназная активность, характеризующая класс оксиредуктаз [5, 8]. Однако в ряде случаев активность этих ферментов может повышаться с увеличением доли нефтепродуктов, в другом случае, наоборот, понижаться [13]. Для некоторых типов почв, таких как серая лесная почва, загрязненная сырой нефтью, не выявлено достоверных изменений ее активности в полевых условиях [7].

В качестве другого показательного биохимического параметра может применяться уреазная активность. Повышенный или пониженный показатель уреазной активности, по сравнению с фоновыми почвами, может говорить об угнетении или, наоборот, об интенсификации биохимических процессов метаболизма азотистых соединений. В целом для разных типов почв необходимо опытным путем находить наиболее чувствительные биохимические показатели.

Т. к. объектом исследования была лесная подзолистая почва с выраженной подстилкой, богатая растительными остатками, было целесообразно проверить целлюлазную активность на различных этапах рекультивации *ex situ*. В работе [6] указано, что целлюлозоразрушающие микроорганизмы, являющиеся специфическими продуцентами целлюлаз, очень чутко реагируют на нефтяное загрязнение и длительное время после контаминации находятся в угнетенном состоянии, поэтому активность почвенных целлюлаз может служить индикатором состояния почв. Также применяли биохимический параметр протеазной активности, который затрагивает большое количество классов микроорганизмов, присутствующих в почве, и связан с метаболизмом органического азота. К примеру, в работах [11, 12] указано, что нефтяное загрязнение снижает активность почвенных протеаз, хотя есть данные о стимулировании активности протеазы [5].

В опытах нефть и повышенная влажность субстрата стимулировали активность грибов-микромикетов при добавлении минеральных удобрений. Визуально наблюдалось наличие мицелия на поверхности нефтезагрязненных проб (рис. 1В и 1Д). В работе [10] установлено, что преобладающими грибами-микромикетами при нефтяных загрязнениях являются грибы рода *Penicillium*, хотя могут встречаться и *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mycelia*. В то же время добавка в загрязненную почву только одного ПАВ приводила к полному подавлению роста микроскопических грибов (рис. 1Г). Вероятно, в опыте происходила деэмульгация нефти и распределение ее низкомолекулярных фракций в водной фазе, что проявлялось в деструктивном эффекте на клеточные мембраны микромикетов. При совместном введении минеральных удобрений и ПАВ грибы-микромикеты были более устойчивы, в результате чего через 60 суток пробы полностью были покрыты мицелием (рис. 2).

Анализ биохимической активности почвы выявил, что даже при концентрации нефти порядка 30% активность целлюлаз и протеаз может зависеть от добавок, вносимых при рекультивации (рис. 3). Введение минеральных удобрений способствовало относительно стабильному показателю целлюлазной активности (рис. 3Б и 3Г), причем даже при наличии большой концентрации нефтяного загрязнения исследуемая величина была выше, чем в контроле (рис. 4А),

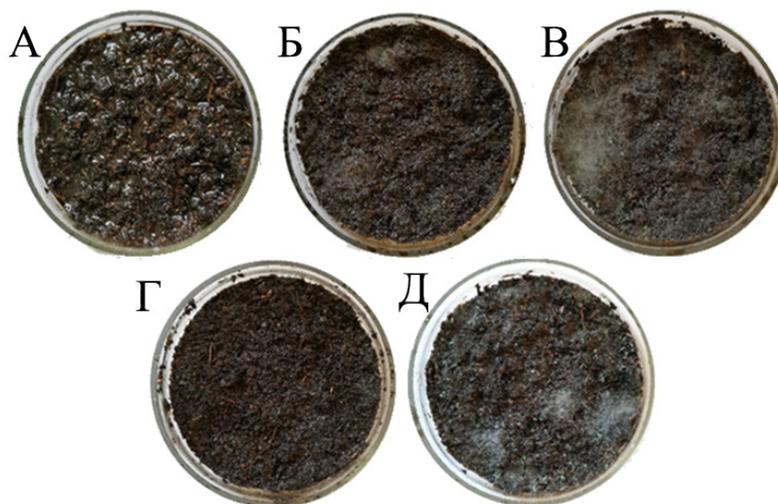


Рис. 1. Образцы нефтезагрязненной почвы через 10 дней после начала инкубирования

Примечания: А — исходный вид загрязненной почвы перед началом инкубирования, Б — вариант 1, В — вариант 2, Г — вариант 3, Д — вариант 4.

Fig. 1. Samples of oil-contaminated soil 10 days after the start of incubation

Notes: А — the initial type of contaminated soil before incubation, Б — option 1, В — option 2, Г — option 3, Д — option 4.



Рис. 2. Образец нефтезагрязненной почвы через 60 суток (вариант 4)

Fig. 2. Sample oil-contaminated soil after 60 days (option 4)

однако впоследствии наблюдалась тенденция к ее уменьшению. С другой стороны, после внесения в загрязненную почву только ПАВ, как и в варианте с самовосстановлением, не выявлено наличие целлюлазной активности после 10 суток инкубации (рис. 3А и 3В), в то время как в контрольной почве с ПАВ отмечалась тенденция к ее увеличению (рис. 4В). Т. к. целлюлазы в почве в большей степени характеризуют биохимическую активность грибов-микромисетов, чем бактерий [1], косвенно по величине этого параметра можно судить о жизнеспособности грибов в условиях нефтяного загрязнения. Следовательно, внесение минеральных удобрений оказывает положительный эффект на устойчивость микроскопических грибов к НП.

Показатель протеазной активности был достаточно стабильным во всех опытах (рис. 3). Причем варианты 1, 3, 4 имели схожий профиль, связанный с падением активности в период от 10 до 30 суток, с последующей тенденцией восстановления через 60 суток. В то же время для варианта 2 был зарегистрирован незначительный стабильный рост протеазной активности, схожий с контрольным опытом без добавок (рис. 4А). Следует отметить, что в контрольной почве после внесения удобрений наблюдался резкий скачок протеазной активности (рис. 4Б) на 30 сутки с последующей стабилизацией к концу опыта.

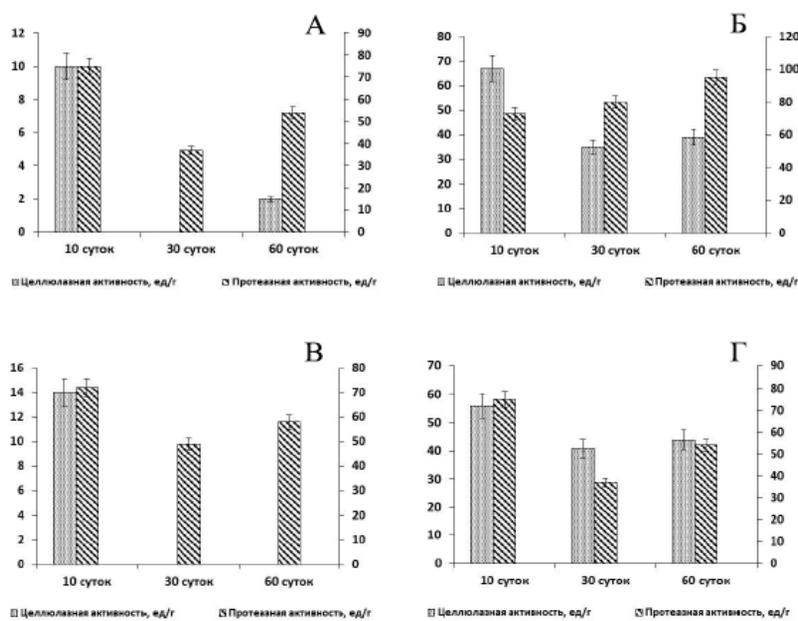


Рис. 3. Ферментативная активность при различных режимах рекультивации *ex situ*

Примечания: А — вариант 1, Б — вариант 2, В — вариант 3, Г — вариант 4.

Fig. 3. Enzymatic activity in various modes of *ex situ* remediation

Notes: A — option 1, Б — option 2, В — option 3, Г — option 4.

В целом параметр активности целлюлаз как показатель восстановления при рекультивации нефтезагрязненных почв может применяться для оценки эффективности тех или иных методов при сопоставлении с фоновыми почвами. В исследовании [6] приходят к выводу, что, несмотря на достаточно убедительные результаты и неоспоримый потенциал применения целлюлаз в диагностических целях, в работе с ними встретились с определенными сложностями методического плана. Методики определения активности этих ферментов требовали длительных периодов инкубации и экспозиции, что позволяло получить результаты не ранее чем через две недели после начала эксперимента. В нашем опыте использование водорастворимой КМЦ в качестве субстрата для определения целлюлазной активности позволяло получить приемлемые результаты в течение 30 часов.

Можно заключить, что показатель протеазной активности в биохимических процессах характеризует интенсивность метаболизма белковых соединений в условиях сильного нефтяного загрязнения на различных стадиях восстановления. Он менее чувствителен к добавкам и скорее дает общую картину происходящих в почве процессов при рекультивации. Таким образом, его целесообразно применять наряду с другими параметрами биохимической диагностики.

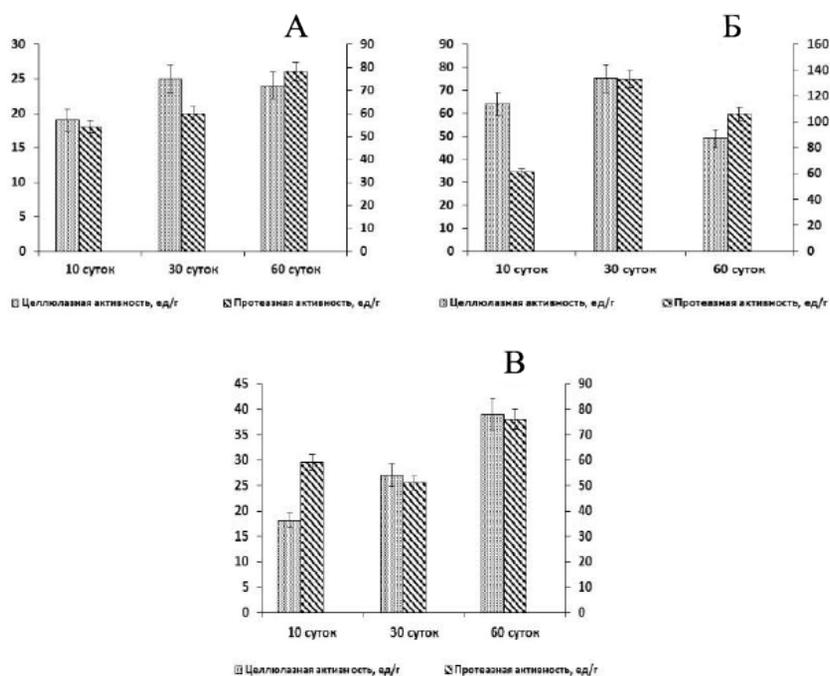


Рис. 4. Ферментативная активность в контрольных образцах почвы

Примечания: А — контроль 1, Б — контроль 2, В — контроль 3.

Fig. 4. Enzymatic activity in the control samples of the soil

Notes: A — control 1, Б — control 2, В — control 3.

### Заключение

Лесная подзолистая почва сохраняет биохимический потенциал в условиях повышенной концентрации нефти и способна к эффективному самовосстановлению при достижении оптимальной влажности и температуры. Статистически достоверного увеличения скорости разложения НП за счет введения минеральных удобрений и ПАВ на начальном этапе не выявлено. Предполагается, что положительный эффект от внесения дополнительных биостимуляторов может проявиться на более поздних сроках рекультивации. Применение ПАВ для эмульгирования свежих нефтеразливов может привести к негативному эффекту от солиubilизации низкомолекулярных фракций нефти. Следовательно, более целесообразно использовать ПАВ для застарелых нефтезагрязнений. С учетом выявленных особенностей верхние слои лесной подзолистой почвы стоит рассматривать как эффективную среду для проведения рекультивации *in situ*, не требующую внесения дополнительных специализированных микроорганизмов, однако подтверждение данного предположения требует отдельных сравнительных экспериментов.

### Благодарности

Автор выражает благодарность Е. Н. Мелехиной за содействие в проведении работы.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Болобова А. В. Сравнение эффективности гидролиза микрокристаллической целлюлозы целлюлазами бактериального и грибного происхождения / А. В. Болобова, А. А. Клесов // Прикладная биохимия и микробиология. 1990. Том 26. № 3. С. 321-327.
2. Гилязов М. Ю. Агроэкологическая характеристика нарушенных при нефтедобыче черноземов и приемы их рекультивации в условиях Закамья Татарстана: автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук / М. Ю. Гилязов. Саратов, 1999. 43 с.
3. Девственные леса Коми: памятник Всемирного культурного и природного наследия ЮНЕСКО / под общ. ред. А. И. Таскаева. М.: ИПЦ «Дизайн. Информация. Картография», 2005. 352 с.
4. Донцов А. Г. Оптимизация условий определения белка в ферментных растворах по методу Лоури / А. Г. Донцов, Д. В. Тарабукин, Е. В. Ванчикова // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2009. Том 75. № 2. С. 18-20.
5. Исмаилов Н. М. Микробиология и ферментативная активность нефтезагрязненных почв / Н. М. Исмаилов. // Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. М.: Наука, 1988. С. 42-57.
6. Кабиров Т. Р. Использование многоуровневой системы индикации биологической активности почв для оценки эффективности методов биорекультивации нефтезагрязненных территорий: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Т. Р. Кабиров. Уфа, 2009. 24 с.

7. Киреева Н. А. Активность каталазы и дегидрогеназы в почвах, загрязненных нефтью и нефтепродуктами / Н. А. Киреева, Е. И. Новоселова, Т. С. Онегова // *Агрехимия*. 2002. № 8. С. 64-72.
8. Киреева Н. А. Использование активного ила для рекультивации почв, загрязненных нефтью / Н. А. Киреева, Е. И. Новоселова, Ф. Х. Хазиев // *Почвоведение*. 1996. № 11. С. 1399-1403.
9. Киреева Н. А. Комплекс микромицетов нефтезагрязненного чернозема выщелоченного при рекультивации биопрепаратом Ленойл / Н. А. Киреева, Г. Ф. Рафикова, Н. Ф. Галимзянова, О. Н. Логинов, Т. Р. Кабиров // *Микология и фитопатология*. 2008. Том 42. № 1. С. 57-63.
10. Киреева Н. А. Ферментативная и микробиологическая активность загрязненных нефтью глееподзолистых почв на разных стадиях их восстановления / Н. А. Киреева, М. Ю. Маркарова, Т. Н. Щемелинина, Г. Ф. Рафикова // *Вестник Башкирского университета*. 2006. Том 11. № 4. С. 55-58.
11. Киреева Н. А. Ферменты азотного обмена в нефтезагрязненных почвах / Н. А. Киреева, Е. И. Новоселова, Ф. Х. Хазиев // *Известия Академии наук. Серия биологическая*. 1997. № 6. С. 755-759.
12. Маркарова М. Ю. Опыт применения биопрепарата «Универсал» для рекультивации нефтезагрязненных земель / М. Ю. Маркарова // *Вестник Института биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН*. 2004. № 84 (10). С. 21-23.
13. Медведева Е. И. Биологическая активность нефтезагрязненных почв в условиях Среднего Поволжья: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Е. И. Медведева. Тольятти, 2002. 18 с.
14. Милько Е. С. Гетерогенность популяции бактерий и процесс диссоциации / Е. С. Милько, Н. С. Егоров. М.: Изд-во Московского государственного университета, 1991. 142 с.
15. Мурыгина В. П. Биорекультивация препаратом-нефтедеструктором «Родер» почв и водной поверхности, загрязненных углеводородами / В. П. Мурыгина, С. В. Калюжный // *Мир нефтепродуктов. Вестник нефтяных компаний*. 2008. № 8. С. 20-24.
16. Новоселова Е. И. Ферментативная активность почв в условиях нефтяного загрязнения и ее биодиагностическое значение / Е. И. Новоселова, Н. А. Киреева // *Теоретическая и прикладная экология*. 2009. № 2. С. 4-12.
17. Пиковский Ю. И. Проблема диагностики и нормирования загрязнения почв нефтью и нефтепродуктами / Ю. И. Пиковский, А. Н. Геннадиев, С. С. Чернянский, Г. Н. Сахаров // *Почвоведение*. 2003. № 9. С. 1132-1140.
18. Польшалина Г. В. Определение активности ферментов. Справочник / Г. В. Польшалина, В. С. Чередниченко, Л. В. Римарева. М.: ДеЛи принт, 2003. 375 с.
19. Солнцева Н. П. Добыча нефти и геохимия природных ландшафтов / Н. П. Солнцева. М.: Изд-во Московского государственного университета, 1998. 376 с.
20. Сопрунова О. Б. Перспективные технологии биоремедиации нефтезагрязненных объектов аридных территорий / О. Б. Сопрунова // *Известия Самарского научного центра РАН*. 2011. Том 13. № 5 (3). С. 191-193.
21. Karlapudi A. P. Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review / A. P. Karlapudi, T. C. Venkateswarulu, J. Tammineedi, L. Kanumuri, B. K. Ravuru,

- V. Dirisala, V. P. Kodali // Petroleum. 2018. Vol. 4. № 3. Pp. 241-249.  
DOI: 10.1016/j.petlm.2018.03.007
22. McCleary B. V. A comparison of polysaccharide substrates and reducing sugar methods for the measurement of *endo*-1,4- $\beta$ -xy lanase / B. V. McCleary, P. McGeough // Applied Biochemistry and Biotechnology. 2015. Vol. 177. № 5. Pp. 1152-1163.  
DOI: 10.1007/s12010-015-1803-z
23. Polyak Y. M. Effect of remediation strategies on biological activity of oil-contaminated soil — A field study / Y. M. Polyak, L. G. Vakina, M. V. Chugunova, N. V. Mayachkina, A. O. Gerasimov, V. M. Bure // International Biodeterioration and Biodegradation. 2018. Vol. 126. Pp. 57-68. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.10.004
24. Yin H. Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater / H. Yin, J. Qiang, Y. Jia, J. Ye, H. Peng, H. Qin, N. Zhang, B. He // Process Biochemistry. 2009. Vol. 44. № 3. Pp. 302-308.  
DOI: 10.1016/j.procbio.2008.11.003

Dmitriy V. TARABUKIN<sup>1</sup>

UDC 579.26

**EX SITU MODEL REMEDIATION AND ASSESSMENT  
OF THE ENZYMATIC ACTIVITY OF FOREST PODZOLIC SOILS  
UNDER HIGH OIL POLLUTION\***

<sup>1</sup> Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Institute of Biology, Komi Scientific Center,  
Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (Syktyvkar)  
dvtarabukin@ib.komisc.ru

**Abstract**

This article presents model experiments on the *ex situ* remediation of forest podzolic soil polluted with oil, where various stimulating factors were tested. The author has used the following factors to accelerate the decomposition of oil in the soil: high humidity, temperature, non-ionic surfactant, and mineral fertilizers. The oil content in the soil samples was measured 30 and 60 days after the start of remediation.

The results show no significant differences ( $p > 0.05$ ) in the content of oil products between different biostimulation options. The author concludes that the selected soil type is resistant to oil pollution and has a significant potential for self-recovering under favorable conditions.

Variations in cellulase and protease activity in the soil occurred during various periods of remediation. There was no cellulase activity 30 and 60 days after the oil was introduced into the soil in the two cases: a) when simulating self-recovery and b) with the addition of surfactants. However, cellulase activity remained quite high in the experiments with the addition of mineral fertilizers. Protease activity was present in the soil in all biostimulation options, though it had a lower value compared to the control.

---

\* The research was supported by the Russian Foundation for Basic Research within the research project No 18-29-05028 mk.

---

**Citation:** Tarabukin D. V. 2019. “*Ex situ* model remediation and assessment of the enzymatic activity of forest podzolic soils under high oil pollution”. Tyumen State University Herald. Natural Resource Use and Ecology, vol. 5, no 1, pp. 29-43.  
DOI: 10.21684/2411-7927-2019-5-1-29-43

**Keywords**

Oil-contaminated soils, *ex situ* remediation, biostimulation, surfactants, cellulases, proteases.

DOI: 10.21684/2411-7927-2019-5-1-29-43

**REFERENCES**

1. Bolobova A. V., Klesov A. A. 1990. "Comparison of the efficiency of hydrolysis of microcrystalline cellulose by bacterial and fungal cellulases". *Applied Biochemistry and Microbiology*, vol. 26, no 3, pp. 321-327. [In Russian]
2. Gilyazov M. Yu. 1999. "Agroecological characteristics of chernozems disturbed during oil production and methods of their recultivation in the conditions of the Trans-Kama Region of Tatarstan". Dr. Sci. (Biol.) diss. Saratov. [In Russian]
3. Taskaev A. I. (ed.). 2005. *Virgin Komi forests. Monument of UNESCO World Cultural and Natural Heritage*. Moscow: Dizayn. Informatsiya. Kartografiya. [In Russian]
4. Dontsov A. G., Tarabukin D. V., Vanchikova E. V. 2009. "Optimization of protein determination conditions in enzyme solutions according to the Lowry method". *Industrial Laboratory*, vol. 75, no 2, pp. 18-20. [In Russian]
5. Ismailov N. M. 1988. "Microbiology and enzymatic activity of oil-contaminated soils". In: *Restoration of Oil-Contaminated Soil Ecosystems*, pp. 42-57. Moscow: Nauka. [In Russian]
6. Kabirov T. R. 2009. "Using a multi-level system for indicating the biological activity of the soil to assess the effectiveness of methods of bioremediation of oil-contaminated areas". Cand. Sci. (Biol.) diss. abstract. Ufa. [In Russian]
7. Kireeva N. A., Novoselova E. I., Onegova T. S. 2002. "Catalase and dehydrogenase activity in soils polluted by oil and oil products". *Agricultural Chemistry*, no 8, pp. 64-72. [In Russian]
8. Kireeva N. A., Novoselova E. I., Khaziev F. H. 1996. "The use of activated sludge for the remediation of oil contaminated soils". *Eurasian Soil Science*, no 11, pp. 1399-1403. [In Russian]
9. Kireeva N. A., Rafikova G. F., Galimzyanova N. F., Loginov O. N., Kabirov T. R. 2008. "Complex of micromycetes of leached chernozem of oil leached during recultivation by Lenoil biological product". *Mycology and Phytopathology*, vol. 42, no 1, pp. 57-63. [In Russian]
10. Kireeva N. A., Markarova M. Yu., Shemelinina T. N., Rafikova G. F. 2006. "Enzymatic and microbiological activity of oil-contaminated gley-podzolic soils at different stages of their recovery". *Vestnik Bashkirskogo universiteta*, vol. 11, no 4, pp. 55-58. [In Russian]
11. Kireeva N. A., Novoselova E. I., Khaziev F. Kh. 1997. "Nitrogen metabolism enzymes in oil-contaminated soils". *Biology Bulletin*, no 6, pp. 755-759. [In Russian]
12. Markarova M. Yu. 2004. "The experience of using the 'Universal' preparation for the remediation of oil-contaminated lands". *Vestnik Insituta biologii Komi NC UrO RAN*, no 84 (10), pp. 21-23. [In Russian]
13. Medvedeva E. I. 2002. "The biological activity of oil-polluted soils in the conditions of the Middle Volga region". Cand. Sci. (Biol.) diss. abstract. Tolyatti. [In Russian]
14. Milko E. S., Yegorov N. S. 1991. "Bacterial population heterogeneity and dissociation process". Moscow: Publishing House of Moscow State University. [In Russian]

15. Murygina V. P., Kalyuzhny S. V. 2008. "Bioremediation with the 'Roder' oil destructive agent of soil and water surface contaminated with hydrocarbons". World of Oil Products. The Oil Companies' Bulletin, no 8, pp. 20-24. [In Russian]
16. Novoselova E. I., Kireeva N. A. 2009. "Enzymatic activity of soils in the conditions of oil pollution and its biodiagnostic value". Theoretical and Applied Ecology, no 2, pp. 4-12. [In Russian]
17. Pikovskiy Yu. I., Gennadiyev A. N., Chernyansky S. S., Sakharov G. N. 2003. "The problem of diagnostics and rationing of soil pollution by oil and oil products". Eurasian Soil Science, no. 9, pp. 1132-1140. [In Russian]
18. Polygalina G. V., Cherednichenko, V. S., Rimarev L. V. 2003. Determination of Enzyme Activity. Moscow: DeLi print. [In Russian]
19. Solntseva N. P. 1998. Oil Production and Geochemistry of Natural Landscapes. Moscow: Publishing House of Moscow State University. [In Russian]
20. Soprunova O. B. 2011. "Promising technologies for bioremediation of oil-polluted objects of arid territories". Izvestia of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, vol. 13, no. 5 (3), pp. 191-193. [In Russian]
21. Karlapudi A. P., Venkateswarulu T. C., Tammineedi J., Kanumuri L., Ravuru B. K., Dirisala V., Kodali V. P. 2018. "Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution — a review". Petroleum, vol. 4, no 3, pp. 241-249. DOI: 10.1016/j.petlm.2018.03.007
22. McCleary B. V., McGeough P. A. 2015. "A comparison of polysaccharide substrates and reducing sugar methods for the measurement of *endo*-1,4- $\beta$ -xylanase". Applied Biochemistry and Biotechnology, vol. 177, no 5, pp. 1152-1163. DOI: 10.1007/s12010-015-1803-z
23. Polyak Y. M., Bakina L. G., Chugunova M. V., Mayachkina N. V., Gerasimov A. O., Bure V. M. 2018. "Effect of remediation strategies on biological activity of oil-contaminated soil — a field study". International Biodeterioration and Biodegradation, vol. 126, pp. 57-68. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.10.004.
24. Yin H., Qiang J., Jia Y., Ye J., Peng H., Qin H., Zhang N., He B. 2009. "Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater". Process Biochemistry, vol. 44, no 3, pp. 302-308. DOI: 10.1016/j.procbio.2008.11.003