

На правах рукописи

ГАЛИЕВ РИНАТ АЛЕКСАНДРОВИЧ

ФИТОРЕМЕДИАЦИЯ НЕФТЕШЛАМА

03.00.07 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

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

Казань – 2007

Работа выполнена на кафедре микробиологии биолого-почвенного факультета
ГОУ ВПО «Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-
Ленина».

Научный руководитель: доктор биологических наук,
профессор Наумова Римма Павловна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор Селивановская Светлана Юрьевна
(кафедра прикладной экологии факультета
географии и экологии Казанского
государственного университета)

доктор биологических наук,
профессор Чиков Владимир Иванович
(лаборатория биохимии апопласта Казанского
института биохимии и биофизики КНЦ
РАН, г.Казань)

Ведущая организация: Институт Экологии Природных
Систем АН РТ (г.Казань).

Защита диссертации состоится «17» мая 2007 г. в 13⁰⁰ часов на заседании
диссертационного совета Д.212.081.08 при Казанском государственном
университете им. В.И. Ульянова-Ленина по адресу: 420008, г. Казань, ул.
Кремлевская, д.18, главное здание, ауд. № 209.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н.И.
Лобачевского при Казанском государственном университете.

Автореферат разослан «16» апреля 2007 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

З.И. Абрамова

Актуальность проблемы. Деятельность нефтехимического комплекса Республики Татарстан сопровождается образованием твердых отходов (нефтешламов), содержащих остаточную нефть и целевые и побочные продукты нефтехимического синтеза.

Согласно Государственный доклад "О состоянии природных ресурсов и об охране окружающей среды в Республике Татарстан в 2005 году", на территории Республики продолжаются процессы деградации загрязненных земель. В результате загрязнения нефтью и нефтепродуктами ежегодно выводится из оборота около 200 Га продуктивных земель, снижается их биологическая активность, возникают или усиливаются эрозионные процессы. Традиционные технологии детоксикации и рекультивации нефтезагрязненных почв и шламов неэффективны. Ввиду отсутствия приемлемой технологии восстановления загрязненных территорий вторичное введение их в оборот не представляется возможным (Государственный доклад..., 2006).

Практика депонирования нефтешламов в специальных накопителях до сих пор остается наиболее распространенной во многих странах. В результате многолетнего накопления осадков сточных вод нефтехимических предприятий Татарстана лимит их складирования почти полностью исчерпан, поэтому в настоящее время ведется активный поиск новых эффективных и экономичных технологий для решения проблемы обезвреживания и утилизации нефтешламов.

Физико-химические методы обработки нефтешламов являются дорогостоящими и сопряжены с образованием вторичных отходов в виде постэкстракционных и постсорбционных осадков, и, в случае сжигания, высокотоксичных продуктов неполного сгорания, захоронение и обезвреживание которых представляет дополнительную проблему. В свою очередь, биологические методы (биоремедиация) нефтесодержащих объектов признаны наиболее дешевыми и достаточно эффективными. В последние годы развивается новый подход к биоремедиации, использующий объединенный метаболический потенциал микроорганизмов и растений - фиторемедиация.

Мировая научная и патентная литература по биоремедиации нефтесодержащих объектов рассматривает, в основном, почвы, загрязненные относительно небольшим количеством углеводородов. В свою очередь, данных, относящихся непосредственно к нефтехимическим шламам, обладающим несопоставимо более высоким уровнем и токсичности, и углеводородного загрязнения, крайне мало. Имеются лишь отдельные сведения, указывающие на возможность их обезвреживания путем компостирования (Никитина с соавт., 2004) и ландфарминга (землевания) (Morelli et al., 2005).

Анализ литературы, а также опыта исследований кафедры микробиологии КГУ в области экологической биотехнологии позволяет заключить, что прогноз эффективности той или иной стратегии биоремедиации в решающей мере зависит от разностороннего обоснования ключевых

параметров создаваемой технологической схемы, как на уровне ее лабораторного моделирования, так и практической апробации.

Цель данной работы - разностороннее обоснование возможности и эффективности обезвреживания и переработки твердых отходов нефтехимии с использованием биотехнологии на основе микробно-растительных взаимодействий.

Основные задачи исследования.

1. Охарактеризовать сырой нефтешлам с точки зрения возможности его фиторемедиации;
2. Оценить возможность предварительной детоксикации сырого нефтешлама и изменения его исходного загрязнения и физических свойств до уровня, совместимого с ростом растений;
3. Обосновать выбор токсико-толерантных растений - потенциальных фитомелиорантов нефтешлама;
4. Осуществить экспресс-тестирование потенциала фиторемедиации нефтешлама в краткосрочном эксперименте;
5. Разработать технологическую схему управления процессом фиторемедиации путем корректировки соотношения биогенных элементов, комбинации нефтешлама с почвой и оптимизации водо- и газообменных процессов;
6. Охарактеризовать эффективность разработанной технологической схемы ремедиации нефтешлама с позиции ключевых параметров процесса: суммарного органического загрязнения и его фракций, токсичности (по совокупности тестов разного уровня), по динамике численности и респираторной активности микрофлоры.

Научная новизна. Впервые научно обоснована технологическая схема фиторемедиации твердых нефтехимических отходов с использованием объединенного метаболического потенциала микроорганизмов и растений.

Скрининг токсико-резистентных растений осуществлен при экстремально высоком содержании углеводородного загрязнения.

Разработана система направленной регуляции фиторемедиационного процесса, включающая использование почвы и фитомассы в качестве структурирующих агентов, и природных органических ко-субстратов минерального азота для корректировки соотношения биогенных элементов.

Эффективность фиторемедиации оценена с привлечением химического и токсико-биологического мониторинга.

Практическая значимость. Применение испытанной в лабораторных условиях технологической схемы позволило уменьшить в среднем на 90% содержание остаточных нефтяных углеводородов, целевых и побочных продуктов нефтехимического синтеза, с одновременной элиминацией токсического действия компонентов нефтешлама на зоо- и растительные тест-организмы. Результаты данной работы положены в основу патента (Патент РФ,

2006) и запланированных на 2007-2008гг опытно-промышленных испытаний фиторемедиации нефтешлама ОАО «Нижекамскнефтехим».

Связь работы с научными программами: Работа выполнена по теме «Устойчивые токсичные химические загрязнения в объектах окружающей среды: механизмы обезвреживания и вовлечения в природные биогеохимические циклы» (№ госрегистрации 01 200 106145), а также в рамках гранта ЕС по программе «Коперникус-2» (ISA-2СТ2-2000-10006 «Bioremediation»), госконтракта АНРТ №09-9.4-38 (2006 г.), госконтракта Аналитической Ведомственной целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы» РНП 2.1.1.1005, согласно темплану 1.15.06 «Механизмы регуляции функциональной активности клетки».

Положения, выносимые на защиту.

1. Фиторемедиация твердого отхода нефтехимии (нефтешлама) возможна с применением растительной морт-массы и объединенного метаболического потенциала микроорганизмов и растений.

2. Созданная технологическая схема фиторемедиации обеспечивает снижение углеводородного загрязнения на 90% , токсичности в отношении ряда тест-объектов до безопасного уровня.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на международных и региональных конференциях: 8-й международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2004), конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии» (Казань, 2004), первой международной конференции «Микробная биотехнология – новые подходы и решения», Казань, 5-8 февраля 2007г, представлена на выставке «Всероссийская выставка научно-технического творчества молодежи» (Москва, 2005), школе-конференции «Экотоксикология: современные биоаналитические системы, методы и технологии» (Пущино, 2006), Intern.Conf. «Issues and Solutions in Discovery and Use of Novel Biomolecules: Biodiversity and Environment» (Puschino, 2004), IWA Specialized Conference «Sustainable sludge management: state of the art, challenges and perspectives» (Moscow, 2006).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 научных работ.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю доктору биологических наук Р.П. Наумовой, кандидату биологических наук О.И. Якушевой, кандидату биологических наук Р.А. Шурхно, сотрудникам кафедры микробиологии и предприятия ОАО «Нижекамскнефтехим», аспиранту кафедры микробиологии Т.В. Григорьевой.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, раздела экспериментальных исследований и обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа изложена на 112 страницах машинописного текста,

включает 9 таблиц и 13 рисунков. Библиография содержит наименований работ российских и зарубежных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первый этап фиторемедиации (предобработка сырого нефтешлама с привлечением растительной морт-массы) осуществляли в пилотно-полевых условиях в течение 12 месяцев. Пробы отбирали специальным пробоотборником из 10 точек, равномерно распределенных по поверхности полигона.

Скрининг токсикорезистентных растений проводили в лабораторных условиях с использованием тестов на фитотоксичность.

Лабораторные эксперименты проводили на освещаемом стенде. Отбор проб осуществляли методом конверта (Аринушкина, 1970). Микробиологические, физические, химические и токсикологические анализы проводили в течение 7-10 дней после отбора проб, которые хранили в герметичных стеклянных емкостях при 4 °С.

Экспресс-оценка потенциала обезвреживания нефтешлама растением-фитомелиорантом по завершении первого этапа фиторемедиации. Эксперимент проводили с предобработанным нефтешламом в стеклянных емкостях на 0,4л в течение 1 месяца. Абиотический контроль, содержал 2% NaN_3 .

В связи с высоким фоновым содержанием фосфора в сыром и предобработанном нефтешламах (Робщ=8,3 г/кг) из удобрений варьировали только минеральный азот (NH_4NO_3), по схеме С:N : 25:1; 22:1; 20:1; 13:1; 10:1 и 9:1.

Моделирование второго этапа фиторемедиации в 12-месячном лабораторном эксперименте осуществлено по схеме, где нефтешлам (НШ) и дополнительные компоненты комбинировали следующим образом:

- 1) НШ абиот. – с внесением NaN_3 – абиотический контроль;
- 2) НШ –без внесения каких-либо компонентов;
- 3) НШ+УД –с внесением удобрений (в виде водного раствора NH_4NO_3 в концентрации 1,3 гN/кг в первый и на третий месяц);
- 4) НШ+УД+П –с внесением удобрений и почвы (выщелоченный чернозем);
- 5) НШ+УД+ПЛ –с внесением удобрений и посевом растений (плевел);
- 6) НШ+УД+П+ПЛ –с внесением удобрений, почвы и посевом растений.

Численность аэробных гетеротрофных микроорганизмов учитывали на мясопептонном агаре (МПА) (Manual.,1983). Долю гипометаболических форм оценивали по динамике появления колоний на МПА, согласно Кожевину (1989).

Количество микробицетов определяли на подкисленной среде Чапека, актиномицетов – на крахмало-аммиачном агаре (Manual.,1983). Для учета количества микроорганизмов-деструкторов компонентов нефтешлама использовали агаризованную взвесь предобработанного нефтешлама (Galiev et al., 2003).

Активность базального дыхания оценивали по выделению CO₂ на газовом хроматографе «Хром-5» (Гарусов с соавт., 1998).

Общее содержание бихромат-окисляемого органического вещества в нефтешламе определяли по Тюрину, **валовый азот** по Къельдалю (Аринушкина, 1970), **подвижный аммонийный азот** – колориметрически, с реактивом Неслера (Лурье, 1984).

Хлороформ-экстрагируемые вещества определяли гравиметрически после экстракции образца хлороформом в аппарате Сокслета, **асфальтены** - после осаждения н-гексаном из хлороформного экстракта (Versan et al.,1998).

Содержание летучих компонентов нефтешлама на основе их отгонки с паром и сбора в ловушке (Лурье,1984).

Подвижный и валовый фосфор определяли фотоколориметрически по образованию фосфорномолибденового комплекса до и после сжигания органического вещества кислотой по ГОСТу 26261 (1984) и ГОСТу 26207 (1992), соответственно.

Зольность определяли с использованием высокотемпературного сжигания по РД 204.2.20 (2001).

Водоудерживающую способность определяли в соответствии с ISO 11269-2 (1993).

pH нефтешлама определяли в водном экстракте при соотношении нефтешлам: вода 1/5.

Фитотоксичность оценивали по **прорастанию семян** (Juvonen et al., 1999; Wang,1991), **появлению проростков и росту высших растений** в соответствии с адаптированным к шламу международным методом для оценки фитотоксичности почв (ISO 11269-2, 1993).

Статистическая обработка результатов проводилась с применением методов математической статистики (Лакин, 1990), а также программного обеспечения Excel 5.0/2000. В качестве критерия достоверности получаемых разностей использовали критерий Стьюдента, принимая $P \leq 0.05$ за достоверный уровень значимости.

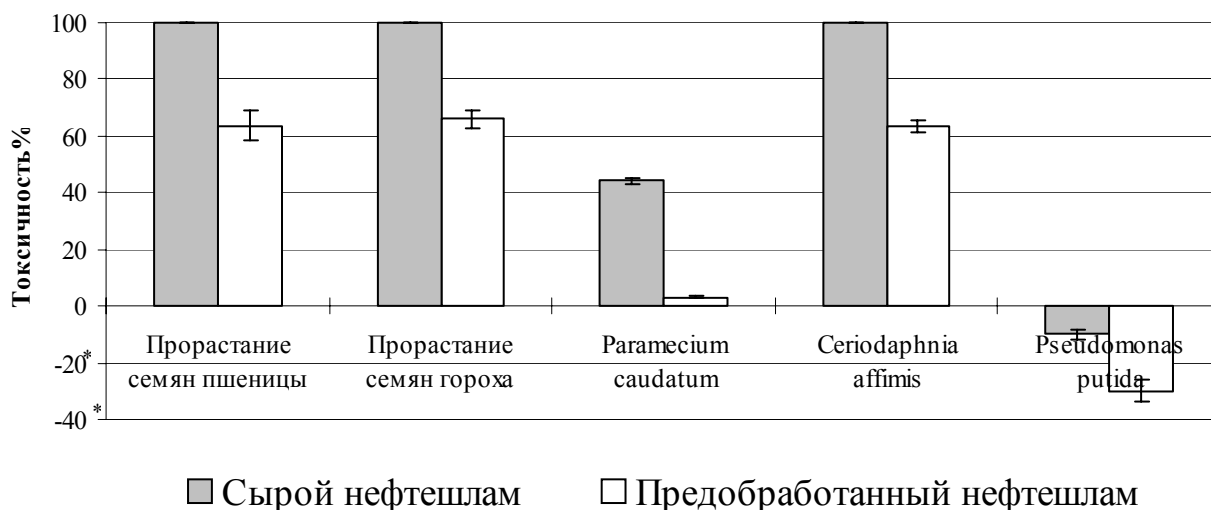
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Первый этап фиторемедиации (предобработка сырого нефтешлама с использованием растительной морт-массы)

Поскольку предшествующая научная и патентная литература не давала ответа на вопрос о самой возможности ремедиации твердых нефтехимических отходов на основе объединенного метаболического потенциала микроорганизмов и растений, нам предстояло охарактеризовать фитотоксичность нефтешлама как субстрата для прорастания семян и их последующего роста. Оказалось, что непосредственный контакт семян растений с нефтешламом исключает возможность их прорастания. 100%-я фитотоксичность обусловлена как химическим составом нефтешлама, высоконагруженного остаточными компонентами нефти и нефтехимии, так и физическими свойствами данного отхода - его гидрофобностью, высокой обводненностью, затрудненным газообменом с атмосферным воздухом.

Нами впервые осуществлен фиторемедиационный подход (с применением растительной морт-массы на первом этапе фиторемедиации) к сырому нефтешламу с высоким уровнем углеводородного загрязнения (255 г/кг), что позволило в дальнейшем использовать объединенный метаболический потенциал микроорганизмов и растущих на шламе растений (второй этап фиторемедиации) для его обезвреживания и переработки.

Изменения химических и токсикологических параметров нефтешлама в ходе первого этапа фиторемедиации отражены на рис. 1 и табл. 1.



*стимулирующий эффект

Рис. 1. Токсический и стимулирующий эффект сырого и предобработанного нефтешлама по отношению к тест-объектам разного таксономического уровня

Численность аэробных гетеротрофных микроорганизмов после первого этапа фиторемедиации с применением растительной морт-массы - относительно легкодоступным источником питательных веществ для микроорганизмов, увеличилась на два порядка, с 10^6 до 10^8 КОЕ/г. По завершении первого этапа обезвреживания нефтешлама большинство микроорганизмов перешло из гипометаболического состояния, характерного для толщи сырого нефтешлама, в активное физиологическое состояние.

Таблица 1

Химические характеристики сырого и предобработанного с использованием растительной морт-массы нефтешлама

Характеристика	Сырой нефтешлам	Предобработанный нефтешлам
Органический углерод (Сорг), гС/кг	280,5±8,7	243,4±9,3
Хлороформ-извлекаемые вещества, г/кг	254,6±10,4	180,4±12,5
Мальтены, г/кг	247,1±9,4	156,2±8,9
Асфальтены, г/кг	7,5±2,1	24,2±1,6
Летучие вещества, г/кг	53,8±9,2	8,9±4,5
Зольность, г/кг	376,8±16,3	469,9±14,6
Валовый азот, гN/кг	7,1±0,3	8,5±0,4
Подвижный азот, мгN/кг	230,9±14,1	30,1±3,2
Валовый фосфор, гP/кг	8,5±0,4	8,3±0,3
Подвижный фосфор, мгP/кг	80,4±1,5	40,2±2,0
Соотношение C:N:P	56:1:1,7	29,3:1:1
pH (H ₂ O)	8±0,2	7,3±0,1

2. Скрининг токсикорезистентных растений

Эффективность фиторемедиации зависит от правильной ориентации на растение-фитомелиорант (Квеситадзе с соавт., 2005; Huang et al., 2005).

Нами впервые проведен скрининг растений, способных к росту на шламе нефтехимического производства с высоким уровнем остаточного углеводородного загрязнения, который в результате первого этапа фиторемедиации составил около 180 г/кг.

По совокупности исследуемых параметров (табл.2) злаковые растения, а среди них плевел, оказались наиболее толерантными к токсическому воздействию предобработанного нефтешлама. Характеристика роста плевела

удовлетворяла требованиям, которые предъявляются к растениям, используемым в фиторемедиации.

В связи с тем, что плевел являлся самым токсикорезистентным растением, мы использовали его в качестве растения-фитомелиоранта на втором этапе фиторемедиации нефтешлама.

Таблица 2

Скрининг токсико-резистентных растений

Растения	Ингибирование, %			Период вегетации, сут	Выживаемость, %
	прорастания семян	появления побегов	роста растений (фитомассы побегов)		
<i>Плевел</i>	38,3±2,9	41,7±2,9	19,5±1,9	50,3±2,1	79,9±9,9
Тимофеевка	47,5±2,9	52,6±2,9	25,2±2,5	47,0±0,0	78,8±6,0
Ячмень	60,3±3,0	68,4±5,3	40,4±2,7	38,3±1,5	50,0±16,7
Просо	61,4±3,0	66,1±3,1	35,8±1,9	34,0±1,0	52,8±9,0
Рожь	60,8±3,1	69,0±3,2	38,2±2,7	37,3±0,6	58,6±10,4
Пшеница	63,7±5,2	68,9±5,2	38,3±1,8	39,3±1,5	61,1±9,6
Кукуруза	67,2±5,5	70,9±3,2	45,5±3,5	35,0±1,7	62,8±11,0
Горох	66,1±3,1	70,9±6,3	50,2±3,3	29,7±0,6	31,4±11,0
Эспарцет	74,1±5,2	84,5±5,2	30,1±2,1	39,7±1,5	66,7±0,0
Люцерна	89,6±5,2	94,7±0,0	*	12,7±1,2	0
Клевер	92,6±3,2	94,4±5,6	*	10,0±1,0	0
Лядвенец	90,7±3,2	92,6±3,2	*	8,3±0,6	0
Рапс	83,6±5,5	92,6±6,4	*	12,0±1,0	0

* - оценка невозможна в связи с высокой токсичностью в тестах на прорастание семян и появление побегов.

3. Предварительная экспресс-оценка потенциала второго этапа обезвреживания нефтешлама с использованием растения-фитомелиоранта

Краткосрочное (в течение месяца) экспресс-тестирование потенциала обезвреживания нефтешлама при участии растения-фитомелиоранта (плевела) дало возможность прогнозировать эффект долгосрочного моделирования при применении разных концентраций вносимого удобрения. Определены границы оптимальной дозировки азота, при которых стимулировался и/или не ингибировался рост микроорганизмов и растений.

В присутствии растений хлороформ-извлекаемые вещества убывали значительно быстрее, чем в их отсутствие. Наибольшая убыль хлороформ-извлекаемых веществ в вариантах без растений (31,2%) и с растениями (45,3%) наблюдалась при дополнительной дозе азота - 1,3 гN/кг (C:N=25:1) (рис.2).

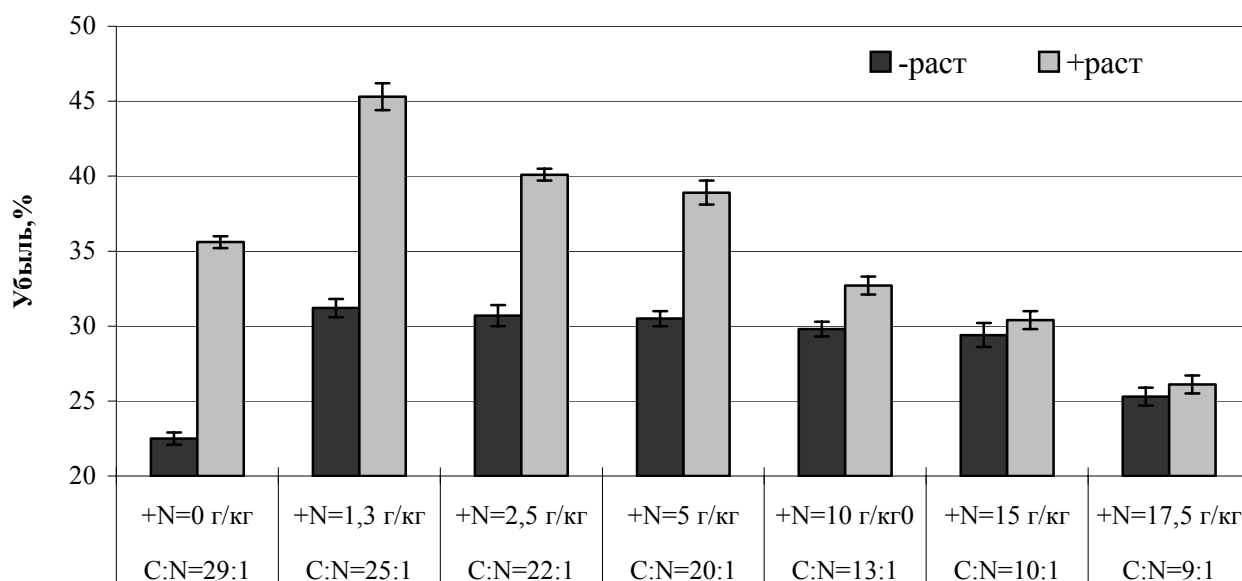


Рис. 2. Убыль хлороформ-извлекаемых веществ при варьировании дозы азота (+N – добавляемый азот; -раст и +раст – варианты без/с растениями, соответственно)

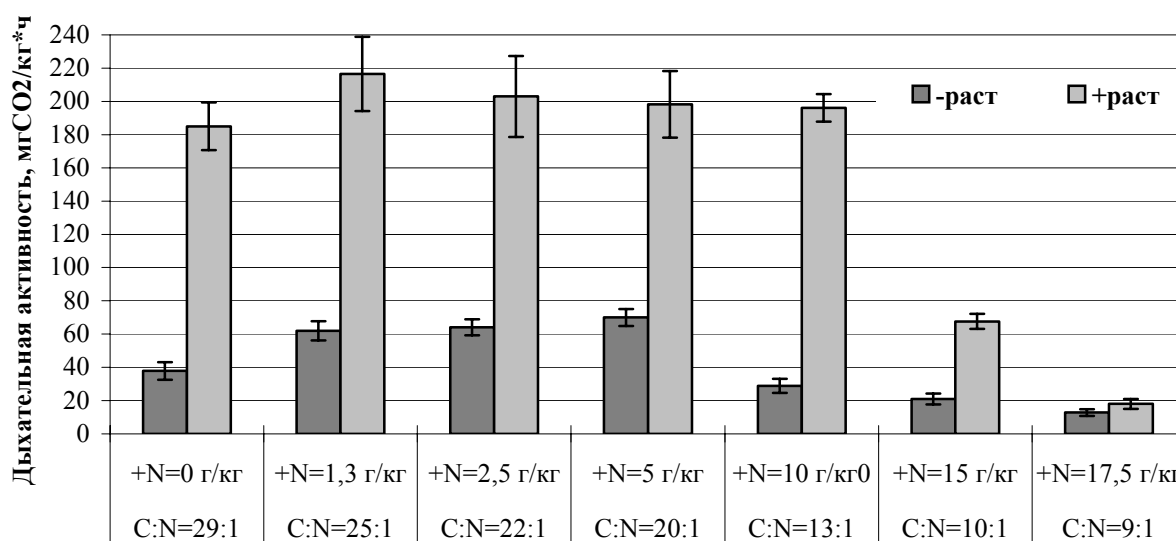


Рис.3. Уровень дыхательной активности в конце экспресс-оценки потенциала фиторемедиации предобработанного нефтешлама

Базальное дыхание (V_{basal}) является интегральным показателем активности микробиологических процессов, протекающих в нефтешламе, отражающим доступность окисляемого органического вещества для микрофлоры шлама. В вариантах экспресс-тестирования, в случае отсутствия растений изменение дыхательной активности соотносилось с изменением

уровня деградации хлороформ-извлекаемых веществ. При этом она стимулировалась на треть (до 60-70 мгСО₂/кг) дополнительным азотом (до 5 г/кг), тогда как повышение дозы N (более 10 г/кг) приводило к примерно двукратному снижению активности дыхания (до 10-30 мгСО₂/кг) (рис.3).

В присутствии растений уровень дыхания был в 3-4 раза выше, чем без них и достигал около 200 мгСО₂/кг*ч. В отличие от варианта без растений, при дозе азота 10 г/кг не наблюдали ингибирования дыхания в конце экспресс-тестирования. Оно оставалось на высоком уровне и начинало угнетаться только при внесении азота в количестве 15 г/кг.

4. Второй этап фиторемедиации (моделирование фиторемедиационного процесса в долгосрочном лабораторном эксперименте)

Второй этап фиторемедиации основывался на использовании объединенного метаболического потенциала микроорганизмов и растущих на предобработанном нефтешламе растений. Моделирование фиторемедиации в 12-месячном лабораторном эксперименте выявило ключевые факторы, влияющие на обезвреживание нефтешлама, на основе которых разработана принципиальная схема управления фиторемедиацией.

Продемонстрирована возможность регуляции норм и сроков повторного посева семян плевела в ходе фиторемедиации, которые осуществлялись с учетом проявлений фитотоксичности по отношению к данному растению. Продемонстрирована целесообразность 5 и 7 посевов плевела в течение вегетационного сезона в вариантах НШ+УД+П+ПЛ и НШ+УД+ПЛ, соответственно.

Роль почвы в фиторемедиации предобработанного нефтешлама проявлялась уже на начальных этапах второго этапа фиторемедиации: внесение даже 10% почвы от веса предобработанного нефтешлама существенно снизило фитотоксичность по отношению к прорастанию семян плевела и его дальнейшему росту. Снижение фитотоксичности может быть связано с адсорбцией углеводородного загрязнения на неорганической и органической фракциях почвы (Burauel, Fuhr, 2000). Положительное влияние внесения указанной дозы почвы на состояние растений в процессе фиторемедиации позволяет уменьшить количество повторных посевов фитомелиоранта, что важно с точки зрения экономичности создаваемого процесса.

Внесение минерального азота позволило корректировать соотношение биогенных элементов (C:N:P) и гармонизировать потребности микроорганизмов и растений в процессе деградации углеводородного загрязнения предобработанного нефтешлама, поскольку удобрения могут оказывать как прямой эффект на микробную биодеградацию органических компонентов через увеличение их численности и активности (Venosa et al.,

1996), так и опосредованно, через стимуляцию роста растений (Lin, Mendelsson, 1998).

Периодическое перемешивание растительной массы со шламом в процессе фиторемедиации способствовало обеспечению потребностей микроорганизмов в легкодоступных источниках питания, которые поддерживают рост микроорганизмов, в том числе за счет кометаболизма труднодоступных остаточных компонентов нефтяного загрязнения (Agganagen et al., 1999; Fisk, Faney, 2001). По мнению Банка с соавторами, лимитирующим фактором для жизнедеятельности микроорганизмов в подобных условиях являются адекватные ростовые субстраты, а не ингибирование загрязнением (Banks et al., 2003). Известно, что сезонное отмирание корней растений высвобождает специфические органические вещества, например, флавоноиды, которые активизируют деструкцию полихлорированных бифенилов (Johnson et al., 2005).

Перемешивание с фитомассой, также как и внесение почвы, способствовало структурированию нефтешлама и активизации водо- и газообменных процессов, повышению уровня дыхания, подобно тому, как это имело место в нефтезагрязненной почве с высокой концентрацией углеводов (более 200 г/кг) (Jonasson et al., 2004).

Хлороформ-извлекаемые вещества. Абиотическое снижение хлороформ-извлекаемых веществ за год моделирования ремедиации составило 14,1%. Наибольшая их убыль в ходе 12-месячного моделирования произошла в варианте НШ+УД+П+ПЛ – около 80%. Общий итог обоих этапов фиторемедиации по данному параметру составил 88%.

Таблица 3

Убыль хлороформ-извлекаемых веществ на втором этапе фиторемедиации и общая убыль за 2 года в ходе первого и второго этапов

Варианты	Убыль хлороформ-извлекаемых веществ, %	
	Второй этап	Итог фиторемедиации
НШ	33,5	52,9
НШ+УД	43,1	59,7
НШ+УД+П	50,0	70,5
НШ+УД+ПЛ	54,8	68,0
НШ+УД+П+ПЛ	79,6	88,0

Нами замечено, что накопление асфальтенов в нефтешламе прямо соотносится со скоростью деградации хлороформ-извлекаемых веществ.

Существует точка зрения, согласно которой асфальтены являются стабильными гумусоподобными соединениями, которые, в силу их химической инертности, безвредны для организмов разного таксономического уровня (Pineda-Flores et al., 2004). Их накопление в ходе нашего фиторемедиационного

эксперимента не сопровождалось увеличением токсичности по отношению к используемым тест-объектам.

Наибольшее возрастание *токсичности* по отношению к зоологическим объектам происходило в первый месяц лабораторного моделирования второго этапа обезвреживания нефтешлама (рис.4).

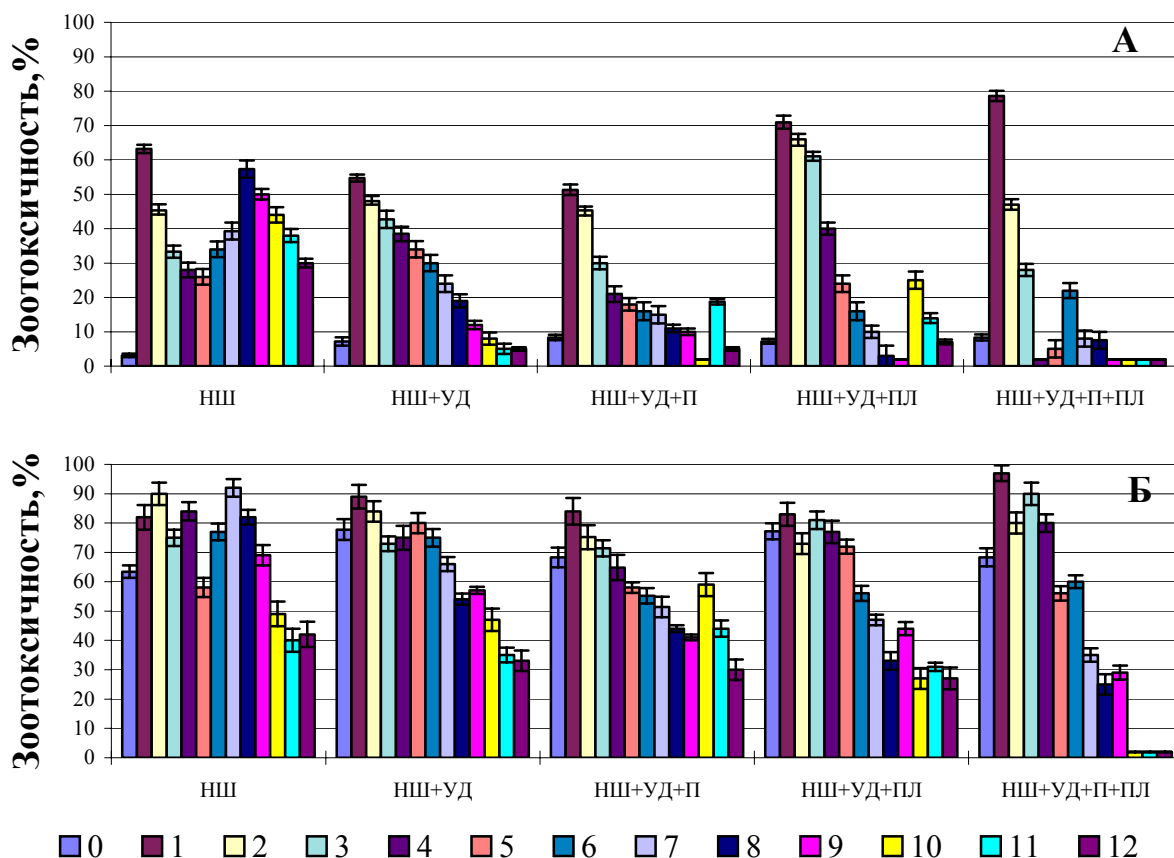


Рис.4. Динамика зоотоксичности в вариантах лабораторного моделирования: А – в тесте на инфузориях; Б – в тесте на цереодафниях.

Самыми чувствительными тест-объектами оказались цериодафнии, которые выявили большее количество подъемов токсичности, чем инфузории. К концу второго этапа фиторемедиации (через 10 месяцев) зоотоксичность на обоих тест-объектах снизилась до нуля и далее держалась на этом уровне. По литературным сведениям, возрастание токсичности в первые месяцы биоремедиации нефтезагрязненных почв было зафиксировано на люминесцентных бактериях (Marin et al.,2005) и растениях (Huang et al.,1996). Это связано с образованием более токсических метаболитов, например, таких как жирные кислоты, которые, по данным Стивенсона (Stevenson,1966), оказывают токсический эффект на растения. Масштабы снижения содержания

углеводородов в этот период не могут являться индикатором изменения токсичности в загрязненном объекте (Morelli et al., 2005).

Что касается **фитотоксичности** в тестах на прорастание семян пшеницы и гороха, то второй этап фиторемедиации нефтешлама обеспечил ее полную элиминацию (рис.5). В отношении пшеницы выявлена даже стимуляция роста (увеличение фитомассы до 50% по сравнению с контрольной почвой). Подобно этому, добавление в почву небольших концентраций малолетучих углеводородов, таких как тяжелые и средние фракции нефти, увеличивало рост растений до 70% (Salanitro et al., 1997; Mendosa et al., 1995).

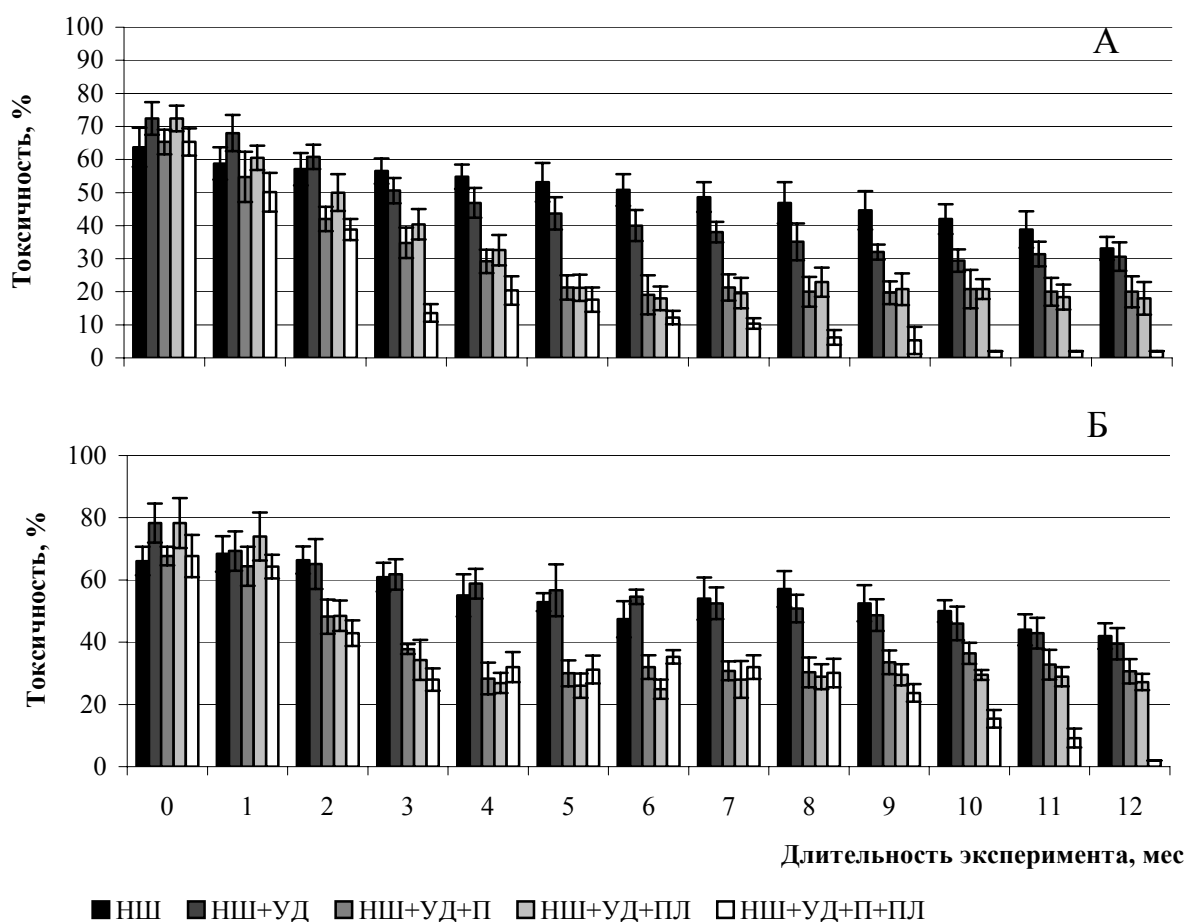


Рис. 5. Динамика фитотоксичности, в тесте на прорастание семян в ходе лабораторного моделирования второго этапа фиторемедиации нефтешлама: А – ингибирование прорастания семян пшеницы; Б – ингибирование прорастания семян гороха

Для изучаемого нефтешлама характерна высокая **численность** как аэробных гетеротрофов (10^7 - 10^{10} КОЕ/г), так и специфических деструкторов нефтешлама (10^6 - 10^9 КОЕ/г), с широкой субстратной специфичностью в отношении алифатических и ароматических углеводородов. Это подтверждает

целесообразность применения подхода, основанного на стимуляции аборигенной микрофлоры нефтешлама.

Изучение микробной сукцессии в процессе фиторемедиации нефтешлама выявило следующие закономерности. В течение первой (быстрой) стадии в первую очередь увеличивается численность микроорганизмов гетеротрофного блока (до 10^9 КОЕ/г), к которым принадлежат и деструкторы углеводородного загрязнения (до 10^7 КОЕ/г). Затем следует умеренное увеличение численности микромицетов и актиномицетов (до 10^5 и 10^6 КОЕ/г, соответственно). Увеличение содержания актиномицетов, многие из которых относятся к олиготрофам, является одним из показателей снижения концентрации доступных органических веществ (Мишустин, 1984), в нашем случае биоразлагаемых компонентов нефтешлама, что подтверждается химическими показателями.

Условия фиторемедиации вызывают существенные изменения в энергетическом метаболизме микробных клеток. Прямым свидетельством активизации микробного сообщества, наряду с увеличением численности гетеротрофов, служит стимуляция **дыхательной активности** нефтешлама (рис.7). Наивысший уровень дыхательной активности микроорганизмов нефтешлама наблюдался в присутствии растений (до $180 \text{ мгСО}_2/\text{кг}$) во время быстрой стадии биоремедиации. Снижение же уровня респирации служило сигналом необходимости повторного посева растений, что в дальнейшем нашло подтверждение в виде повышения активности микроорганизмов. В свою очередь, снижение дыхательной активности к концу эксперимента указывало на исчерпание доступной части органического загрязнения нефтешлама.

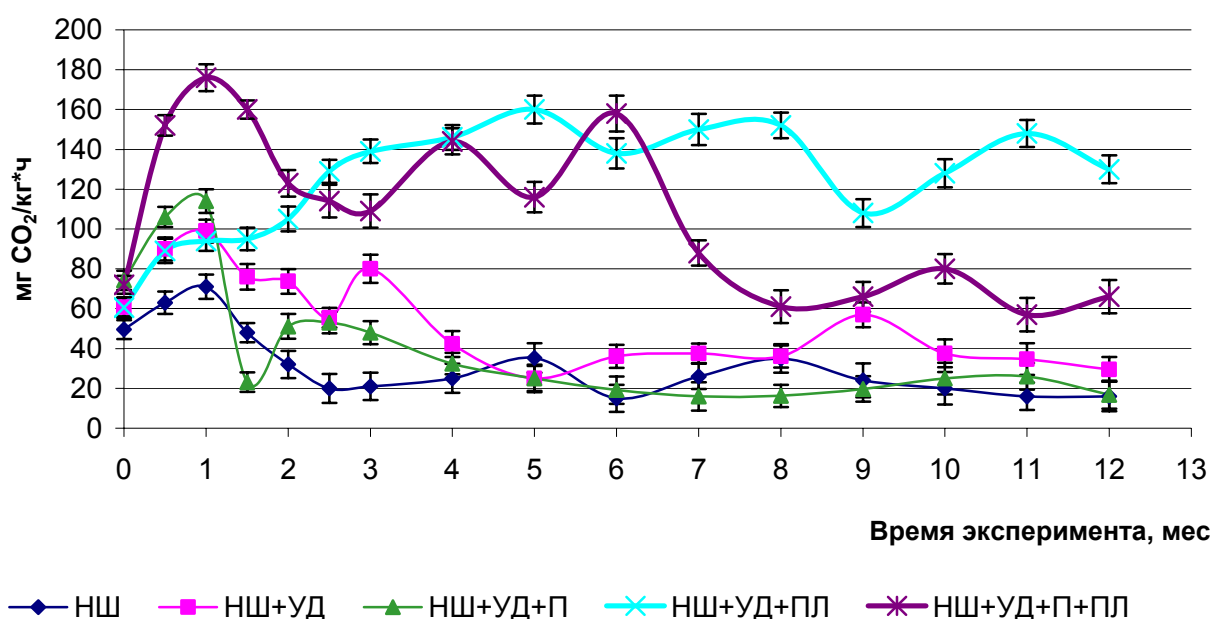


Рис. 8. Динамика респираторной активности в ходе лабораторного моделирования фиторемедиации нефтешлама

ВЫВОДЫ

1. Фиторемедиация сырого нефтешлама невозможна в связи с высоким уровнем его фитотоксичности и углеводородного загрязнения, а также неблагоприятной физической структурой;
2. Детоксикация сырого нефтешлама и изменение его физической структуры и степени загрязненности до уровня, совместимого с ростом растений, достигнуты путем предварительной обработки сырого нефтешлама с использованием метаболического потенциала микроорганизмов, растительной морт-массы и погодно-климатических факторов;
3. Скрининг растений, принадлежащих к семействам злаковых, бобовых и крестоцветных, на предобработанном нефтешламе (с уровнем углеводородного загрязнения 180 г/кг) выявил наиболее токсикотолерантное растение-фитомелиорант - плевел;
4. Краткосрочное экспресс-тестирование потенциала фиторемедиации нефтешлама позволило охарактеризовать возможности растения-фитомелиоранта (плевела) и обосновать схему последующего моделирования фиторемедиации в лабораторных условиях;
5. По результатам годичного лабораторного моделирования фиторемедиации предобработанного нефтешлама разработана схема управления этим процессом:
 - путем стимуляции минеральным азотом с учетом различных потребностей микроорганизмов и растений;
 - комбинацией нефтешлама с почвой;
 - активизацией газо- и водообмена с использованием растительной морт-массы.
6. Разработанная технологическая схема фиторемедиации нефтешлама, включающая первый этап с применением растительной морт-массы и последующее использование объединенного метаболического потенциала микроорганизмов и растений, позволяет за 2 года снизить уровень суммарного углеводородного загрязнения на 90%, токсичность по отношению к организмам разного трофического уровня на 100%.

Работы, опубликованные по теме диссертации

1. Никитина Е.В. Особенности распределения и физиологического состояния микроорганизмов нефтешлама – отхода нефтехимического производства / Е.В. Никитина, О.И. Якушева, С.А. Зарипов, **Р.А. Галиев**, А.В. Гарусов, Р.П. Наумова // Микробиология, 2003. Т.72. №5. С.699-706.
2. **Galiev R.A.** Ecologically hazardous petrochemical sludges as a nutrient source for microorganisms / R.A. Galiev, A.M. Ziganshin, O.I. Yakusheva, E.V. Nikitina, S.A. Zaripov, A.V. Naumov // Environ. Radioecol. Appl. Ecol. 2003. V.9. №4. P. 18-28.
3. **Galiev R.A.** Ecologically hazardous petrochemical sludges as a nutrient source for microorganisms / R.A. Galiev, A.M. Ziganshin, R.P. Naumova // Thes. Intern.Conf. «Issues and Solutions in Discovery and Use of Novel Biomolecules: Biodiversity and Environment». - Puschino, 2004. - P.207.
4. **Галиев Р.А.** Твердые отходы предприятий «Нижнекамскнефтехим» и «Казаньоргсинтез» как источник органического питания для микроорганизмов / Р.А. Галиев, А.М. Зиганшин, Е.В. Гицарева, А.З. Асадуллин // Тезисы конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии». – Казань, 2004. С.98.
5. **Галиев Р.А.** Экологически опасные твердые отходы в питании микроорганизмов / Р.А. Галиев, А.М., Зиганшин, Р.П. Наумова. // Тезисы 8-й международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». - Пущино, 2004. - С.256.
6. **Галиев Р.А.** Биотехнологическое обезвреживание опасных твердых отходов нефтехимии / Р.А. Галиев, Т.В. Григорьева, Р.П. Наумова // Сборник материалов «Всероссийская выставка научно-технического творчества молодежи». - Москва, 2005. - С.204-205.
7. Пат. РФ, МПК⁷ C02F 11/16. Способ переработки шламов очистных сооружений нефтехимических и нефтеперерабатывающих производств / О.И. Якушева, Р.П. Наумова, А.А. Самольянов, В.П. Кичигин, И.И. Аскарлов, В.А. Галухин, В.Н. Никонорова, **Р.А. Галиев**; заявка на изобретение 2006115820/15; заявл. 30.11.05. Приоритет от 06.05.2006.
8. Григорьева Т.В. Оценка потенциала биоремедиации твердых отходов нефтехимии / Т.В. Григорьева, **Р.А. Галиев**, А.А. Несмелов, Р.З. Юсупов, О.И. Якушева, Р.П. Наумова // В сб. «Экотоксикология: современные биоаналитические системы, методы и технологии». – Пущино, 2006. – С.90.
9. **Galiev R.A.** The combined chemical solid wastes: characteristic in view of bioremediation / R.A. Galiev, E.V. Gitsareva, N.S. Gainullin, A.F. Potashkin, V.V. Kirsanov, R.P. Naumova // Proceedings of IWA Specialized Conference «Sustainable sludge management: state of the art, challenges and perspectives». - Moscow, 2006. - P. 110-114.
10. Grigoryeva T.V. Bioremediation of oily sludge by vermicomposting / T.V. Grigoryeva, **R.A. Galiev**, O.I. Yakusheva, G.A. Sitdikova, R.A. Shurkhno, E.Z.

Kharisova, R.P. Naumova / Proceedings of IWA Specialized Conference – Sustainable sludge management: state of the art, challenges and perspectives. - Moscow, 2006. - P. 220-224.

11. Якушева О.И. Новый подход к обезвреживанию нефтешлама с целью последующей фиторемедиации / О.И. Якушева, Т.В. Григорьева, **Р.А. Галиев**, А.А. Несмелов, Р.З. Юсупов, Р.П. Наумова ; Казанск. гос. ун-т. – Казань, 2006. – 16 с. - Деп. ВИНТИ, 11.01.07, № 17 – В2007.