

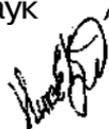
НИКИТИНА ЕЛЕНА ВЛАДИМИРОВНА

ТОКСИКОЛОГО - МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
БИОРЕМЕДИАЦИИ НЕФТЕШЛАМА - ОТХОДА
НЕФТЕХИМИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

03.00.07-Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на **соискание** ученой степени
кандидата биологических наук



Работа выполнена на кафедре микробиологии Казанского государственного университета им. В.И.Ульянова-Ленина

Научный руководитель: Доктор биологических наук,
профессор Р.П. Наумова

Официальные оппоненты: Член корр. РАН,
Доктор
биологических наук И.Б. Ившина

Доктор биологических наук,
профессор Л. П. Хохлова

Ведущая организация: Казанский Институт биохимии и
биофизики КНЦ РАН

Защита состоится « **2** » **октября** 2003г. в _____ на заседании
диссертационного совета Д.212.081.08 при Казанском
государственном университете им. В.И.Ульянова-Ленина, 420008,
г.Казань, ул. Кремлёвская, д. 18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского
государственного университета

Автореферат разослан _____ августа 2003г.

Ученый секретарь
диссертационного Совета,
кандидат биологических наук



А.Н. Аскарова

Актуальность проблемы. Мировое сообщество движется в направлении повышения уровня урбанизации и роста промышленного производства, в связи с чем, одна из главных международных экологических проблем связана с наличием в объектах биосферы сложных комплексов экологически опасных ксенобиотиков, которые представляют угрозу для почвы, воздуха, водоемов, источников питьевой воды, здоровья людей.

В нефтедобывающей, нефтеперерабатывающей и нефтехимической промышленных отраслях остро стоит проблема обезвреживания и утилизации больших объемов **нефте содержащих** отходов (Shailubhai, 1984; Castaldi, Ford, 1991; Giles et al., 2001; Mishra et al., 2001; Vasudevan, Rajaram, 2001; Saikia et al., 2001). Это в полной мере относится к производственному объединению «Нижнекамскнефтехим» (НКНХ) (г.Нижнекамск, Россия), функционирование которого сопряжено с постоянным образованием твердых **нефте содержащих** отходов. До недавнего времени в мировом масштабе наиболее распространенной была практика захоронения твердых опасных отходов на специализированных полигонах (Mueller et al., 1984; Holmboe, 1993; Saxena, Jotshi, 1997). Аналогично решалась эта проблема в НКНХ, где, начиная с 1965г, происходило накопление этих шламов в шламонакопителях. В настоящее время объемы скопившихся в этих специальных депо отходов достигают 1123 тыс м³. Существующие депо практически заполнены, а строительство новых противоречит экологическим критериям. В этих условиях возникла необходимость освобождения **шламонакопителей** и поиска путей обезвреживания и утилизации твердых нефтехимических отходов.

Нефтьшламы содержат устойчивые и токсичные компоненты, в частности, полициклические ароматические **углеводороды (ПАУ), алканы (Aprill et al., 1990; Rocha et al., 1997; Giles et al., 2001; Mishra et al., 2001),** а также могут включать специфические продукты нефтехимии (Якушева с соавт., 2002). Часть нефтехимических составляющих - это токсиканты и канцерогены (**Styrene, 1983; McMichael, 1988**). Химический состав шламов варьирует в зависимости от их происхождения, специфики применяемых на предприятиях технологий добычи, переработки и химического синтеза. Исходя из этого, в каждом конкретном случае необходимо создавать стратегию **ремедиации** с учетом биологических и абиотических особенностей, которые характеризуют исследуемые твердые **отходы**.

Научное обоснование стратегии ремедиации предполагает создание концепции химического, токсикологического и биологического статуса данной антропогенной экосистемы. К изучению первых двух аспектов привлечено внимание ряда **научно-**

исследовательских центров (April et al., 1990; Juvonen et al., 2000; Giles et al., 2001), по поводу последнего практически нет данных литературы.

Наличие и степень микробной контаминации нефтешламов важны с позиций эволюции биоценозов в процессе многолетней аккумуляции специфического комплекса ксенобиотиков. Литература по нефтешламам затрагивает, как правило, микробиологические аспекты биоремедиации (Lazar et al., 1999; Giles et al., 2001; Mishra et al., 2001; Vasudevan, Rajaram, 2001), но не собственно нефтешламов как концентрированного комплекса специфических загрязнителей. Вместе с тем, создание биотехнологии, направленной на детоксикацию и утилизацию нефтешлама, предполагает исследование микробиологического статуса этой антропогенной экосистемы, что и определило изучение закономерностей распределения ряда физиолого-таксономических групп микроорганизмов в промышленном накопителе нефтехимических отходов, особенностей их физиологического состояния с учетом специфики среды обитания.

Выживание и функционирование живых организмов в условиях сложной комбинации экстремальных факторов - проблема общебиологического масштаба. Дискуссии по вопросам, связанным с гипометаболическим, анабиотическим, жизнеспособным-но-некультивируемым, "другим состоянием" микробных популяций и сообществ (Kaprelyants et al., 1993; Atlas, Bartha, 1997; Trevors, 1998; Головлев, 1998; Mascher et al., 2000) свидетельствуют о сложности данной проблемы. Её исследование включает закономерности адаптации микроорганизмов в условиях сложного комплекса экстремальных факторов нефтешлама: токсичности, гидрофобности и низкой биодоступности ксенобиотиков, высокого осмотического давления, сезонных колебаний температур.

Мировой опыт по переработке твердых отходов демонстрирует наибольшую экономическую эффективность и экологическую безопасность применения биотехнологий, однако известны лишь немногочисленные примеры экспериментального и промышленного обезвреживания шламов с высоким содержанием нефтяных углеводородов с помощью такого распространенного приема биоремедиации как компостирование (O'Reilly, Simpkin, 1997; Kirchmann, Ewnetu, 1998; Lazar et al., 1999; Juvonen et al., 2000; Admon et al., 2001). При этом большинство работ сконцентрировано на исследованиях химических аспектов ремедиации нефтесодержащих отходов (E-Nawawy et al., 1992; Prado-Jatar et al., 1993; O'Reilly, Simpkin, 1997; Kirchmann, Ewnetu, 1998). В связи с ужесточением норм сброса в окружающую среду различных экологически опасных химических отходов возникла

необходимость в процессе обезвреживания **нефте**содержащих осадков, наряду с химическим мониторингом, осуществлять, токсикологические исследования (Aprillet al., 1990; Juvonen et al., 2000) в сочетании с выявлением закономерностей формирования и функционирования микробных сообществ в условиях компостирования **неф**тзагрязненных шламов (Vasudevan, Rajaram, 2001; Petrisor et al., 2001).

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы - создать научную основу эффективной биотехнологии **детоксикации** и утилизации сложного комплекса экологически опасных отходов нефтехимического предприятия. Были поставлены следующие **задачи**:

- Охарактеризовать исходный **неф**тешлам по химическим, токсикологическим и микробиологическим показателям;
- Выявить закономерности распределения ряда **физиолого-таксономических** групп микроорганизмов в промышленном накопителе нефтехимических отходов, а также оценить особенности их физиологического состояния с учетом специфики среды обитания;
- Оценить особенности метаболического потенциала микроорганизмов **неф**тешлама с позиции создаваемой биотехнологии;
- Осуществить **пилотно-полевое** компостирование на базе производственного объединения "**Нижнекамскнефтехим**" и оценить эффективность компостирования путем мониторинга с использованием основных химических, токсикологических и микробиологических параметров;
- Разработать рекомендации по практической реализации полномасштабной **ремедиации** нефтехимических отходов.

Научная новизна. Впервые дана характеристика химического состава, микробиологического статуса и токсикологических свойств твердых нефтехимических отходов. Выявлены закономерности пространственно-временного распределения основных **физиолого-таксономических** групп микроорганизмов в многотонной массе нефтехимических отходов с учетом принципиально важной доли их жизнеспособных форм. Новым является также аспект дифференцированной оценки стратегии адаптации различных физиологических групп микроорганизмов в условиях длительного воздействия комбинации экстремальных факторов. Предложена гипотеза эволюции микробного сообщества исследуемой антропогенной экосистемы.

Дана сравнительная характеристика контаминации нефтешламов с позиций численности и метаболической активности деструкторов основных устойчивых,

токсичных и мутагенных органических ксенобиотиков из би- и трициклоаренов, тиофенов, алканов.

Проведено разностороннее исследование токсических и генотоксических эффектов: острая и отдаленная токсичность в тестах на беспозвоночных, **ТОКСИЧНОСТЬ** по отношению к бактериям, **ФИТОТОКСИЧНОСТЬ**, мутагенность в тесте Эймса. •

Практическая значимость. Результаты диссертационной работы позволили практически реализовать в **пилотно-полевых** условиях (совместно с "Нижнекамскнефтехим") компостирование для обезвреживания и утилизации твердого отхода нефтехимических отходов производственного объединения "Нижнекамскнефтехим" на территории Биологических очистных сооружений и с привлечением материальной базы этого предприятия. Выявление высокой потенциальной метаболической активности микрофлоры нефтешлама позволило осуществить **ремедиацию** без интродукции бактериальных штаммов, что значительно удешевляет процесс. Применение испытанной технологии позволило уменьшить в среднем на 90% содержание нефтяных углеводородов, в том числе и полициклических ароматических углеводородов, с одновременной **детоксикацией** в отношении бактерий, одноклеточных организмов и растений. Создана система токсиколого-микробиологического и химического мониторинга, включающая тестирование различных физиолого-биохимических групп микроорганизмов и биологических активностей и изменение химического состава в процессе детоксикации и минерализации сложного комплекса промышленных отходов.

Апробация работы. Основные результаты диссертации представлены на: V и VI международных конференциях "Environmental contamination on central and eastern Europe" (Prague, 1999, 2003); VII Международном симпозиуме **In-Situ and On-Site Bioremediation** (Орландо, США); V международной конференции "Environmental pollution – I CEP-2001", (Volgograd-Perm, 2001); V, VI и VII **Пушкинских** конференциях молодых ученых "Биология - наука 21 века" (Пушино, 2001, 2002, 2003); II научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов **научно-образовательного центра** Казанского гос. университета (Казань, 2001). Основные результаты диссертации обсуждены на ежегодных дискуссиях партнеров в рамках проекта Европейского сообщества "**Copernicus-2**" (Вагенинген, Голландия), 2002 (Флоренция, Италия), 2002 (Казань, Россия).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 3 статьи, 11 тезисов докладов.

Структура и объем работы. Диссертация включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, изложение результатов исследований и их обсуждение, выводы и перечень цитируемой литературы. Работа изложена на 140 страницах машинописного текста, включает 9 таблиц и 33 рисунка. Цитируемая литература включает 211 источников, из них 182 иностранных.

Материалы и методы

Отбор проб нефтешлама и компостов Пробы изучаемого исходного нефтешлама - отхода нефтехимического производства НКНХ, отбирали из шламонакопителя, расположенного на территории биологических очистных сооружений этого предприятия. Образцы нефтешлама были отобраны из разных глубин (0,2, 1 и 3м) с помощью трех вертикальных скважин пробоотборником, обеспечивающим отбор проб из разных горизонтов без перемешивания слоев. Химические и токсикологические анализы проводили в течение 7-14 дней после отбора проб, которые хранили в закрытых полиэтиленовых ёмкостях при 4°C, герметизированных парафином. Микробиологические анализы выполнялись непосредственно после извлечения проб.

Экспериментальное компостирование в полевых условиях. На территории биологических очистных сооружений НКНХ в июне 1999 г были заложены 3 варианта **компостирования**: 1. К (контроль) - шлам + минеральные удобрения в виде нитроаммофоски (NPK); 2. ДТ - шлам + NPK + углеводородный компонент в виде дизельной фракции нефти (ДТ); 3. ОПЛ - шлам + NPK + твердый отход производства лапрола (ОПЛ), состоящий на 30% из бентонита, на 40% - из KH_2PO_4 и на 30% - из полиэфиров.

Микробиологические методы анализа. Прямой микроскопический учет микробных клеток проводили в соответствии с (Методы..., 1991). Жизнеспособность микроорганизмов определяли в тесте Когуры (Kogure et al., 1979). Численность культивируемой части микроорганизмов нефтешлама определяли с помощью посева методом серийных разведений. Учет общего количества аэробных гетеротрофов вели на мясоептонном агаре (МПА). При определении доли гипометаболических форм учитывали динамику появления колоний на МПА, согласно Кожевину (1989). Для этой цели время культивирования на агаризованных средах было увеличено до 8-11 суток.

Количество микромицетов учитывали на подкисленной среде Чапека, актиномицетов - на крахмало-аммиачном агаре, споробразующих микроорганизмов - на сусло-агаре, после предварительной пастеризации, денитрифицирующих бактерий - на среде Гильея, сульфатвосстанавливающих - на среде Постгейта В (Manual..., 1983).

Для учета числа микроорганизмов-деструкторов компонентов нефтешлама использовали агаризованный нефтешлам после его предварительного разбавления стерильным 0.05 М К-Na фосфатным буфером (рН 7.0) с таким расчетом, чтобы общее содержание органических веществ было соизмеримо с таковым в мясоептонном бульоне. Это достигалось шестикратным разбавлением исходного нефтешлама при

уровне его влажности 60%*. Учет числа микроорганизмов-деструкторов индивидуальных ксенобиотиков в нефтешламе проводили с использованием метода серийных разведений шлама и плотных питательных сред на основе среды следующего состава (г/л дистиллированной воды): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.25, KH_2PO_4 - 3.0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - 4.5, дрожжевой экстракт - 0.05, агар 20.0, pH 7.0. В качестве источника углерода вносили один из ксенобиотиков: **фенантрен**, антрацен, флуорен, гексадекан (по 400 мг/л), **дибензотиофен**, бифенил (по 200 мг/л), октан и нафталин (в парах).

Методы химического анализа. Содержание аммонийного, нитратного, нитритного азота, фосфат-ионов определяли по (Лурье, 1984). Определение суммы органических веществ проводили по ГОСТ 26213-91. Летучие компоненты **нефтешлама** определяли по методу, описанному (Лурье, 1984). **Хлороформ-экстрагируемые** вещества (нефтяных углеводородов) оценивали гравиметрически и **ИК-спектроскопией** после экстракции в аппарате **Сокслета**. Для определения мальтенов (**гексан-растворимые** компоненты) и асфальтенов (**гексан-нерастворимые** компоненты) хлороформный экстракт переэкстрагировали гексаном. Осадок **асфальтено-смолистых** соединений (**гексан-нерастворимых**) отделяли от мальтенов центрифугированием, промывали гексаном, и повторно центрифугировали, сушили и взвешивали. Определение **ПАУ** проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографией на приборе серии LPc UV-VIS детектором, на колонке с обращенной фазой (5тм, 4.6 CC 250 мм, **Ultracarb 50DS**, Phenomenex, USA).

Токсикологические методы. Токсичность водного **экстракта** нефтешлама и компостов по отношению к микроорганизмам определяли в тесте со штаммом *Pseudomonas putida* по ISO 10712 (ISO, 1995), острой токсичности - в тесте с *Paramecium caudatum* (Selivanovskaya et al., 1997). Полуколичественный метод учета генных мутаций (тест Эймса) осуществляли по методике Ильинской с соавторами (1995). **Фитотоксичность** нефтешлама (компостов) определяли на растениях из класса двудольных (редис *Raphanus sativus radiculata*) и однодольных (пшеница *Triticum aestivum*). Навеску нефтешлама или компоста шлама (5г) распределяли на чашке Петри, накрывали фильтровальной бумагой соответствующего диаметра, добавляли 5 мл стерильной водопроводной воды, раскладывали 10 семян одного из растений, заранее

*культивирование на обводненном агаризованном нефтешламе разработано Галиевым Р.А.

пророщенных, измеряли начальную длину корней, рассчитывали среднюю длину ($L_{нач}$). Через сутки измеряли длину корней, рассчитывали среднюю ($L_{конеч}$). Токсичность рассчитывали по формуле:

$$T = \frac{(L_{конеч} - L_{нач})_{опыт}}{(L_{нач} - L_{конеч})_{контр}} \times 100\%$$

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Характеристика отхода нефтехимического производства

1.1. Химико-токсикологические свойства нефтешлама

В изучаемом нефтехимическом шламе 20-25% от органического вещества составляют компоненты нефти (табл. 1), что характерно для данной категории нефтесодержащих отходов (Bartha, Bossert, 1984; Castaldi, Ford, 1992). В составе нефтяных углеводородов преобладает фракция **мальтенов**, более чем в 10 раз меньше **асфальтенов**, кроме того, присутствуют продукты и полупродукты нефтехимического производства: бензолы, **толуолы**, ксилолы, **стиролы**, часть из которых являются токсикантами и канцерогенами (McMichael, 1987; Styrene, 1983). Наличие таких продуктов является характерным именно для отходов нефтехимического синтеза (Castaldi, Ford, 1992; Якушева, Наумова, 1998).

К экологически опасным загрязнениям принадлежат многие характерные нефтяные компоненты **шламов**, в том числе ПАУ (Menzie et al., 1992). Концентрация 13 ПАУ (нафталина, **ацетонафтилена**, бифенила, флуорена, **фенантре-на**, антрацена, флуорантена, пирена, **1,2-бензофлуорантена**, хризена, бензо(а)пирена, **дибензо(х)антрацена**) в нефтешламе НКНХ сравнимас таковой в отходах нефтепереработки (Aprill et al., 1990), которые характеризуются как токсичные и экологически опасные. Кроме того, в нефтешламе НКНХ содержится особо контролируемый **бензо(а)пирен**, который в России не нормируется для отходов, а для почвы его ПДК составляет 0.02 мг/кг (Санит. нормы..., 1988). Оценивая перспективы переработки и утилизации изучаемого шлама, с учетом приведенных норм и фактического содержания бензо(а)пирена (12-47 мг/кг), этот компонент следует контролировать особо в процессе предстоящей обработки.

С точки зрения последующей ремедиации отходов нефтехимической **промышленности**, его важной составляющей являются минеральные компоненты и их сбалансированность для развития и активной жизнедеятельности микроорганизмов.

Химико-токсикологическая характеристика нефтешлама НКНХ

Химические параметры	Кон-ция
Органические вещества, г/кг	432 - 532
Углеводороды нефти, г/кг (гравиметрически)	102 - 149
Летучие углеводороды, г/кг	14 - 32
Мальтены, г/кг	95 - 139
Асфальтены, г/кг	6 - 10
Сумма 13 определенных ПАУ, г/кг	5 - 8
Азот	
Аммонийный, мгN/кг	49 - 245
Нитратный, мгN/кг	6-11
Нитритный, мгN/кг	1 - 8
Общий фосфор, мгP/кг	1-2
Сульфиды, мгS/кг	3 - 13
pH	7.8-8
Токсикологическая оценка	
Токсичность по отношению к <i>Ps. putida</i> , % ингибирования роста	- 18 - -28
Острая токсичность на <i>P. caudatum</i> , % смертности	58 - 74
Фитотоксичность нефтешлама, % ингибирования роста корней:	
Пшеница	95 - 100
Редис	96 - 100
Мутагенность на <i>Salmonella typhimurium</i> , кратность превышения над контролем:	
Вод. экстракт (с фракцией S9)	
TA98	9 - 10
TA100	9-15
Органич. экстракт (с фракцией S9)	
TA98	6-7
TA100	5-6

Согласно проведенным ранее исследованиям, оптимальные соотношения C:N и C:P для биоремедиации нефтешлама составляли 60:1 и 800:1, соответственно (Dibble, Bartha, 1979). В исследуемом нами отходе эти отношения были 1800:1 и 31000:1 (табл. 1), соответственно, что свидетельствует о дефиците азота и особенно фосфора для жизнедеятельности микроорганизмов, что было учтено при переработке нефтешлама с применением биологической технологии.

Экологическая опасность нефтешламов подтверждена при анализе токсичности. Выявлено высокое негативное воздействие на простейшие и растения, а также

показана мутагенность водных и органических экстрактов шлама (тест Эймса), возрастающая в 2-3 раза в присутствии метаболической активации (фракции S9) (табл. 1). Данные литературы по поводу токсического потенциала исходного нефтешлама отсутствуют, однако, ранее была обнаружена высокая токсичность и генотоксичность нефтешламо-загрязненных почв (Aprill et al., 1990) и компостов (Juvonen et al., 2000). Выявленный химический состав в сочетании с экотоксикологической оценкой шламов производственного объединения "Нижнекамскнефтехим" позволяет отнести их к экологически опасным отходам, которые требуют предварительного обезвреживания.

1.2 Микробиологический статус нефтешлама

Большинство известных работ посвящены ремедиации шламов нефтедобычи (Giles et al., 2001; Габбасова соавт., 2001) и нефтепереработки (Aprill et al., 1990; Rocha et al., 1997). В этих работах основной акцент делается на химико-токсикологических аспектах проблемы. Исключение составляют работы румынских (Petrisor et al., 2001) и индийских исследователей (Mishra et al., 2001; Vasudevan, Rajaram, 2001), однако, и в них анализ микробного сообщества ограничивается аэробными гетеротрофами и нефте-деструкторами.

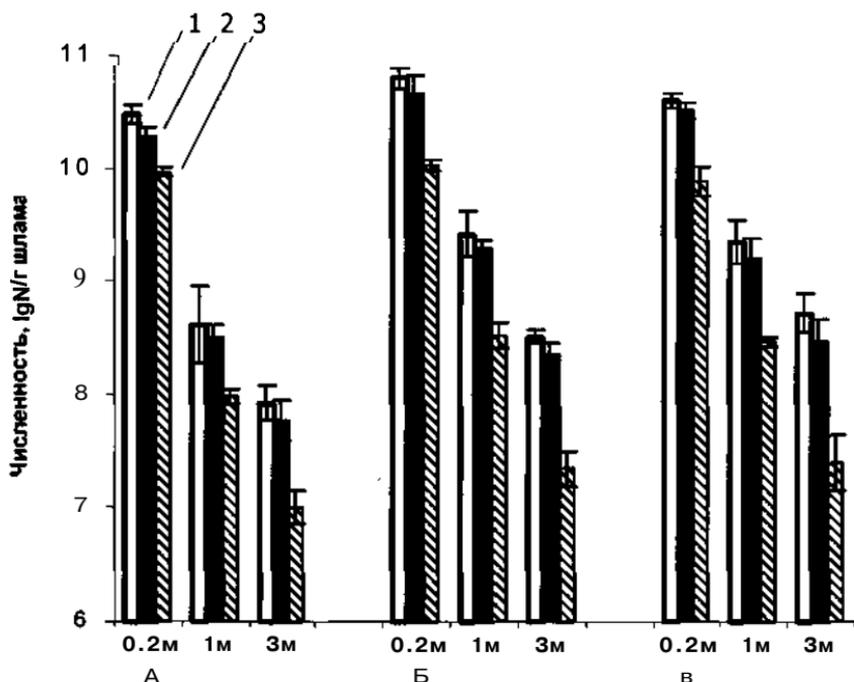


Рис. 1. Общая количественная характеристика микрофлоры нефтешлама. 1 - общее содержание микробных клеток, 2 - количество жизнеспособных клеток, 3 - количество аэробных гетеротрофов. А, Б и В - участки шламонакопителя.

Стратегия же **ремедиации нефтешлама зависит от совокупности** представлений о количестве, физиологическом статусе и метаболической активности населяющих его микроорганизмов. Принимая во внимание многолетнюю историю депонирования побочных продуктов нефтехимии, мы предприняли экспериментальное бурение **В** трех репрезентативных участках изучаемого **шламонакопителя** (А, Б и В). Это позволило оценить толщину создавшегося депо шлама (в среднем около 3 м) и асептически отобрать пробы из его отдельных горизонтов.

Неожиданным и наиболее значимым оказался факт высокой микробной обсемененное™ толщи нефтешлама, хотя во всех случаях проявлялась тенденция к снижению показателей численности с глубиной залегания соответствующих горизонтов (рис. 1). **С точки зрения** впервые проведенного нами исследования пространственного распределения и физиологического состояния микроорганизмов в многотонной массе нефтехимических отходов большой интерес представляет высокая доля жизнеспособных форм этих организмов (до 90%).

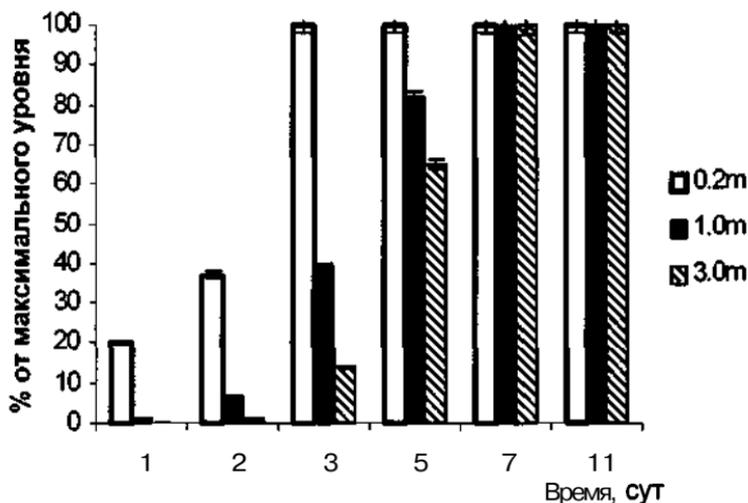


Рис. 2. Последовательность появления колоний аэробных гетеротрофов (в процентах от максимального уровня) в зависимости от глубины горизонта

Наблюдение за динамикой роста гетеротрофов после посева проб нефтешлама (сразу же после их асептического извлечения из накопителя) выявило важную особенность большинства микроорганизмов, населяющих толщу нефтешлама, а именно, запаздывающее (на 5-7 суток) появление и медленный последующий рост их колоний на **агаризованных** средах (рис.2), что позволяет оценить состояние этих микроорганизмов как гипометаболическое. Об обратимости этого состояния, по крайней мере, узначительной части **изолятов, свидетельствует то**, что, будучи выделены из медленно растущих колоний, они ускоряли темпы роста после 2-3 пассажей на средах, способных поддерживать их рост.

С учетом изложенного, наиболее вероятным представляется следующий ход эволюции микробных сообществ нефтешлама. Микроорганизмы могли активно размножаться в верхнем горизонте после очередного сброса отходов, то есть в условиях высокой концентрации доступных компонентов нефтешлама, достаточной аэрации на границе раздела шлам-воздух и увлажнения за счет атмосферных осадков. В результате последующего наслоения очередных порций шламовых масс экологическая ситуация в погребенном под ними слое резко ухудшалась, прежде всего в отношении кислородного, водного, осмотического и температурного режимов. Поэтому микробный статус "зрелого" шлама определяется способностью микроорганизмов к длительному (в течение десятилетий) выживанию в его толще, в условиях сложного комплекса экстремальных факторов. Рассмотренные выше данные свидетельствуют о наличии такой способности у большого количества микроорганизмов, включая обитателей самого нижнего горизонта шлама, возраст которого оценивается в 35-40 лет. Помимо аэробных гетеротрофов, анализ нефтешлама выявил в его толще высокий уровень различных групп микроорганизмов, в том числе **спорообразующих бактерий, актиномицетов и микромицетов** (рис. 3).

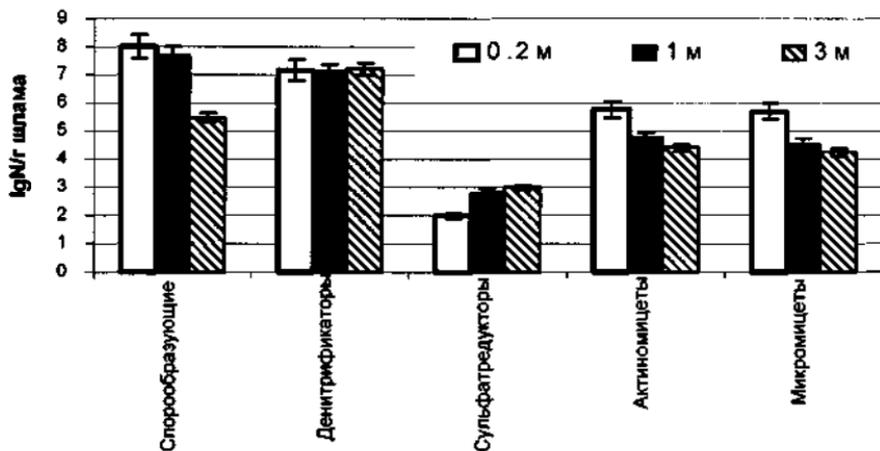


Рис. 3. Распределение основных физиолого-таксономических групп бактерий по горизонтам.

Минеральный азот нефтешлама находится в основном в аммонийной форме, что свидетельствует о блокировании нитрификации на первом, аэробном этапе трансформации шламовых масс после их поступления в накопитель. Это, в свою очередь, означает невозможность реализации потенциала денитрификаторов, несмотря на сравнительно высокий уровень их адаптации в условиях нефтешлама (рис.3).

Хотя бескислородные условия подповерхностных слоев благоприятны для **сульфатредукции** и данная группа бактерий представлена в нефтешламе (рис. 3), **сульфидогенез** невозможен и из-за низкого содержания сульфатов (на уровне 3-12 мг/кг), и из-за отсутствия условий для функционирования пищевой цепи (включающей

и аэробов, и анаэробных ацидо/ацетогенных бактерий), ответственной за регенерацию доступных органических субстратов. Последнее подтверждается характером жирных кислот (C5 - C16), обнаруженных в нефтешламе, а именно отсутствием низших гомологов этого ряда (Якушева с соавт., 2002). Таким образом, гипометаболическое состояние большей части микроорганизмов нефтешлама обусловлено неблагоприятными физическими факторами (гидрофобное окружение, аноксия), и/или отсутствием доступных питательных субстратов и альтернативных акцепторов электронов.

Сопоставимость величин КОЕ при посеве разведений проб **нативного** нефтешлама как на МПА, так и на **агаризованный** нефтешлам (рис. 4), свидетельствует о том, что многолетнее пребывание микроорганизмов в толще нефтехимических отходов не исключает возможности не только их выживания, но и сохранения разносторонней метаболической активности. Речь **идет** об утилизации как легкодоступных субстратов, так и специфических компонентов изучаемых отходов. **ПАУ**, входящие в состав тяжелой нефтяной фракции, в отличие от водорастворимых компонентов нефтехимических отходов, не подвергаются окислению в условиях биологической очистки сточных вод (Якушева, Наумова, 1998), и поэтому являются предметом особой озабоченности из-за устойчивости, мутагенности и канцерогенное™ многих из них (Menzie et al., 1992). Проведенный в этой связи скрининг микроорганизмов-деструкторов выявил их высокую активность в отношении компонентов нефтешлама, как алканов, так и некоторых соединений из класса ПАУ.

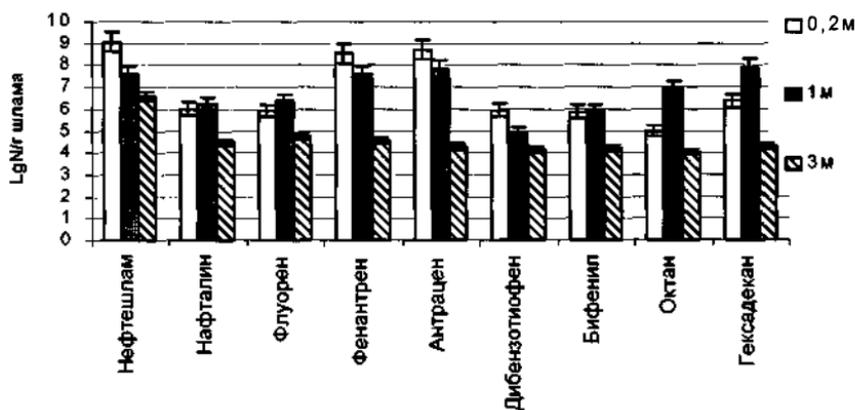


Рис. 4. Распределение деструкторов нефтешлама и индивидуальных ксенобиотиков в различных слоях нефтешлама.

Наличие адекватного метаболического потенциала в сочетании с широкими адаптивными возможностями микроорганизмов, населяющих нефтешлам, означает отсутствие необходимости в дополнительной биоаугментации в условиях создаваемой нами технологии **ремедиации** отходов нефтехимии.

1. Биоремедиация нефтехимического шлама

2.1. Химический мониторинг компостирования

После завершения цикла исследований по установлению химико-токсикологического и микробиологического статуса нефтешлама объединения НКНХ был изучен и решен вопрос о моделировании биоремедиации этого отхода в опытно-полевых условиях.

Мониторинг химических показателей в процессе опытно полевого компостирования шлама НКНХ выявил период продолжительностью 4 месяца, в течение которого наблюдалась высокая скорость элиминации нефтяного загрязнения из компоста, в среднем на 70-80%. Наибольшая скорость деструкции нефтяных углеводородов, в том числе ПАУ, зафиксирована в контрольном варианте. Высокая скорость деградации загрязнений, по-видимому, является следствием исходно высокой обсемененности шлама, наличия в составе микробного сообщества высоко активной специализированной микрофлоры, а также внесения N и P. Максимальная концентрация нефтесодержащих отходов в смесях, в отношении которой рядом авторов показана высокая эффективность применения компостирования, выявлена на уровне 10-15 % от общей массы компостируемой смеси (O'Reilly, Simpkin, 1997; Juvonen et al., 2000; Petrisor et al., 2001). В отличие от вышеприведенных примеров, изучаемый процесс эффективнее при исходном содержании шлама на уровне 30 %.

Таблица 2

Динамика ТОКСИКО-ХИМИЧЕСКИХ показателей в процессе компостирования нефтехимического шлама

Варианты компостирования	Контроль (К)			Добавлено дизельное топливо (ДТ)			Добавлен отход производства лапрола (ОПЛ)		
	0	3	16	0	3	16	0	3	16
Углеводороды нефти, г/кг (гравиметрически)	54.7	34.0	22.3	54.7	36.5	24.5	54.7	27.0	12.3
Углеводороды нефти, г/кг (ИК-спектроскопически)	79.2	40.2	10.1	79.2	37.5	11.0	79.2	33.6	10.2
Σ10 испыт. ПАУ, мг/кг	377.7	50.8	5.6	377.7	48.3	4.6	377.7	42,6	3.5
NH ₄ ⁺ , мгN/кг	200	35	17	200	125	22	200	32	8
NO ₃ ⁻ , мгN/кг	11.0	7.3	20.1	11.0	6.8	18.5	11.0	46.8	8.0
NO ₂ ⁻ , мгN/кг	6	1.5	0.3	6	2.4	0.9	6	2.1	0.3

Биоремедиационный процесс можно разделить на две фазы: 1 - активную (интенсивную), для которой характерна высокая скорость разложения контаминирующих агентов, и 2 - пассивную (экстенсивную), для которой отмечена низкая скорость деградации остаточных, в основном труднодоступных, компонентов нефтяного загрязнения (Harmsen et al., 1997; Smith et al., 1997). При компостировании нефтехимического шлама НКХ интенсивной фазе процесса соответствует период первых 4 мес, а экстенсивной - с 5 по 16 мес. Ряд авторов указывают на трудности деструкции остаточного нефтяного загрязнения, связанные с уменьшением подвижности органических соединений (Harmsen et al., 1994, Loehr, Webster, 1997).

2.2. Динамики микробиологических показателей в процессе компостирования

Комплексный анализ микробиологических параметров выявил повышение числа органотрофной части микробного сообщества (аэробные гетеротрофы и ПАУ-деструкторы (нафталин, фенантрен, антрацен)) в период интенсивной фазы ремедиации, что можно рассматривать как ответ микроорганизмов нефтешлама на улучшения условий обитания (рис. 5). В первую очередь это касается уменьшения концентрации нефтяных углеводородов за счет повышения степени аэрации и уменьшения влажности вследствие смешивания шлама с отработанным наполнителем биофильтра, дозировки азота и фосфора в компостируемые смеси. В пользу активизации микробного сообщества нефтешламовых компостов может говорить тот факт, что в первый месяц обработки резко снижается содержание аммонийного азота - наиболее доступной минеральной формы этого биогенного элемента. То обстоятельство, что в компосте происходит повышение содержания нитратов, в сочетании с отсутствием увеличения содержания нитритов, дает основание предполагать, что в условиях компостирования функционируют бактерии, ответственные за нитрификацию как первой, так и второй фазы.

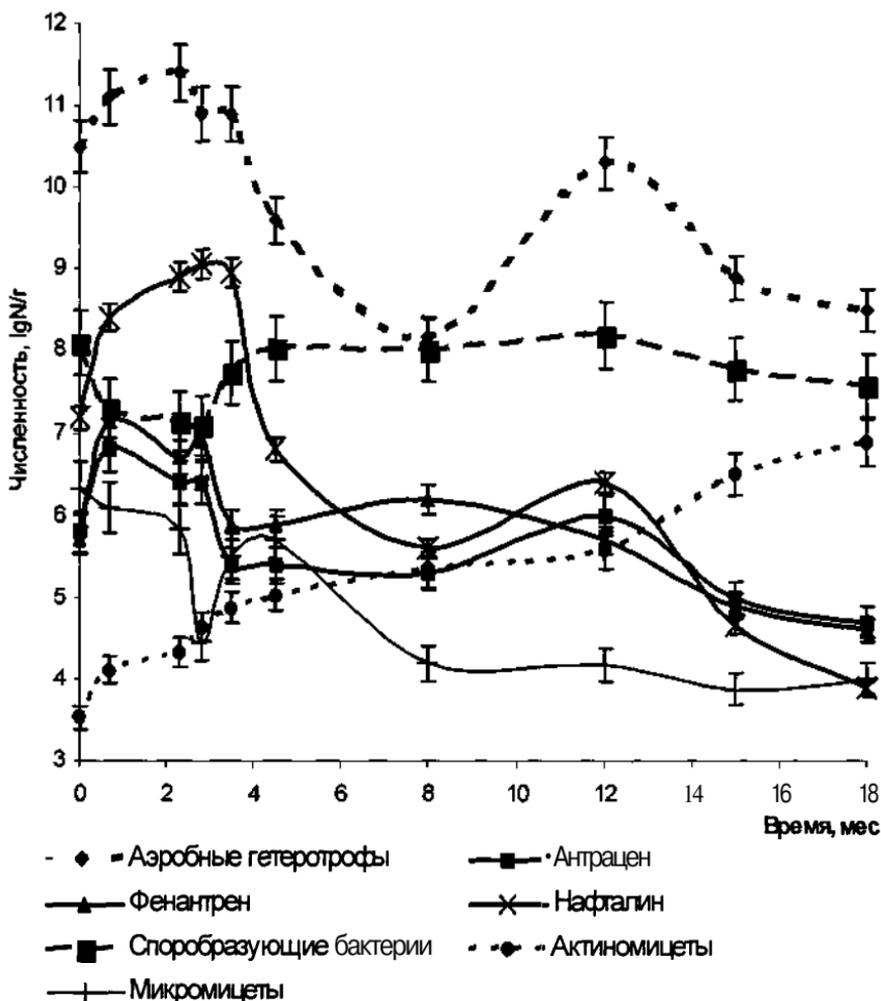


Рис.5. Динамика численности различных групп микроорганизмов (усредненная для трех вариантов) в процессе компостирования нефтешлама НКНХ.

Изучение микробной сукцессии в процессе компостирования нефтесодержащего отхода позволило выявить следующие закономерности.

В течение первого вегетационного сезона в первую очередь увеличивается численность микроорганизмов гетеротрофного блока бактерий, к которым принадлежат и деструкторы нефтяного загрязнения и его компонентов: нафталина, фенантрена, антрацена. Затем следует

умеренное увеличение численности микромицетов (рис. 5). Действительно, период активного разложения органического вещества характеризуется, в первую очередь, размножением неспорообразующих бактерий и развитием грибной микрофлоры (Мишустин, 1982).

Для завершающей стадии ремедиации (10-16 мес) наиболее показательно увеличение числа актиномицетов. Это объяснимо с позиции их экологической стратегии, в соответствии с которой, увеличение их количества наблюдается на последних этапах конвейерной переработки органического вещества, когда создаются условия для использования сравнительно труднодоступных субстратов (Зенова с соавт., 1996; Звягинцев, Зенова, 2001).

Сукцессия микроорганизмов при ремедиации нефтешлама идет по пути бактерии - грибы - актиномицеты. Сложившиеся соотношения групп микробного населения компостов по прошествии 16 мес испытаний свидетельствуют о наступлении устойчивого состояния в данной антропогенной экосистеме, которой, очевидно, отражает исчерпание основной, более доступной части органических загрязнений. Таким образом, динамика численности различных эколого-трофических групп в системе, созданной человеком, отражала в общих чертах картину характерную для естественной сукцессии природных экосистем (Мишустин, 1982).

2.3. Экотоксикологическая оценка компостирования

Ремедиация экологически опасных и токсичных отходов должна непременно сопровождаться токсикологическим мониторингом (Aprill et al., 1990; Juvonen et al., 2000; Murphy et al., 2001) с включением тест-объектов, принадлежащих к различным трофическим уровням живых организмов.

Отсутствие токсического действия, и даже напротив, стимуляция роста бактериального штамма *Pseudomonas putida* (табл. 3) под воздействием проб компостов, отобранных практически на всем протяжении компостирования, является следствием высокого содержания доступного органического питания в компостируемых смесях и нечувствительности тест-объекта к токсичности используемого объекта. Аналогичный вывод был сделан при тестировании токсичности в процессе обезвреживания шлама нефтепереработки (Juvonen et al., 2000). Следует иметь ввиду, что отсутствие токсического действия водных экстрактов компостов на микроорганизмы, в том числе и собственную микрофлору шлама, не является показателем отсутствия токсичности компостов в отношении других объектов.

Динамика токсичности в процессе компостирования нефтешлама

Варианты компостирования	Контроль (К)			Добавлено дизельное топливо (ДТ)			Добавлен отход производства лапрола (ОПЛ)		
	Месяц								
Параметры	0	3	16	0	3	16	0	3	16
Токсичность по отношению к <i>P. putida</i> , % ингибирования	-20	-116	-5	-20	-121	-8	-20	-60	-4
Острая токсичность на <i>P. caudatum</i> , % смертности	15	33	0	15	19	0	15	20	0
Фитотоксичность, % ингибирования									
Пшеница	20	29	9	20	26	11	20	22	7
Редис	34	37	10	34	33	8	34	27	8

В период интенсивного разложения органических загрязнений (3 мес от начала испытаний) токсическое действие водного экстракта на одноклеточные и растения увеличивалось (табл. 3). Аналогичное повышение токсического потенциала обнаружено при ремедиации шламов нефтедобывающей (Aprill et al., 1990) и нефтеперерабатывающей промышленности (Juvonen et al., 2000). Повышение токсичности во время биоремедиации ПАУ-загрязненных почв может быть результатом неполной деградации загрязнений и формирования токсичных промежуточных метаболитов (Wang, Bartha, 1990; Phillips et al., 2000). Складывается с данными литературы и временный характер повышения проявления токсичности (Juvonen et al., 2000).

Итоги компостирования нефтешлама подтверждают опыт других исследователей по детоксикации отходов с высокой исходной загрязненностью нефтяными компонентами, показывающий эффективность применения этого способа обработки с точки зрения токсикологических показателей (Juvonen et al., 2000). Однако, несмотря на отсутствие или резкое снижение негативного воздействия нефтешлама на различные группы живых организмов в конце испытаний (16 мес), в составе компостов сохраняются остаточные компоненты нефтяных углеводородов, в том числе принадлежащие к ПАУ, обладающие генотоксичностью. В этой связи наиболее верным является подход комплексного мониторинга объектов, подвергающихся обезвреживанию, как было предложено при выявлении токсикологических аспектов биоремедиации нефтезагрязненных почв (Murphy et al., 2001). К аналогичным выводам

пришли исследователи, изучающие процесс ремедиации почв с высокой контаминацией ПАУ (Phillips et al., 2000).

Снижение токсичности и стабилизация микробного сообщества коррелируют с уменьшением содержания углеводородов нефти. Наличие в компосте загрязняющих веществ на фоне отсутствия токсичности **свидетельствует** о стабилизации остаточного зафазнения. В результате ремедиации произошло сокращение содержание нефтяных углеводородов, в том числе ПАУ, при этом выявлено снижение токсического действия на простейшие и растения. Комплексный анализ компостируемых смесей показал эффективность применения данного метода биоремедиации для обезвреживания нефтехимического шлама "Нижнекамскнефтехим", что позволило нам рекомендовать использование компостирования для полномасштабной биоремедиации твердого отхода нефтехимического промышленного комплекса.

ВЫВОДЫ

1. Высокое содержанием нефтяных (около 150 г/кг) и собственно нефтехимических (около 2 г/кг) компонентов в составе твердых отходов объединения "Нижнекамскнефтехим" обуславливает острую токсичность по отношению к простейшим (летальный эффект до 78%), фитотоксичность (ингибирование нефтешламом роста корней растений до 100%, водной вытяжкой до 59%) и мутагенность (кратность превышения числа ревертантов: водная вытяжка - до 15, органическая вытяжка – до 7).

2. Впервые выявлен факт высокой микробной **обсемененности** толщи нефтешлама (до 10^{10} клеток/г), на фоне тенденции к снижению показателей **численности** с глубиной залегания горизонтов шламакопителя. Наиболее характерной особенностью физиологического статуса микроорганизмов в многолетней массе нефтехимических отходов является высокая доля жизнеспособных форм (до 90% от общего количества микробных клеток). Важной особенностью большинства микроорганизмов, населяющих толщу нефтешлама, является их **гипометаболическое** состояние.

3. Микробиологический скрининг культивируемой части микробного сообщества показал, что нефтешлам является источником метаболически активной и **экстремотолернатной** микрофлоры, в том числе деструкторов труднодоступных ксенобиотиков, **осморезистентных**, психро- и термотолерантных микроорганизмов. Наличие адекватного метаболического потенциала и разносторонней устойчивости у нефтешламовой микрофлоры исключает необходимость интродукции специальных микробных препаратов в процессе ремедиации нефтехимических отходов.

4. Создана коллекция из 20 метаболически активных бактериальных штаммов, **способных метаболизировать** нефтяные компоненты, в том числе полициклические ароматические углеводороды. Эти штаммы могут быть использованы и уже используются для интенсификации **ремедиации** объектов.

5. Сукцессия микробного сообщества в процессе компостирования **нефтешлама** характеризовалась увеличением **органоτροφной** части микробиоценоза в первые месяцы компостирования, свидетельствующим о биодоступности, отражающем **биоразлагаемость** нефтяного загрязнения. Повышение числа **актиномицетов** (на 2 порядка) и стабилизация уровня органики на завершающем этапе созревания **компостов** свидетельствует об исчерпании в компостируемых смесях субстратов, способных удовлетворять потребности **копиотрофов** в источниках органического питания. В результате ремедиации микробиоценоз компостов нефтешлама приобрел свойства устойчивого сообщества на поздней стадии сукцессии.

6. Компостирование в **пилотно-полевых** условиях выявило его высокую эффективность для обезвреживания экологически опасных нефтехимических отходов. Об этом свидетельствует снижение суммарного уровня нефтяных углеводородов (на 70-80%, по данным гравиметрического метода, на 90% - с использованием **ИК-спектроскопии**), суммы 10 исследованных полициклических ароматических углеводородов - на 97%. Выявлено достоверное снижение негативного влияния компостов нефтешлама на тест-объекты из числа простейших (с 15 до 0%) и растений (с 34 до 7%).

Благодарности

Автор выражает искреннюю признательность зав. лабораторией очистки сточных вод **ОАО "Нижнекамскнефтехим"** к.б.н. Якушевой О.И. и всему коллективу лаборатории за постоянное внимание, консультации, участие в проведении химических анализов, предоставление **материально-технической** базы для выполнения совместных **опытно-полевых испытаний**.

Автор искренне благодарит к.б.н. Наумова А.В. за участие в экспериментах по компостированию нефтешлама и к.х.н. **Гарусова А.В.** (НИЛ ЭББ КазГУ) за помощь в проведении качественного и количественного анализа нефтяных углеводородов.

Работы, опубликованные по теме диссертации

1. **Никитина Е.В.**, Якушева О.И., Зарипов С.А., Галиев Р.А., Гарусов А.В., Наумова Р.П. Особенности распределения и физиологического состояния микроорганизмов нефтешлама - отхода нефтехимического производства // **Микробиология**. - 2003. - Т.73, N.5. (в печати).
2. Якушева О.И., **Никитина Е.В.**, Частухина И.Б., Зарипов С.А., Суворова Е.С., Наумова Р.П. Микрофлора нефтешлама отхода нефтехимического производства // Вестник татарстанского отделения Российской экологической академии. - 2001. - № 1-2. - P.45-50.
3. Якушева О.И., Никонорова В.Н., Кияненко Г.В., Качалина О.В., **Алиулова Р.А., Никитина Е.В.**, Наумова Р.П. Особенности химического состава нефтешлама - отхода нефтехимического производства // VI Международная конференция по интенсификации нефтехимических процессов "Нефтехимия-2002". Нижнекамск, Россия. - 2002. - С. 271-276.
4. Yakusheva O.I., **Nikitina E.V.**, Naumova R.P. **Bioremediation** and reuse of petrochemical sludge in JSC "Nizhnekamskneftekhim" // Papers from 7th International In-Situ and On-Site Bioremediation Symposium. - Florida, U.S.A. June 2-5, -2003, (presentation).
5. Зарипов С.А., Наумов А. В., **Никитина Е. В.**, Наумова Р. П. Альтернативные пути начальной трансформации 2,4,6-тринитротолуола дрожжами. // **Микробиология**. -2002. -Т.71, №5. - С.506-511.
6. Yakusheva O.I., **Nikitina E.V.**, Zariipov S. A., Naumov A.V., Suvorova E.S., Naumova R.P. Petrochemical waste sludge as a source of **metabolically** active and **extremotolerant** microorganisms. // 5th International symposium "Environmental contamination in Central and Eastern Europe " **Czech Republic**, Prague. - **1999**. - P. 147.
7. Yakusheva O.I., **Nikitina E.V.**, Naumova R.P. **Microflora** of petrochemical oily sludge as the future potential for **bioremediation**//6th International symposium "Environmental contamination in Central and Eastern Europe and the Commonwealth of Independent States" **Czech Republic**, Prague. - 2003. (in press).
8. **Никитина Е.В.**, Матвеева Е.А., Халиуллина М.А., Якушева О.И., Наумова Р.П. Микробиология твердых отходов нефтехимической промышленности // **Сборник тезисов** конференции "Биология - наука XXI века", 7-я **Пушкинская** школа-конференция молодых ученых. - 14-18 апреля 2003г. - С.286.

9. Никитина Е.В., Якушева О.И., Гарусов А.В., Наумова Р.П. Компостирование как способ обезвреживания отходов нефтехимического производства. // XV зимняя международная молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Тезисы докладов. Москва. - 10-14 февраля, 2003. - С.57.

10. **Никитина Е.В.,** Матвеева Е.А., Галиев Р.А., Частухина И.Б., Якушева О.И., Наумова Р.П. Метаболическое разнообразие микроорганизмов – деструкторов нефтешлама // Сборник тезисов конференции "Биология - наука XXI века", 6-я Пущинская школа-конференция молодых ученых - 20-24 мая 2002г. - Т.3. - С.43.

11. Yakusheva O.I. Kharisova E.Z., Shurkhno R.A. Gareev R.G., **Nikitina E.V.,** Norina E. S., Naumova R.P. Bioremediation of petrochemical waste sludge by using of vermicomposting // 5th international conference "Environmental pollution – ICEP-2001", Volgograd-Perm, Russia. - 18-25 September, 2001. - P. 51.

12. **Nikitina E.V.,** Yakusheva O.I., Chastukhina I.B., Naumova R.P. Microorganisms of oil-contaminated waste as potential xenobiotics destructors // 5* conference of young scientist "Biology is science of 21st Century, Puschino, Russia. - 16-20 April 2001, - P.266.

13. Галухин В.А., Якушева О.И., Никонорова В.К., Гарифутдинова М.К., **Никитина Е.В.,** Наумова Р.П. Исследования по компостированию депонированных шламов ОАО "Нижнекамскнефтехим" // VI Международная конференция по интенсификации нефтехимических процессов "Нефтехимия-2002". Нижнекамск, Россия. - 2002. - С.276-277.

14. Якушева О.И., Зарипов С.А., **Никитина Е.В.,** Частухина И.Б., Суворова Е.С., Наумова Р.П. Нефтешлам как источник микроорганизмов-деструкторов ксенобиотиков // Тезисы докладов международной конференции "Экология и жизнь - 2000". - Великий Новгород, 2000. - С.2.