

*На правах рукописи*

ШАМАЕВА АЛИЯ АЗАТОВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ БИОРЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ И  
ОБЪЕКТОВ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЯНЫМИ УГЛЕВОДОРОДАМИ**

03.00.16 - Экология

03.00.23 - Биотехнология

**АВТОРЕФЕРАТ**

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

Уфа - 2007



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Нефтяные углеводороды являются одними из наиболее экологически опасных веществ, загрязняющих природную среду. Загрязнение нефтью и нефтепродуктами вызывает значительные, преимущественно неблагоприятные, и трудно обратимые изменения в почвенных экосистемах. В Башкортостане, республике нефтедобычи и нефтепереработки, эта проблема является наиболее актуальной.

Физические, термические и химические методы разрушения нефтяных углеводородов, несмотря на то, что способствуют интенсификации их разложения, не обеспечивают полное удаление из почвенного слоя и могут являться дополнительным источником поступления загрязняющих веществ в окружающую среду (Купцов и др., 1983; Vaccraff, 1992; Роев, 1998; Menzie et al., 1992; Федоров, 1993; Абросимов, 2002).

Технологии мобилизации природных резервов почвенных экосистем, направленные на разложение нефти и нефтепродуктов, рассматриваются в настоящее время как наиболее перспективные и эффективные способы очистки. Один из наиболее распространенных способов рекультивации – очистка почв и грунтов путем внесения специальных культур микроорганизмов. Однако многоступенчатость биохимических процессов разложения углеводородов разными группами микроорганизмов, осложняющаяся разнообразием химического состава нефти и нефтепродуктов, обуславливает сложность регуляции устойчивого процесса их разложения.

Концепция фиторемедиации привлекает большое внимание и является предметом многих публикаций (Wein, Bliss, 1978; Meagher, 1995; Leyval, Binet, 1998; Brizili et al., 2000; Kramer, Chardonnnes, 2000; Pillon-Smits et al., 2005; Турковская, Муратова, 2005; Якушева, 2006). Растения ускоряют процессы очистки почвы и позволяют обеспечить стабильность процесса биологического распада при относительно невысокой стоимости затрат. Фиторемедиация не требует снятия плодородного слоя почвы, может применяться на больших площадях и способствует сохранению и улучшению окружающей среды, поскольку связана с обогащением почвы и повышением ее плодородия. Корневая система растений способствует усилению газообмена глубинных слоев почвы и воды, развитию нефтеокисляющей микробиоты в естественной среде, подвергшейся нефтяному загрязнению, которая в обычных условиях характеризуется низкой температурой, недостатком биогенных элементов, недостатком кислорода, избыточной кислотностью.

Таким образом, исследование биологических процессов в нефтезагрязненных почвах и возможностей применения растений для рекультивации нарушенных почв в качестве активного мелиоративного фактора является одной из актуальных задач современной прикладной экологии и биотехнологии.

**Целью диссертационной работы** явилась оценка эффективности использования биопрепарата Бациспектин, органо-минерального удобрения Бионекс-Плюс, фитомелиорантов и растительных масс для биоремедиации почв и других объектов, загрязненных нефтяными углеводородами.

В соответствии с поставленной целью решались следующие **задачи**:

1. Исследовать эффективность способов стимуляции самоочищения нефтезагрязненных почв: фитомелиорации, внесения биопрепарата Бациспектин, удобрения Бионекс-Плюс и растительных масс.

2. Провести сравнительный анализ эффективности выращивания фитомелиорантов и внесения удобрения Бионекс-Плюс с целью рекультивации почв, загрязненных продуктами первичной переработки нефти.

3. Исследовать возможность применения опада и коры сосны обыкновенной для детоксикации грунтовых нефтешламов.

4. Оценить влияние продуктов сгорания попутного нефтяного газа на численность углеводородокисляющих микроорганизмов, активность ферментов, токсичность почвы и исследовать возможность использования костреца безостого для ускорения ее самоочищения.

**Научная новизна.** Впервые показано, что органо-минеральное удобрение Бионекс-Плюс ускоряет разложение нефтяных углеводородов. Впервые в условиях Башкортостана показана возможность фиторекультивации почв, загрязненных продуктами первичной переработки нефти и продуктами сгорания попутного нефтяного газа. Впервые в регионе показана возможность применения для ремедиации нефтезагрязненных почв и грунтовых нефтешламов коры и опада сосны. Проведено сравнение эффективности использования фитомелиорантов относительно других способов рекультивации (внесение биопрепарата Бациспектин и применение органо-минерального удобрения Бионекс-Плюс).

**Основные положения диссертации, выносимые на защиту:**

1. Загрязнение почв нефтяными углеводородами вызывает рост численности углеводородокисляющих микроорганизмов, повышает активность каталазы и липазы, увеличивает фито- и зоотоксичность. Токсическое

воздействие нефтяных углеводородов на почвы находится в прямой зависимости от концентрации загрязнителя, вида поллютанта, времени его нахождения в почве и способности последней к самоочищению.

2. Фиторекультивация способствует очищению почв, загрязненных нефтью, продуктами первичной переработки нефти, продуктами сгорания попутного нефтяного газа и нефтешламов. Динамика снижения содержания остаточных углеводородов и токсичности в почвах интенсивнее при применении фитомелиорантов, чем при других способах рекультивации.

**Практическая значимость.** Результаты исследований позволяют выработать рекомендации по выбору рекультивирующих агентов для восстановления почв и объектов, загрязненных различными видами нефтяных углеводородов. Дополнения, внесенные в методику определения липазы, дают возможность более объективно оценить уровень активности этого фермента, что позволяет с большей достоверностью проводить оценку биологической активности загрязненных почв. Предложена модификация методики оценки углеводородокисляющей активности микроорганизмов, что позволяет увеличить эффективность мониторинга микробиологического состояния нефтезагрязненной среды на 30%. Результаты исследований были применены в качестве рекомендаций при разработке технологии рекультивации углеводородсодержащих объектов на территории ООО "ХТЦ УАИ".

**Личное участие автора.** Автор провела аналитический обзор литературы, получила большинство экспериментальных данных и выполнила их математическую обработку, участвовала в написании статей и тезисов докладов.

**Обоснованность выводов и достоверность результатов работы** обеспечены большим объемом лабораторных и полевых экспериментов с применением современных математических методов обработки, анализа и оценки полученных результатов.

**Апробация работы.** Основные положения и результаты диссертационной работы были представлены на *Международных конференциях* «Почва как связующее звено функционирования природных и антропогенно-преобразованных экосистем» (Иркутск, 2001), на 6-ой Пушкинской конференции молодых ученых (Пушино, 2002), Стратегия природопользования биоразнообразия в XXI веке (Оренбург, 2004), на *Всероссийских конференциях и съездах* «Ботанические исследования в Азиатской России» (Новосибирск, 2003), «Актуальные экологические проблемы Республики Татарстан» (Казань,

2003, 2004), «VII Докучаевские молодежные чтения» (Санкт-Петербург, 2004), на IV съезде Докучаевского общества почвоведов (Новосибирск, 2004), «Ломоносов-2004» (Москва, 2004), «Актуальные проблемы экологии и охраны окружающей среды» (Уфа, 2004), «Университетская наука – Республике Башкортостан» (Уфа, 2004), на II съезде общества биотехнологов России (Москва, 2004), «Актуальные проблемы регионального экологического мониторинга» (Киров, 2004), «Экологическое разнообразие почвенной биоты и биопродуктивность почв» (Тюмень, 2005), «Популяции в пространстве и времени» (Н.Новгород, 2005).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 19 научных работ, в том числе 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, шести глав, заключения, выводов, списка литературы, включающего 320 источников, в том числе 83 на иностранных языках, и приложений. Работа содержит 162 страницы основного текста, иллюстрирована 43 рисунками и включает 27 таблиц.

**Благодарности.** Автор выражает искреннюю благодарность и признательность за неоценимую помощь и поддержку научным руководителям д.б.н., проф. Киреевой Н.А. и д.б.н. Хазиахметову Р.М., к.б.н. Бакаевой М.Д. за активное участие в обсуждении результатов, а также всем коллегам и соавторам публикаций.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Глава 1. Воздействие нефти и нефтепродуктов на почвенные экосистемы и вопросы их биоремедиации (аналитический обзор)**

Дана общая характеристика нефтяных углеводородов как одних из наиболее экологически опасных загрязнителей природной среды. Рассмотрены вопросы влияния нефти и нефтепродуктов на компоненты почвенных экосистем и сопряженные с этим проблемы рекультивации.

### **Глава 2. Объекты и методы исследований**

В лабораторных и полевых условиях в течение 2000-2006 гг. изучались процессы биоремедиации различных типов почв (серых лесных, дерново-подзолистых, черноземов), загрязненных нефтяными углеводородами (нефтью, продуктами первичной переработки нефти: бензиновая фракция, вакуумный газойль, вакуумный остаток, продуктами неполного сгорания попутного

нефтяного газа в факельной системе) и нефтесодержащих объектов (грунтовых нефтешламов).

В процессах биоремедиации загрязненных почв и объектов были использованы: биопрепарат Бациспектин, полученный на основе штамма бактерий *Bacillus sp. 739*, (Патент РФ №1743019), органоминеральное удобрение Бионекс-Плюс (содержит азот, фосфор, калий, гумат) и предназначен для регенерации плодородия земель, загрязненных продуктами техногенного происхождения, улучшения структуры почвы (ТУ 2387-010-20672718-01), люцерна посевная *Medicago sativa L.*, костреч безостый *Bromopsis inermis Leys.*, кора и опад хвои сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*).

Критериями суждения о биологической активности почвы и ее способности к самоочищению служили следующие параметры: численность углеводородокисляющих микроорганизмов, ферментативная активность, фитотоксичность, зоотоксичность. Активность триацилглицерол-липазы определялась по модифицированному нами методу К.А. Козлова с соавт. (1968). Каталазная активность определялась газометрическим методом (Хазиев, 2005). Оценку степени фитотоксичности остаточных нефтепродуктов биотестами с помощью проростков редиса (*Raphanus sativus*), сорт Красный с белым кончиком, проводили по Гродзинскому (1991). Степень зоотоксичности остаточных нефтепродуктов на разных стадиях биоремедиации оценивали биотестом с помощью коллембол *Folsomia candida* (Ханисламова, 1995).

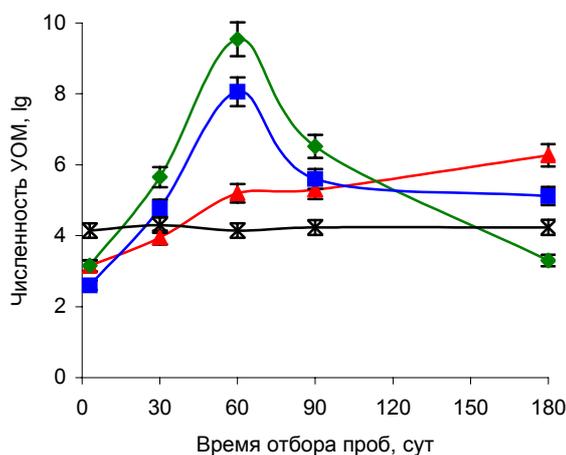
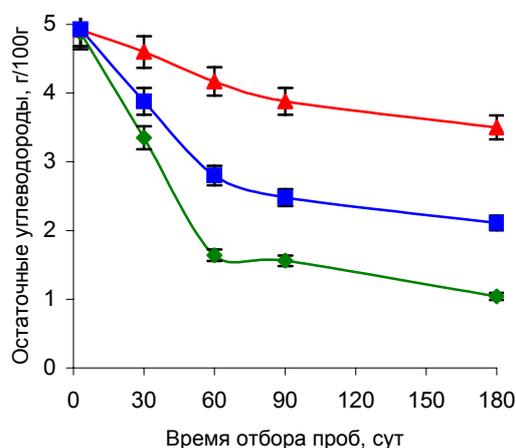
Определение численности углеводородокисляющих микроорганизмов и видового состава грибов и бактерий, в том числе образцов ризосферы растений проводили в соответствии с общепринятыми методами (Методы почвенной ..., 1991). Для учета численности УОМ и оценки углеводородокисляющей активности микроорганизмов использовали модифицированный нами метод "нитроцеллюлозных фильтров", предложенный С.Б. Петрикевичем с соавт. (2003).

Определение содержания остаточных нефтепродуктов в почве проводили горячей экстракцией хлористым метиленом (McGill, Rowell, 1980).

Статистическая обработка результатов производилась на ЭВМ с применением программ Statistica V 6.0., Microsoft Excel-2000. При оценке статистической достоверности средних полученных данных использовали t - критерий Стьюдента на 5% уровне значимости.

### Глава 3. Изучение возможности использования различных методов для рекультивации почв, загрязненных нефтью

Использование для рекультивации нефтезагрязненной почвы (НЗП) как биопрепарата Бациспектин, так и комплексного удобрения Бионекс-Плюс, способствовало разложению углеводородов. Наиболее интенсивно процесс убыли нефтяных углеводородов протекал в первые два месяца после постановки эксперимента (рис. 1) и совпадал с высокой численностью углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ) (рис. 2). В последующие месяцы процесс очистки замедлялся. Это обусловлено, вероятно, как уменьшением в составе остаточного загрязнения парафиновых фракций, доступных для усваивающих углеводороды микроорганизмов, так и истощением минеральных ресурсов почвы или обеднением видового разнообразия экосистемы.



—▲— НЗП —◆— НЗП+Бациспектин —■— НЗП+Бионекс —×— контроль

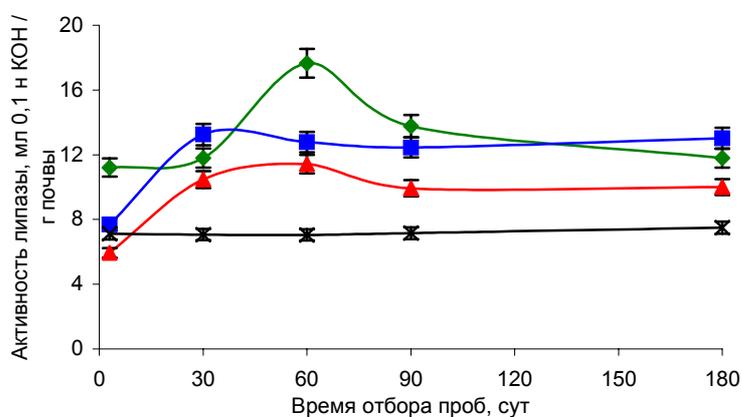
Рис. 1. Содержание остаточной нефти в серой лесной почве в лабораторных условиях, г / 100 г почвы

Рис. 2. Динамика численности УОМ в серой лесной почве, загрязненной нефтью (5%) в лабораторном эксперименте, lg числа жизнеспособных клеток

Несмотря на стимуляцию естественной нефтеокисляющей микробиоты в результате применения удобрения Бионекс-Плюс, интродукция в загрязненную нефтью активных УОМ биопрепарата была более эффективной, о чем свидетельствуют данные по биодegradации углеводородов. В варианте опыта с внесением Бациспектина за шесть месяцев произошло удаление из субстрата при первоначальных концентрациях нефти до 5% около 80% углеводородов, при загрязнении 10 и 15% - от 60 до 50%. Снижение содержания остаточных нефтепродуктов при рекультивации с применением Бионекса шло менее интенсивно и составило при начальном содержании нефти 5% - 55%, при 10 и

15% - 40% от начальной концентрации. В загрязненной почве без внесения рекультивирующих факторов содержание остаточной нефти в почве составило 70 – 80% от исходных значений.

Внесение Бациспецина и Бионекса в нефтезагрязненную почву способствовало интенсификации липолитической активности (рис. 3), которая в связи со сходством ферментных систем биodeградации липидов и нефти (Margesin et al., 1999), была использована в качестве показателя степени загрязнения и активности процессов восстановления. В целом, уровень активность почвенной липазы при внесении Бионекса был значительно ниже, чем при использовании Бациспецина.

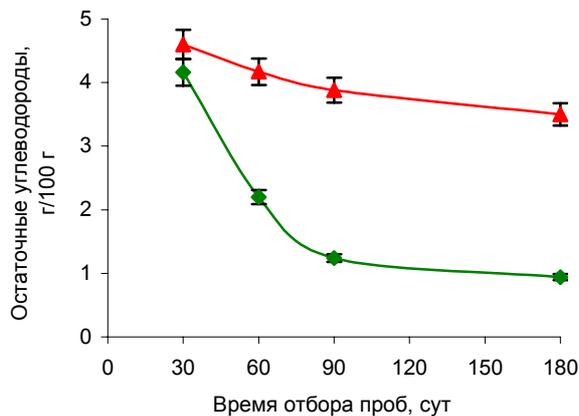


▲ НЗП ◆ НЗП+Бациспецин ■ НЗП+Бионекс ✕ контроль  
 Рис. 3 Активность липазы в серой лесной почве, загрязненной нефтью (5%), мл 0,1 н КОН на 1 г почвы

Нефть в исследованных концентрациях оказывала сильное угнетающее действие на выживаемость тестерных видов коллембол. На третий день после загрязнения почвы нефтью в дозе 1% выжила лишь третья часть особей. При увеличении дозы нефти (от 5% и выше) погибало 100% особей. Рекультивация внесением биопрепарата позволила увеличить в два раза, как выживаемость, так и продолжительность жизни коллембол. Особенно наглядно это проявилось при концентрациях загрязнителя до 5% включительно, где удалось почти полностью нейтрализовать токсичность загрязненной почвы для ногохвосток. При загрязнении почв высокими концентрациями нефти (10 и 15%) рекультивирующий эффект Бациспецина не сказывался на выживаемости коллембол. Частичное восстановление этого показателя наблюдалось лишь к окончанию срока инкубации. Внесение Бионекса в меньшей степени, чем биопрепарата способствовало снижению зоотоксичности почвы, загрязненной нефтью.

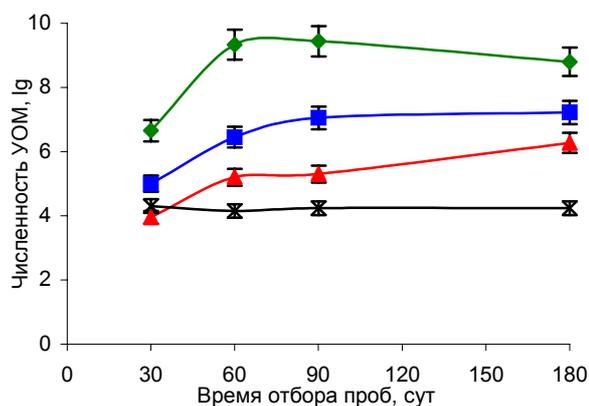
Аналогичные закономерности выявлены в полевых условиях.

**Посев фитомелиорантов**, особенно люцерны, на нефтезагрязненной почве, также как и внесение биопрепарата и удобрения, способствовал ускорению процессов деструкции углеводов (рис. 4) за счет создания оптимальных условий для развития УОМ. Максимальная численность УОМ отмечена в ризосфере, что свидетельствует об интенсификации растениями протекания микробиологических процессов (рис. 5).



▲ НЗП    ◆ НЗП+Люцерна

Рис.4. Содержание остаточной нефти в серой лесной почве в лабораторных условиях под посевами люцерны, г / 100 г почвы



▲ НЗП  
◆ НЗП+люцерна (ризосфера)  
■ НЗП+люцерна (эдафосфера)  
× контроль

Рис. 5. Динамика численности УОМ в серой лесной почве, загрязненной нефтью (5%) под посевами люцерны, lg числа жизнеспособных клеток

Анализ динамики численности УОМ при рекультивации с внесением Бациспектина и Бионекса, а также в случае использования фитомелиорантов показал, что в почвах под растениями отмечена стабилизация численности УОМ на более высоком уровне на протяжении всего эксперимента.

Выращивание фитомелиорантов стимулировало липолитическую активность загрязненной нефтью почвы. По сравнению с вариантами опыта, где были использованы Бациспектин, и Бионекс динамика изменения активности липазы в почве под растениями имела более сглаженный характер.

Активность каталазы, участвующей в окислительно-восстановительных процессах в почве, под посевами растений также значительно выше, чем в нерекультивируемых (табл. 1), что может быть связано не только с изменением общей биологической активности почв в результате нефтяного загрязнения (Алиев, Гаджиев, 1977), но и с появлением субстратов в результате разложения углеводов (Михайловская, 1978).

Таблица 1

Относительная активность каталазы в серой лесной почве, загрязненной различными концентрациями нефти

Время взятия проб, сутки	Концентрации нефти, %			
	0	1	5	10
Нефтезагрязненная почва				
30	3,696±0,013	1,314± 0,012	0,640±0,001	0,497±0,001
60	3,111±0,005	2,666±0,003	4,500±0,019	2,033±0,002
90	3,911±0,007	0,803± 0,002	0,590±0,002	0,704±0,001
180	3,619±0,007	0,565± 0,001	0,285±0,001	0,309±0,001
Нефтезагрязненная почва под посевами люцерны				
30	5,000±0,015	3,128±0,002	1,766±0,006	2,470±0,001
60	4,757±0,010	8,500±0,019	5,730±0,010	2,543±0,007
90	4,712±0,013	7,866±0,020	7,150±0,010	2,992±0,017
180	4,955±0,004	3,911±0,007	3,619±0,007	2,564±0,010

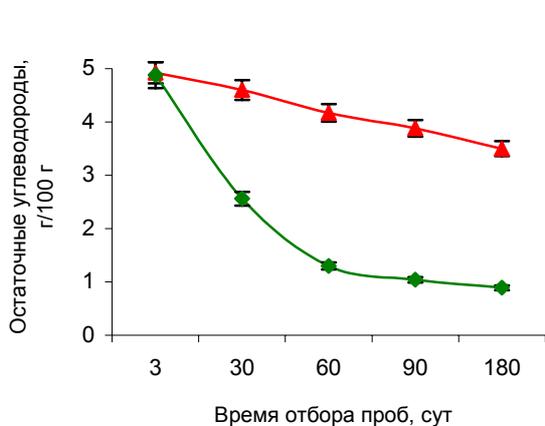
Использование фитомелиорантов в качестве рекультивирующего фактора способствовало снижению зоотоксичности. Так, уже через месяц после постановки опыта в нефтезагрязненной почве увеличилась выживаемость ногохвосток и продолжительность их жизни на 5% при высоких концентрациях и на 20% при средних в сравнении с нерекультивируемыми образцами. В дальнейшем, с увеличением продолжительности фиторекультивации, токсичность загрязненных почв для коллембол падала.

В целом, анализируя содержание остаточных углеводов в почвах, показатели активности ферментов и токсичности, можно сделать вывод о большей эффективности применения в качестве фитомелиоранта люцерны в сравнении с кострцом.

Полученные в лабораторных экспериментах результаты нашли свое подтверждение в условиях полевых опытов.

Внесение **опада хвои сосны обыкновенной** в загрязненную нефтью почву в лабораторных условиях способствовало снижению содержания углеводов (рис. 6), прежде всего, за счет увеличения численности УОМ (рис. 7). Высокая численность УОМ сохранялась, начиная с 30 суток и на протяжении последующих трех месяцев. К окончанию эксперимента

численность УОМ снизилась, вероятно, в связи с уменьшением доступного субстрата.



▲ НЗП ◆ НЗП+Сосновый опад × контроль

Рис.6. Содержание остаточной нефти в серой лесной почве в лабораторных условиях при внесении опада хвои сосны, г / 100 г почвы

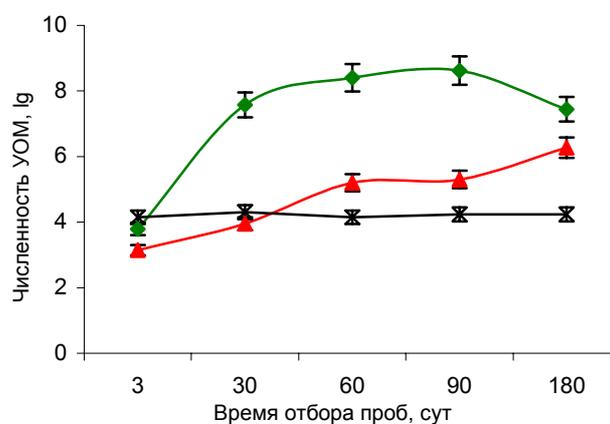
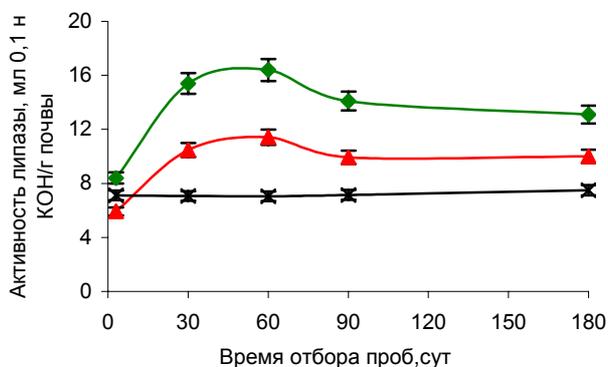


Рис. 7. Динамика численности УОМ в серой лесной почве, загрязненной нефтью (5%) при внесении опада хвои сосны, lg числа жизнеспособных клеток

Внесение опада способствовало интенсификации процессов липолиза в почве, загрязненной нефтью в концентрациях до 5% масс. включительно (рис. 8). Нефтяное загрязнение в концентрации 10 и 15 % первоначально оказывало ингибирующее воздействие на активность фермента. Через год во всех образцах было отмечено повышение активности липазы в сравнении с началом эксперимента



▲ НЗП ◆ НЗП+Сосновый опад × контроль

Рис. 8 Активность липазы в серой лесной почве, загрязненной нефтью (5%) с внесением соснового опада, мл 0,1 н КОН на 1 г почвы

Внесение соснового опада в почву, загрязненную нефтью, снижало ее зоотоксичность.

Таким образом, использование соснового опада в качестве рекультивирующего агента более эффективно при начальных концентрациях поллютанта 1 – 5% и может быть рекомендовано для применения в качестве начального этапа для детоксикации почв, загрязненных нефтью в концентрации 10%.

В целом можно отметить, что в рекультивируемых серых лесных почвах за весь период проведения экспериментов наблюдались более высокие значения активности почвенной липазы и каталазы, численности УОМ и зоотоксичности. Использование биопрепарата Бациспецин, органоминерального удобрения Бионекс-Плюс, люцерны, костреца и соснового опада наиболее эффективно на почвах, загрязненных нефтью в концентрациях до 5% масс. включительно. Применение люцерны, в сравнении с другими способами рекультивации способствовало поддержанию в исследуемых образцах более высокой численности УОМ и повышенной активности каталазы и липазы. Эффективность применения бобовых растений, вероятно, обусловлена тем, что биологический азот, фиксируемый ризосферными микроорганизмами из атмосферы, оказывает значительное влияние на скорость процессов микробиологической деструкции нефтепродуктов в почве.

#### **Глава 4. Биологическая активность почв, загрязненных продуктами вакуумной перегонки нефти и способы их рекультивации**

Реакция почвенной микробиоты на внесение нефтяных углеводородов, отличающихся по молекулярному весу, была различна. Токсичность продуктов вакуумной перегонки нефти возрастала в следующем ряду: вакуумный остаток (ВО) → вакуумный газойль (ВГ) → бензиновая фракция (БФ).

Внесение в загрязненную нефтяными фракциями почву удобрения Бионекс-Плюс, несколько изменило характер динамики численности УОМ. Не было отмечено выраженного токсического действия углеводородов, характеризующегося угнетением численности УОМ. При фитомелиорации наблюдалось значительное увеличение численности УОМ в сравнении с нереккультивируемыми образцами почв, особенно в ризосферной зоне (рис.9).

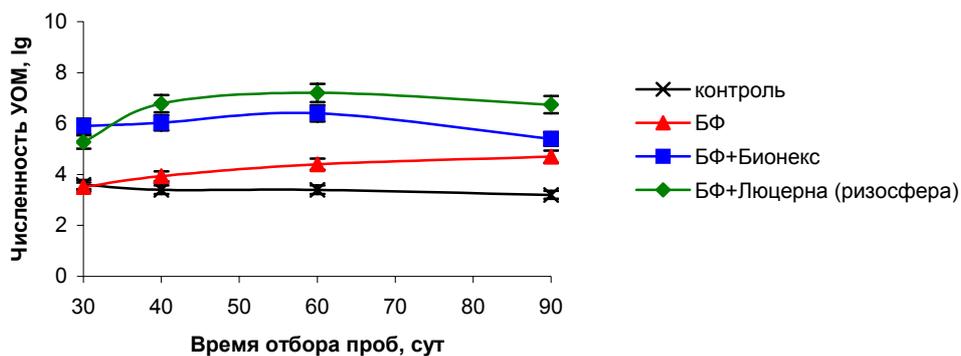
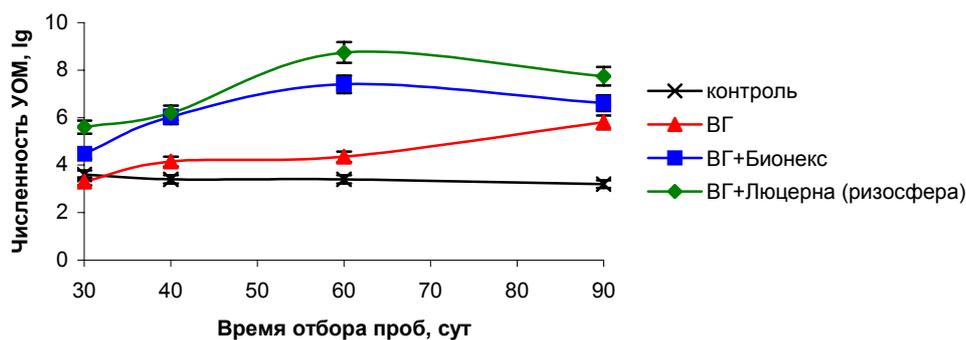
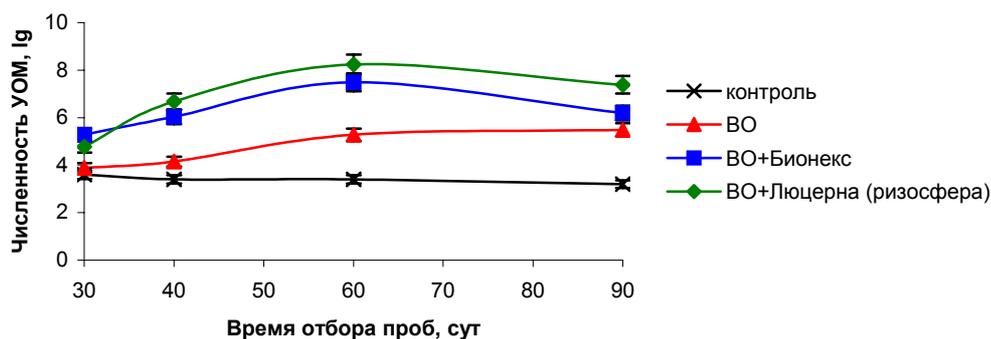
**A****Б****В**

Рис. 9. Динамика численности УОМ в почвах, загрязненных продуктами первичной переработки нефти (5%), lg числа жизнеспособных клеток

Отмечено, что выращивание люцерны в сравнении с коострецом в большей степени стимулировал развитие в загрязненной почве углеводородокисляющей микрофлоры.

Использование для восстановления почвы комплексного удобрения Бионекс-Плюс и посев фитомелиорантов способствовали более интенсивному разложению нефтяных углеводов в почве. Так, при внесении удобрения за три месяца подверглось деградации около 40 и 50% при начальном загрязнении 1 и 5% соответственно. При фитомелиорации произошла деградация около 60% углеводов при начальной концентрации загрязнителя в почве 5%.

Загрязнение почв продуктами первичной переработки нефти первоначально вызвало значительное ингибирование активности липазы. Наибольшим ингибирующим воздействием на активность липазы обладала бензиновая фракция, наименьшим – вакуумный остаток. Липолитическая активность в загрязненных почвах с внесением удобрения и под посевами трав, была выше на 30%, чем в нерекультивируемых.

Фитотоксичность почвы, загрязненной продуктами первичной переработки нефти, по отношению к семенам редиса была пропорциональна концентрации поллютанта и снижалась со временем. Использование фитомелиорантов приводило к снижению токсического воздействия продуктов первичной переработки нефти на почвы. При внесении Бионекса снижения фитотоксичности почвы не происходило. В почвах, загрязненных вакуумным остатком и вакуумным газойлем в концентрации 5% к окончанию эксперимента было отмечено увеличение этого показателя.

## **Глава 5. Изучение биологической активности грунтовых нефтешламов и возможности их биоремедиации**

В лабораторных и полевых условиях изучали возможности ускорения биологической утилизации четырех образцов грунтовых нефтешламов с использованием растительных масс – коры и опада хвои сосны обыкновенной. Исходная концентрация нефти составляла в нефтешламе I – 12,72%, II – 9,68%, III – 15,91%, IV – 20,44%.

В лабораторных условиях через шесть месяцев содержание остаточных углеводов в нефтешламах I и II составило 60 – 65% от исходного количества при добавлении сосновой коры и 50-55% в образцах с добавлением соснового опада. При содержании нефтяных углеводов в пределах 15% масс. на начало эксперимента, в результате биоремедиации произошла деструкция 30% углеводов. В IV нефтешламе произошло незначительное снижение содержания углеводов. Вероятно, в разложении углеводов принимают участие не только аборигенная микробиота нефтешлама, активизированная нами, но и микроорганизмы, входящие в состав этих рекультивирующих факторов.

Внесение добавок уже через месяц после начала эксперимента способствовало увеличению численности УОМ (рис. 10). Углеводородокисляющие грибы, были представлены видами *Fusarium sp.*,

*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, углеводородокисляющие бактерии относились к родам *Pseudomonas*, *Rhodococcus*.

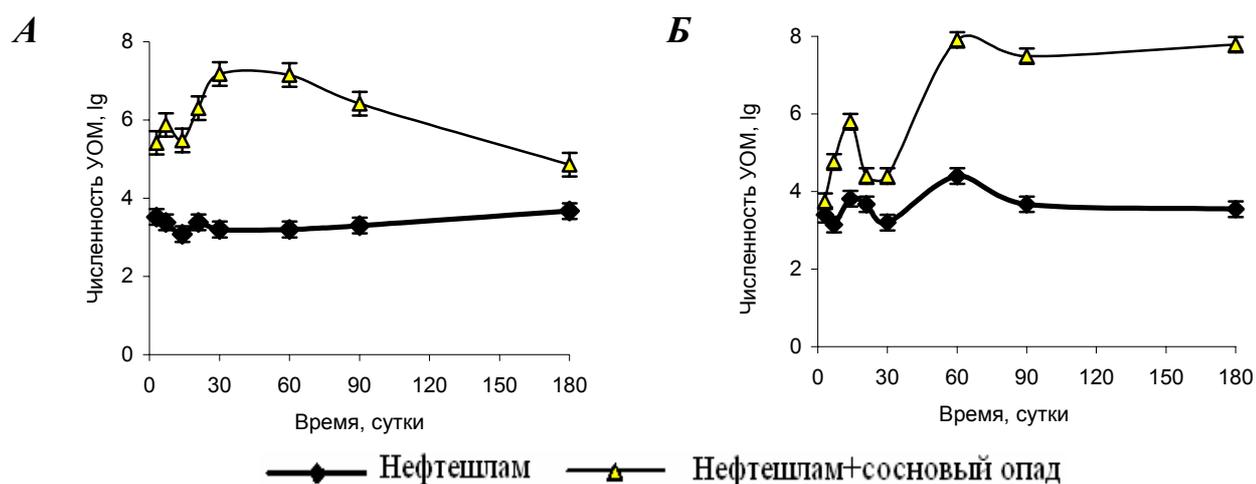


Рис. 10. Динамика численности углеводородокисляющих микроорганизмов в нефтьшламе II с внесением соснового опада в лабораторных условиях (А) и в условиях полевого эксперимента (Б), lg числа жизнеспособных клеток

В образцах нефтьшлямов, обработанных корой и опадом хвои сосны отмечено повышение активности липазы по сравнению с фоновыми (рис. 11).

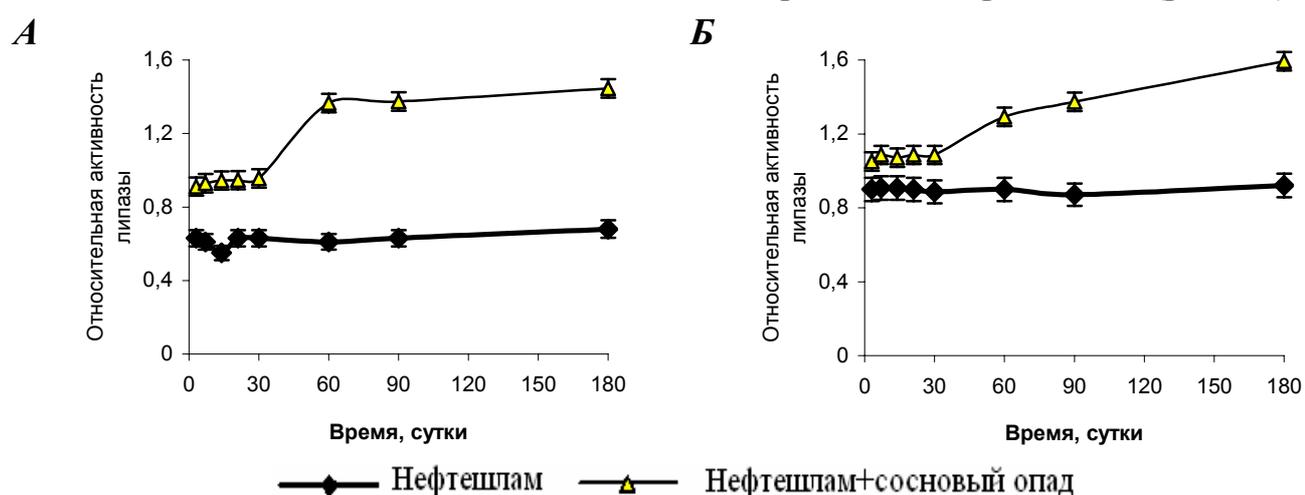


Рис. 11. Относительная активность липазы в нефтьшламе II с внесением соснового опада в лабораторных условиях (А) и в условиях полевого эксперимента (Б), мл 0,1 н КОН на 1 г почвы

Можно сказать, что при внесении опада происходит наиболее существенная интенсификация активности липазы в сравнении с образцами с внесением сосновой коры, что, по-видимому, связано с тем, что микроорганизмы опада изначально обладают более мощным липолитическим ферментным комплексом.

Анализируемые нефтьшлямы обладали высокой токсичностью по отношению к ногохвосткам. Выживаемость коллембол в необработанных образцах не превышала 25%. Внесение растительных масс способствовало

значительному (до 53,4%) снижению их смертности и увеличению продолжительности жизни (в 2-3).

Фитотоксичность контрольных образцов на протяжении всего эксперимента оставалась высокой и составила до 100% в нефтешламе IV. После проведенных мероприятий токсическое воздействие нефтешламов на всхожесть семян редиса снизилось, что свидетельствует о деструкции токсичных компонентов. Всхожесть семян в образцах I и II увеличилась с 20% до 70%. Наименьшей фитотоксичностью обладали образцы с внесением соснового опада.

Таким образом, примененный способ детоксикации грунтовых нефтешламов с применением коры и опада сосны является перспективным для использования в качестве первоначального этапа ремедиации. Дальнейшую очистку, обработанного сосновой корой или опадом, нефтешлама предполагается проводить с использованием фитомелиорантов.

## **Глава 6. Изучение возможности фиторекультивации выщелоченного чернозема, загрязненного продуктами сгорания попутного нефтяного газа**

Загрязнение почвы выбросами продуктов сгорания попутного нефтяного газа на исследуемом участке происходило на протяжении 20 лет. Осаждение загрязняющих веществ наблюдалось на определенном расстоянии от источника загрязнения в соответствии со скоростью, направлением ветра и относительной молекулярной массой веществ. Таким образом, на протяжении многих лет сформировалась следующая картина загрязнения: максимальная концентрация углеводородов отмечена с северной и восточной сторон (в соответствии с преобладающим направлением ветра) на расстоянии 50 -100 м от факела.

На основе полевых исследований почвы, загрязненной продуктами неполного сгорания природных и попутных газов на факельных системах, можно заключить, что этот комплексный поллютант способствовал увеличению численности углеводородокисляющих бактерий и микромицетов пропорционально поступлению ( $r=0.752$ , при  $p=0.95$  и  $r=0,714$  при  $p=0,95$ ).

В то же время загрязненная почва обладала фитотоксическим действием: угнетающе влияла на количество проросших семян, длину корней проростков, степень развития корневых волосков.

Посев кострца способствовал ускорению процесса деструкции нефтяных углеводородов (табл. 2).

Таблица 2

Содержание остаточных углеводов в почве, загрязненной продуктами неполного сгорания попутного нефтяного газа, при фитомелиорации кострцом, г/100 г

Участок	Сроки отбора проб, сут			
	3	30	60	90
Ризосфера				
1 (север)	6,24±0,05	5,78±0,10	4,68±0,08	1,87±0,09
2 (восток)	6,01±0,08	5,76±0,07	4,57±0,07	1,69±0,04
Эдафосфера				
1 (север)	5,81±0,05	5,64±0,03	5,02±0,09	4,59±0,07
2 (восток)	5,68±0,07	5,51±0,08	5,08±0,04	4,76±0,10

Микробиологический анализ показал, что выращивание кострца положительно сказывалось на численности УОМ. При этом в ризосфере растений была отмечена более высокая численность УОМ в сравнении с нерекультивируемой почвой на протяжении всего эксперимента, тогда как в эдафосфере эти различия не так заметны (рис. 12).

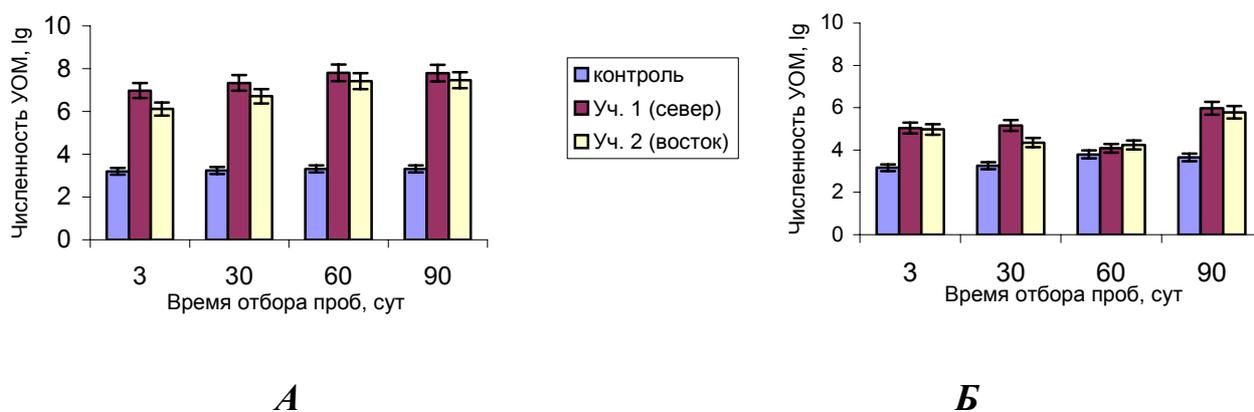


Рис.12. Численность углеводородокисляющих микроорганизмов при фитомелиорации кострцом, lg числа жизнеспособных клеток  
**А** – ризосфера, **Б** - эдафосфера

Фиторекультивация посевом и выращиванием кострца способствовала значительному снижению фитотоксичности по отношению к семенам редиса (рис. 13), что особенно проявилось в почве ризосферы растений. Это связано не только с деструкцией углеводов (через три месяца убыль углеводов составила в ризосфере около 70%, в эдафосфере – 20%), но и с уменьшением численности углеводородокисляющих грибов, в том числе и фитотоксичных видов.

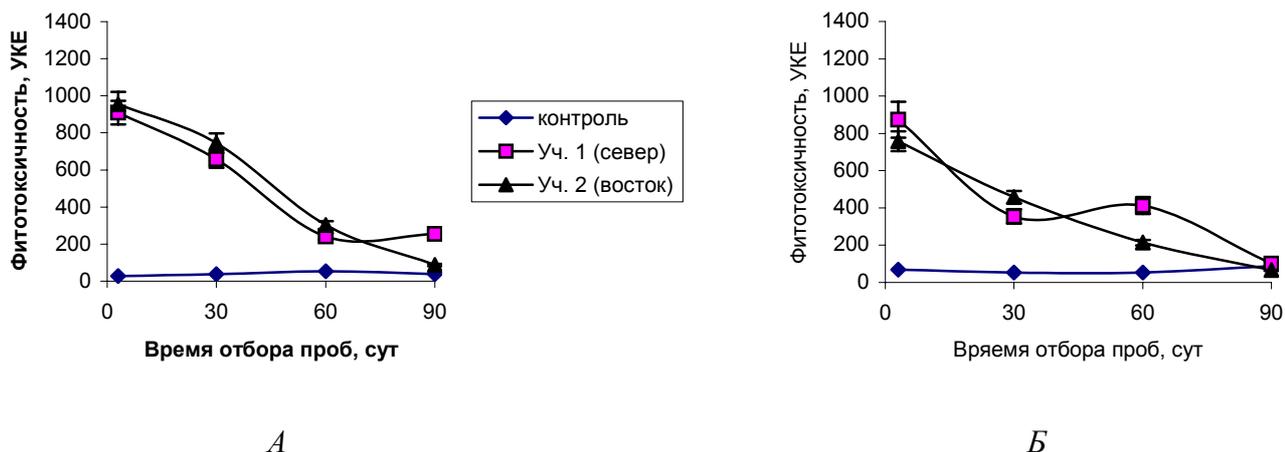


Рис.13. Фитотоксичность загрязненных почв при фитомелиорации костречом, УКЕ мг/л  
*А* – ризосфера, *Б* - эдафосфера

В течение всего эксперимента наблюдалось стимулирование активности почвенной липазы по сравнению с фоновой почвой. Наиболее интенсивно процесс липолиза происходил в ризосфере растений (увеличение активности липазы составило около 50%).

Анализ результатов работы позволяет сделать вывод, что одним из наиболее перспективных, интересных и многообещающих экологически безопасных методов очистки почв и объектов, загрязненных нефтяными углеводородами, является использование для рекультивации фитомелиорантов. Выращивание растений способствует очистке почв и позволяет обеспечить стабильность процесса биологического распада при относительно невысокой стоимости затрат.

На рисунке 14 представлена схема, обобщающая результаты сравнительного анализа эффективности различных методов биоремедиации почв и объектов, загрязненных нефтяными углеводородами, по показателям снижения содержания остаточных углеводородов и токсичности.

УГЛЕВОДОРОДЫ	→ Нефть	БЦ = ФМЛ = СО > ФМК > БН
	→ Бензиновая фракция	ФМЛ > ФМК > БН
	→ Вакуумный газойль	ФМЛ > ФМК > БН
	→ Вакуумный остаток	ФМЛ > ФМК > БН
	→ Нефтешлам	СО > СК
	→ Продукты неполного сгорания	ФМК

Условные обозначения:

БЦ – Бациспектин, БН – Бионекс-Плюс

ФМЛ – фитомелиорант люцерна, ФМК – фитомелиорант кострец

СО – сосновый опад, СК – сосновая кора

Рис. 14. Эффективность применения различных способов для биоремедиации почв и объектов, загрязненных нефтяными углеводородами

## ВЫВОДЫ

1. Внесение биопрепарата Бациспектин, удобрения Бионекс-Плюс, опада хвои сосны и посев фитомелиорантов на нефтезагрязненной почве ускорило разложение углеводов, повысило численность углеводородокисляющих микроорганизмов, активность липазы и каталазы, снизило фито- и зоотоксичность почвы в диапазоне концентрации нефти до 10% включительно.

По эффективности рекультивирующие факторы можно расположить следующим образом: Бациспектин = Люцерна посевная = Опад хвои сосны > Кострец безостый > Бионекс-Плюс.

2. Использование фитомелиорантов в большей степени способствовало снижению токсического воздействия продуктов первичной переработки нефти на почвы и удалению нефтяных углеводов по сравнению с внесением органо-минерального удобрения Бионекс-Плюс.

3. Применение коры и опада сосны эффективно для детоксикации нефтешламов и позволяет снизить содержание остаточных углеводов до 40% от исходного количества и уменьшить фито- и зоотоксичность на 50 % за шесть месяцев.

4. В почве, загрязненной продуктами неполного сгорания попутного нефтяного газа, численность углеводородокисляющей микробиоты, активность ферментов и фитотоксичность типичны для нефтезагрязненных почв. Эффективным является способ ее фиторекультивации с применением костреца безостого.

5. Активность липазы является индикатором биodeградации углеводов в почвах и других объектах и может быть рекомендована как метод агроэкологического мониторинга в качестве показателя степени загрязнения и активности процессов восстановления.

6. На основе анализа микробиологических и биохимических процессов, протекающих в ризосфере растений, показана целесообразность использования фитомелиорантов для рекультивации почв, загрязненных нефтяными углеводородами.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Тарасенко Е.М., Новоселова Е.И., **Валиуллина А.А.**, Онегова Т.С. Использование ферментативной активности для диагностики антропогенной трансформации почв. // Почва как связующее звено функционирования природных и антропогенно-преобразованных экосистем. Матер. межд. конф. Иркутск, 2001. С. 156.
2. Тарасенко Е.М., **Валиуллина А.А.** Влияние нефтяного загрязнения на комплексы углеводородокисляющих микроорганизмов. // Сб. тезисов 6-ой Пущинской школы – конф. молодых ученых. Пущино. - 2002. – Т.3. - С. 160.
3. Тарасенко Е.М., Киреева Н.А., Ханисламова Г.М., **Валиуллина А.А.**, Федотов А.В. Подбор биодиагностических показателей для оценки токсичности нефтезагрязненных и рекультивируемых почв. // Итоги биологических исследований. 2001 г. Выпуск 7.: Сб. научн. трудов. - Уфа: РИО БашГУ. - 2003. - С. 112-113.
4. Киреева Н.А., Тарасенко Е.М., Бакаева М.Д., **Валиуллина А.А.** Токсическое действие нефтяных углеводородов на рост и развитие люцерны (*Medicago sativa L.*). // Ботанические исследования в Азиатской России. Матер. XI Съезда РБО. Новосибирск. - 2003. - С.230-231.
5. Тарасенко Е.М., Бакаева М.Д., **Валиуллина А.А.** Экологический мониторинг нефтезагрязненных почв в процессе биорекультивации. // Актуальные экологические проблемы Республики Татарстан: Матер. Республ. научн. конф. – Казань: Отечество. - 2003. - С. 245-246.
6. Киреева Н.А., Новоселова Е.И., **Валиуллина А.А.** Использование липазной активности для биомониторинга деградации нефти и нефтепродуктов в почве. // Почвы – национальное достояние России: Матер. IV съезда Докучаевского общества почвоведов. Новосибирск. - 2004. – Т. 1. - С. 630.
7. Киреева Н.А., Тарасенко Е.М., Ханисламова Г.М., **Валиуллина А.А.** Использование ногохвосток (*Collembola*) для оценки токсичности нефтезагрязненных почв. // Токсикологический вестник. – 2004 - №3. – С.34-37.
8. Кабиров Т.Р., **Шамаева А.А.** Активность почвенной липазы как индикатор процесса биodeградации нефти в почве. // Сб. тезисов Всерос. конф. «VII Докучаевские молодежные чтения», С.Пб. - 2004. - С. 80.
9. **Шамаева А.А.**, Кабиров Т.Р. Использование люцерны (*Medicago sativa L.*) для фитомелиорации нефтезагрязненных почв. // Сб. тезисов XI междунар. конф. студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов-2004». Секция почвоведение. М.: МГУ, 2004. С. 180-181.
10. Федотов А.В., Киреева Н.А., Тарасенко Е.М., **Шамаева А.А.**, Кабиров Т.Р. Создание биопрепарата для биоремедиации нефтезагрязненных почв // Итоги биологических исследований. 2004 г. Выпуск 8.: Сб. научн. трудов. - Уфа: РИО БашГУ. - 2004. - С. 42 –46.

11. **Шамаева А.А.**, Тарасенко Е.М., Бакаева М.Д. Видовое разнообразие углеводородокисляющих микроорганизмов в нефтезагрязненных почвах Башкортостана // Актуальные проблемы экологии и охраны окружающей среды: Тезисы докл. Всеросс. конф. молодых ученых и студентов – Уфа: РИО БашГУ. - 2004. - С. 87-88.
12. Киреева Н.А., **Шамаева А.А.**, Бакаева М.Д. Углеводородокисляющие микроорганизмы нефтезагрязненных почв и их использование в биоремедиации // Университетская наука – Республике Башкортостан: Том I. Естественные науки: Матер. научн.-практ. конф., посвящ. 95-летию основания БашГУ– Уфа: РИО БашГУ. - 2004. - С.138-139.
13. Киреева Н.А., Онегова Т.С., **Шамаева А.А.** Комплексная биотехнология очистки и детоксикации нефтезагрязненных почв с использованием биопрепарата // Матер. второго съезда общества биотехнологов России. – Москва – 2004. – С. 129-131.
14. Киреева Н.А., **Шамаева А.А.** Биоиндикация токсичности нефтезагрязненных и рекультивируемых почв // Актуальные проблемы регионального экологического мониторинга: теория, методика, практика. Сб. материалов Всеросс. научн. школы. Выпуск II. Киров. - 2004. – С. 213-214.
15. Киреева Н.А., Бакаева М.Д., **Шамаева А.А.**, Салахова Г.М. Изменение фитотоксичности нефтезагрязненных почв при биоремедиации // Актуальные экологические проблемы Республики Татарстан. тезисы докл. IV научн. конф. - Казань. – 2004. – С. 113.
16. Киреева Н.А., **Шамаева А.А.**, Салахова Г.М. Опыт создания биопрепарата на основе углеводородокисляющих микроорганизмов, выделенных из нефтезагрязненных почв Башкортостана // Стратегия природопользования биоразнообразия в XXI веке. Матер. 2<sup>ой</sup> Междун. научн. конф. – Оренбург. – 2004. – С. 46-46.
17. Киреева Н.А., Ханисламова Г.М., **Шамаева А.А.** Влияние загрязнения почвы нефтью на выживаемость коллембол // Экологическое разнообразие почвенной биоты и биопродуктивность почв. Матер. IV (XIV) Всеросс. совещ. по почвенной зоологии. Тюмень. – 2005. – С. 122-124.
18. Киреева Н.А., **Шамаева А.А.**, Салахова Г.М. Видовое разнообразие углеводородокисляющих микроорганизмов в почвах Башкортостана при нефтяном загрязнении и их применение при рекультивации // Популяции в пространстве и времени. Сб. матер. VIII Всеросс. популяц. семинара. - Н.Новгород. – 2005. – С. 145-146.
19. Киреева Н.А., Тарасенко Е.М., **Шамаева А.А.**, Новоселова Е.И. Влияние загрязнения почв нефтью и нефтепродуктами на активность липазы. // Почвоведение. – 2006. - №8. – С.1005-1011.

