



- ратовская область) // Вестн. Твер. гос. ун-та. 2009. Сер. Биология и экология. Вып. 16, № 37. С. 144–148.
7. Шустов М. В. Лишайники Приволжской возвышенности. М. : Наука, 2006. 237 с.
  8. Еленкин А. А. Флора лишайников Средней России : в 4 ч. Юрьев : Б. И., 1906–1911. Ч. 1–4.
  9. Флора лишайников России : Биология, экология, разнообразие, распространение и методы изучения

лишайников. М. ; СПб. : Т-во науч. изд. КМК, 2014. С. 204–220.

10. Nordin A., Moberg R., Tønsberg T., Vitikainen O., Dalsätt Å., Myrdal M., Snitting D., Ekman S. Santesson's Checklist of Fennoscandian Lichenforming and Lichenicolous Fungi, version 29 April 2011. [Electronic resources]. 2011. URL : <http://130.238.83.220/santesson/home.php> (дата обращения: 08.12.2014).

УДК 504.064:574.21

## МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ИНДИКАЦИЯ ПОЧВ НАД ПОДЗЕМНЫМ ХРАНИЛИЩЕМ ПРИРОДНОГО ГАЗА

Т. О. Полещук, Е. В. Плешакова, М. В. Решетников, И. С. Пальцев

Саратовский государственный университет  
E-mail: plekat@rambler.ru



Проведена микробиологическая индикация почв над Степновским подземным хранилищем природного газа на основе оценки численности гетеротрофных, углеводородокисляющих и метилотрофных бактерий. Обнаружено повышенное содержание микроорганизмов индикаторных физиологических групп, что свидетельствует о поступлении метана в верхние слои почвы. Показана возможность использования углеводородокисляющих и метилотрофных бактерий для экологического мониторинга почв в районах газовых хранилищ.

**Ключевые слова:** подземное хранилище природного газа, метан, гетеротрофные микроорганизмы, углеводородокисляющие и метилотрофные бактерии.

### Microbiological Indication of Soil above the Underground Storage of Natural Gas

T. O. Poleshchuk, Ye. V. Pleshakova,  
M. V. Reshetnikov, I. S. Paltsev

Microbiological indication of soil over Stepnovskoye underground storage of natural gas was carried out on the basis of estimating the number of heterotrophic, hydrocarbon-oxidizing and methylotrophic bacteria. Increased number of microorganisms of test physiological groups were found, indicating the admission of methane in the upper layers of the soil. The possibility of using hydrocarbon-oxidizing and methylotrophic bacteria for environmental monitoring of soil in the areas of natural gas storage facilities was shown.

**Key words:** underground storage of natural gas, methane, heterotrophic microorganisms hydrocarbon-oxidizing and methylotrophic bacteria.

В настоящее время промышленная и хозяйственная деятельность человека все чаще становится основным источником загрязнения атмосферы. Добыча, транспортировка и хранение природного газа приводят к загрязнению окружающей среды. Этому способствует утечка

газа из искусственных газовых залежей. Миграция метана, основного компонента природного газа, из пласта-коллектора по системе вертикальной и горизонтальной трещиноватости геологических структур способствует увеличению его концентрации в атмосфере. Важную роль в регулировании потоков метана играет почвенный покров, в котором происходит микробиологическое окисление этого газа с образованием конечных продуктов – диоксида углерода и воды. Промежуточными продуктами являются метанол, формиат и формальдегид. Процесс метаноокисления снижает выделение метана, но в то же время приводит к увеличению концентрации углекислого газа в почве и его эмиссии в атмосферу.

Почва является регулятором биосферных взаимодействий, функционируя, она контролирует и трансформирует проходящие через нее потоки и циклы вещества и энергии. Почвенный покров выступает как своеобразная полупроницаемая мембрана, осуществляющая газообмен между атмосферой и литосферой [1]. В настоящее время наиболее остро стоят проблемы увеличения метана в атмосфере, содержание которого за последние два столетия возросло почти втрое, что, по-видимому, связано с дисбалансом продуцирования, разложения и трансформации метана.

Впервые углеводороды, мигрировавшие из находящихся на глубине газонефтяных залежей, были обнаружены у земной поверхности российскими и американскими геологами в 30-х гг. XX столетия [2, 3]. Это явление В. И. Вер-



надский назвал «газовым дыханием Земли». Миграция газа к поверхности обусловлена наличием трещиноватости геологических структур. Даже породы – флюидоупоры, представленные глинами и каменной солью, не являются абсолютным непроницаемым экраном для газового миграционного потока. Вокруг залежей образуются вертикальные и пластовые ореолы рассеяния, характеризующиеся аномальными (по сравнению с фоном) значениями геохимических показателей. Максимальные концентрации углеводородных газов наблюдаются над контуром нефтегазоносности. Среди них превалирует метан. Характерно постоянное присутствие тяжелых гомологов метана. Газовые углеводородные аномалии проявляют пульсационный характер в подпочвенном воздухе, это явление зависит от сезона [3]. В водоносных горизонтах максимальные концентрации метана фиксируются в весенний период. Снижение концентраций газов и возрастание интенсивности развития углеводородоксилирующей микрофлоры в летний период объясняется повышением температуры. В осенний период снова наблюдается быстрое накопление метана в воде в результате снижения жизнедеятельности метанооксилирующих бактерий [4].

В природных условиях процесс бактериального окисления метана осуществляют облигатные метилотрофные микроорганизмы (метанотрофы), использующие в качестве углеродного источника питания метан и его одноуглеродные замещенные и окисленные производные, а также факультативные метилотрофы, ассимилирующие как одноуглеродные соединения – метанол, формальдегид, метиламины, так и другие органические вещества [5].

Актуальными экологическими проблемами дальнейшего использования существующих разрабатываемых газовых месторождений и

подземных газохранилищ является исследование биогеохимических циклов парниковых газов в биосфере, влияния последних на функционирование почвенной системы и формирование почв, функционально-экологических особенностей почв газоносных территорий [6].

В связи с вышесказанным целью настоящего исследования явилась биодиагностика почв над подземным хранилищем газа с помощью микробиологического анализа. В ходе работы оценивались: общая численность гетеротрофных микроорганизмов, количество углеводородоксилирующих микроорганизмов и метилотрофных бактерий в почвенных образцах. Также решалась задача по выявлению взаимосвязи между физико-химическими показателями почвенных образцов, отобранных над подземным хранилищем газа, и численностью микроорганизмов исследованных физиологических групп.

#### Материалы и методы

Объектом исследования явились образцы почв, отобранные на территории Степновского подземного хранилища газа Саратовской области. Отбор почвенных проб производился в июле 2013 г. группой студентов и преподавателей геологического факультета Саратовского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского. На рис. 1 представлена карта исследованной территории с точками отбора проб почвы, жирным шрифтом выделены точки, из которых почва подвергалась микробиологическому анализу.

Глубина взятия проб составляла 0,1 м. В отобранных почвенных пробах был определен водородный показатель, окислительно-восстановительный потенциал и магнитная восприимчивость – показатель, косвенно отражающий концентрацию железа в почве [7]. Эти данные представлены в таблице.

Физико-химические показатели исследованных образцов почв

| Номер пробы | pH   | <i>E<sub>h</sub></i> , мВ | <i>k</i> (10 <sup>-5</sup> ед. СИ) | Почва            |
|-------------|------|---------------------------|------------------------------------|------------------|
| 1           | 7,86 | -27,5                     | 38,1                               | Суглинок легкий  |
| 2           | 7,69 | -19,2                     | 45,0                               | Суглинок средний |
| 3           | 6,72 | 33,5                      | 33,3                               | Суглинок легкий  |
| 4           | 7,55 | -11,2                     | 29,7                               | Суглинок тяжелый |
| 5           | 6,94 | 21,1                      | 75,8                               | Суглинок средний |
| 6           | 7,87 | -28,7                     | 57,2                               | Суглинок средний |
| 7           | 7,16 | 9,9                       | 59,3                               | Суглинок легкий  |
| 8           | 7,99 | -34,4                     | 51,1                               | Суглинок средний |
| 9           | 7,18 | 8,9                       | 45,7                               | Суглинок легкий  |





Оценку общей численности гетеротрофных микроорганизмов производили на МПА общепринятыми бактериологическими методами [8]. Количество углеводородокисляющих микроорганизмов оценивали на агаризованной минеральной среде с вазелиновым маслом (1%) в качестве единственного источника углерода и энергии; метилотрофных бактерий – на минеральной среде Хирша с метанолом (0,4%) [9]. Определение численности микроорганизмов (гетеротрофных, метилотрофных и углеводородокисляющих) в исследуемой почве включало несколько этапов: подготовку почвы к микробному анализу (гомогенизация), приготовление разведений почвенной суспензии в стерильном физиологическом растворе; посев полученных разведений на плотную среду в чашки Петри и подсчет выросших колоний через 3–5 сут. культивирования в термостате при температуре 28°C. Высевы на МПА и на селективные среды для учета численности метилотрофных и углеводородокисляющих бактерий производили из разведений  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  в нескольких повторностях.

Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с применением пакета прикладных программ Microsoft Excel 2003 (для Windows XP).

### Результаты и их обсуждение

Загрязнение почв углеводородами приводит к ухудшению их агрохимических и агрофизических характеристик, повышению фитотоксичности почв. Общеизвестно, что углеводороды в значительной мере влияют на почвенный микробоценоз и биохимические процессы [10, 11].

Существует несколько методологических подходов к оценке экологического состояния почв. На наш взгляд, наиболее чувствительным является микробиологический метод. Микробиота полифункциональна, и, участвуя в противоположных реакциях, осуществляет стабилизирующую функцию метаболического равновесия в природе. Благодаря большой поверхности контакта со средой, микроорганизмы очень чувствительны к меняющимся условиям существования, а высокая скорость размножения дает возможность в короткий срок выявлять изменения, которые возникают под влиянием экологических факторов.

Над разрабатываемыми газовыми и нефтяными месторождениями установлено повышенное содержание углеводородных газов, увеличение содержания углеводородокисляющих

микроорганизмов по сравнению с фоновыми почвами. Авторами [12, 13] показано формирование газовых и бактериальных аномалий по проявлению эмиссии метана в атмосферу, увеличению активности бактериального окисления метана, снижению и широкому варьированию окислительно-восстановительного потенциала в почвах над подземными газохранилищами. Участие углеводородных газов и продуктов их микробиологического преобразования в почвообразовании газоносных территорий рассматривалось с позиций увеличения биомассы метилотрофных микроорганизмов, формирования органического углерода и азота.

В исследованных нами пробах почвы над Степновским подземным хранилищем природного газа общая численность гетеротрофных микроорганизмов различалась в разных вариантах. В образцах № 2, 3, 4, 5 и 7 она составляла от 5 до  $10 \times 10^5$  КОЕ/г почвы (рис. 2). В вариантах № 1 и 6 количество гетеротрофных микроорганизмов было больше, составляя 25 и  $48 \times 10^5$  КОЕ/г почвы. И, наконец, два образца почвы отличались высокой численностью гетеротрофных бактерий, на 1–2 порядка выше, чем в других пробах, в варианте № 9 она равнялась  $75 \times 10^5$  КОЕ/г почвы, № 8 –  $685 \times 10^5$  КОЕ/г почвы.

Для анализа нами были выбраны также две физиологические группы микроорганизмов: метилотрофные и углеводородокисляющие бактерии. Различий в численности углеводородокисляющих бактерий в почвенных образцах было меньше, их содержание в среднем было от 2 до  $39 \times 10^5$  КОЕ/г почвы (см. рис. 2).

Сравнивая количество гетеротрофных и углеводородокисляющих бактерий в пробах, можно отметить, что в образцах № 3, 4 и 7 количество углеводородокисляющих микроорганизмов было выше, чем гетеротрофных. Такое повышенное содержание углеводородокисляющей микрофлоры связано, по всей видимости, с селективным воздействием соответствующих субстратов. Поэтому выявленные особенности могут косвенно свидетельствовать о присутствии в почве углеводородов.

Численность метилотрофных микроорганизмов варьировала в разных образцах почвы от 6 до  $60 \times 10^5$  КОЕ/г почвы (см. рис. 2). При сравнении количества гетеротрофных и метилотрофных бактерий в пробах было отмечено, что в образцах № 3, 5 и 7 содержание метилотрофных микроорганизмов было выше, чем гетеротрофных (см. рис. 2). Образцы почв № 3 и 7 также характеризовались повышенной численностью углеводородокисляющих бактерий.



Рис. 2. Численность углеводородоокисляющих, метилотрофных и гетеротрофных бактерий в почвенных пробах

Обращает на себя внимание тот факт, что в почвенных образцах № 5, 7 и 9 количество метилотрофных микроорганизмов выше, чем углеводородоокисляющих (в среднем в 2 раза), что свидетельствует о развитии в почве не только факультативных метилотрофов, но и облигатных. Это является косвенным доказательством наличия метана в верхнем горизонте почв над подземным хранилищем газа.

Таким образом, нами по результатам микробиологического анализа выделены образцы, которые отличались повышенным содержанием метилотрофных и углеводородоокисляющих бактерий: это, прежде всего, образцы № 3 и 7, в меньшей степени – № 4, 5 и 9. Данные образцы характеризовались также повышенным, по сравнению с другими пробами, окислительно-восстановительным потенциалом (см. таблицу). Большая часть окислительно-восстановительных реакций в почве имеет биохимическую природу и связана с микробиологическими процессами. Положительные значения редокс-потенциала почвы отражают преобладание в ней реакций окисления органических веществ, а также, возможно, реакций, связанных с превращением азота серы и окислением железа и марганца. Достоверных корреляционных взаимосвязей между магнитной восприимчивостью почвы и изученными микробиологическими показателями выявить не удалось.

В целом микробиологический анализ почвы над подземным хранилищем газа выявил в ряде образцов (№ 3, 4, 5, 7 и 9) характерные отличия

в содержании микроорганизмов индикаторных физиологических групп (углеводородоокисляющих и метилотрофных), которые позволяют говорить о поступлении метана в верхние слои почвы, возможно, вследствие нарушения условий хранения газа или природных геологических особенностей.

### Заключение

Проникновение газов из нижележащих слоев и формаций в более высоко расположенные горизонты и толщи сопровождается образованием сквозных газовых и бактериальных аномалий, расположенных друг над другом. Формирование бактериальных аномалий происходит в обозримо короткий срок вслед за появлением углеводородных газов в покровной толще пород. В отдельных случаях бактериальные аномалии фиксируются раньше газовых и помогают обнаруживать зоны скопления блуждающих газов, а также, что особенно важно, способствуют резкому снижению содержания метана и тяжелых углеводородов в толще покровных отложений.

Нами при исследовании почвенных проб над Степновским подземным хранилищем природного газа выявлены образцы с повышенным содержанием метилотрофных и углеводородоокисляющих бактерий. В почвенных образцах № 5, 7 и 9 обнаружены облигатные и факультативные метилотрофы, что является косвенным доказательством содержания метана в верхнем почвенном горизонте над подземным хранилищем газа.



Результаты микробиологической индикации почв свидетельствуют о наличии углеводородных газов в контуре нефтегазоносности, что может способствовать поиску источника газопроявления.

В целом представляется перспективным использование показателей численности исследованных физиологических групп метилотрофных и углеводородокисляющих бактерий для экологического мониторинга почв в районах газовых хранилищ.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках государственного задания в сфере научной деятельности (задание № 1757).*

### Список литературы

1. Розанов Б. Г. Геомембрана : мембранная функция почвы в планетарной геосферной системе Земли // Почвоведение. 1988. № 7. С. 54–58.
2. Перельман А. И. Геохимия. М. : Высш. шк., 1989. 528 с.
3. Пиковский Ю. И. Природные и техногенные потоки углеводородов в окружающей среде. М. : Изд-во МГУ, 1993. 208 с.
4. Оборин А. А., Ившина И. Б., Бердичевская М. В. О природных экологических факторах, влияющих на жизнедеятельность углеводородокисляющей микрофлоры // Геомикробиология поиска и разведки нефтяных месторождений. Тр. Ин-та биологии. Свердловск : УНЦ АН СССР, 1979. Вып. 124. С. 30–38.
5. Можарова Н. В. Функционирование и формирование почв над подземными хранилищами природного газа : автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2009. 48 с.
6. Таргульян В. О. Элементарные почвообразовательные процессы // Почвоведение. 2005. № 12. С. 1413–1422.
7. Решетников М. В. Магнитная индикация почв городских территорий (на примере г. Саратова). Саратов : Сарат. гос. техн. ун-т, 2011. 152 с.
8. Практикум по микробиологии : учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / под ред. А. И. Нетрусова. М. : Академия, 2005. 608 с.
9. Почвенные микроорганизмы : прокариоты, выделение, учет и идентификация : учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / под ред. Е. Г. Инешина. Улан-Удэ : Изд-во ВСГТУ, 2007. 143 с.
10. Азнаурьян Д. К. Изменение эколого-биологических свойств почв Юга России при загрязнении нефтью : автореф. дис. ... канд. биол. наук. Ростов н/Д, 2009. 22 с.
11. Dorn P. B., Salanitro J. P. Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation // Chemosphere. 2000. Vol. 40. P. 419–426.
12. Можарова Н. В., Пронина В. В., Иванов А. В., Шоба С. А., Загурский А. М. Формирование магнитных оксидов железа в почвах над подземными хранилищами газа // Почвоведение. 2007. № 6. С. 707–720.
13. Строганова М. Н. Магнитная восприимчивость почв урбанизированных территорий (на примере города Москвы) // Доклады по экологическому почвоведению. 2012. № 1, вып. 16. С. 40–80.