

На правах рукописи

Филатов Дмитрий Александрович

**БИОДЕГРАДАЦИЯ УГЛЕВОДОРОДОВ НЕФТИ В ПОЧВЕ
С ПРИМЕНЕНИЕМ СВЕТОКОРРЕКТИРУЮЩИХ
ПОЛИМЕРНЫХ ПЛЕНОК**

03.00.16 - экология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Томск – 2009

Работа выполнена в лаборатории коллоидной химии нефти Института химии нефти Сибирского отделения Российской академии наук

Научные руководители: доктор технических наук, профессор
Алтунина Любовь Константиновна
кандидат биологических наук, доцент
Сваровская Лидия Ивановна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Терещенко Наталья Николаевна
кандидат биологических наук, доцент
Кривец Светлана Арнольдовна

Ведущая организация: ГОУ ВПО «Иркутский государственный университет»

Защита диссертации состоится 29 апреля 2009 года в 12.00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.267.10 при ГОУ ВПО «Томский государственный университет» по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ГОУ ВПО «Томский государственный университет» по адресу: г. Томск, пр. Ленина, 34 а.

Автореферат разослан 27 марта 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Е.Ю. Просекина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Нефть и нефтепродукты являются одними из основных загрязнителей окружающей среды и в первую очередь почвы (Коронелли, 1996). Попадая в почву, нефтепродукты ухудшают общую экологическую обстановку, существенно изменяя агрофизические и агрохимические свойства почв (Оборин, 1998). Они оказывают токсическое действие на высшие растения, вызывают замедление развития, а при высоких концентрациях и гибель живых организмов почвы (Середина и др., 2006). В связи с этим разработка способов очистки нефтезагрязненных почв – одна из важнейших задач при решении проблемы антропогенного воздействия на окружающую среду (Киреева и др., 2001).

Микробиологическая ремедиация (биорекультивация) является наиболее экономически выгодной и экологически безопасной по сравнению с остальными способами рекультивации (выжигание, взрывной способ, засыпка чистым грунтом) (Оборин, 2002). Под биорекультивацией подразумевается активизация аборигенной почвенной микрофлоры, сформировавшейся в условиях нефтяного разлива, а также внесение специально разработанных биопрепаратов при концентрации загрязнений свыше 10 %. Разложение нефти и нефтепродуктов в почве в естественных условиях – процесс биохимический. Интенсивность деградации нефти находится в прямой зависимости от биологической (ферментативной) активности почвы, общего количества почвенной микрофлоры и ее физиологической активности. В настоящее время существует множество технологий рекультивации, основанных на углеводородоокисляющей активности микроорганизмов. В основе их лежит интродукция в почву или стимуляция углеводородоокисляющей аборигенной микрофлоры внесением комплекса минеральных удобрений, сорбентов, ПАВ и ряд агротехнических мероприятий (Логинов и др., 2000). Эти меры направлены на улучшение воздушного, водного и минерального режима почвы. Кроме того, улучшение температурного и водного режима почвы возможно при использовании пленочных покрытий.

Особое внимание в последние годы привлекают светокорректирующие полимерные материалы, содержащие в своем составе фотолуминофоры (Райда и др., 2003) и применяющиеся в качестве эффективных селективных фильтров электромагнитного излучения солнца (Карасев, 1995). Влиянию пленок на жизнедеятельность растений посвящено достаточное количество работ (Щелоков, 1996; Толстиков и др., 1998; Головацкая и др., 2002; Минич, 2003). Использование таких пленок приводит к эффекту ускорения процессов жизнедеятельности растений и повышению их хозяйственной продуктивности (Кособрюхов, 2000).

Поэтому представлялось интересным исследовать возможность применения светокорректирующих пленочных покрытий для стимуляции биохимического окисления нефтяного загрязнения в почве.

Цель работы: разработать научные основы метода биоремедиации нефтезагрязненных территорий с применением аборигенной углеводородоокисляющей микрофлоры и светокорректирующих полимерных пленок.

Для достижения поставленной цели решались следующие основные задачи:

- исследовать рост почвенной аборигенной микрофлоры при разной концентрации нефтяного загрязнения;
- установить влияние светокорректирующих пленок на рост и углеводородоокисляющую активность почвенной микрофлоры в лабораторных и полевых условиях;
- изучить влияние УФ-излучения, трансформированного светокорректирующими пленками, и красного излучения спектра люминесценции светокорректирующей пленки на рост и ферментативную активность микрофлоры нефтезагрязненной почвы;
- установить эффект применения светокорректирующей пленки при микробной деградации нефтяного загрязнения в жидкой среде;
- исследовать совместное влияние светокорректирующей пленки и минеральных и органических удобрений на биодеструкцию углеводов (УВ) нефти в почве.

Научная новизна. Нами впервые показана возможность интенсификации биохимического окисления УВ нефти в почве при использовании светокорректирующих полимерных пленок, что проявляется в увеличении численности углеводородоокисляющей (УОБ) группы микроорганизмов в 15–30 раз и росте ее ферментативной активности в 2–4 раза в полевых и лабораторных условиях.

Впервые экспериментально установлена эффективность применения светокорректирующей пленки в комплексе с минеральными и органическими удобрениями в процессах биодegradации нефтяных загрязнений.

Впервые исследовано влияние на микрофлору нефтезагрязненной почвы длинноволнового УФ-излучения (365 нм), трансформированного светокорректирующими пленками.

Впервые показана интенсификация биохимического окисления нефти (роста численности и ферментативной активности микрофлоры) при облучении красным монохроматическим светом, соответствующим спектру люминесценции светокорректирующей пленки (615 нм).

Защищаемые положения.

1. Светокорректирующие пленки, обладающие «полисветановым» эффектом, повышают численность основных физиологических групп почвенных микроорганизмов: гетеротрофных бактерий, актиномицетов и микромицетов.

2. Применение светокорректирующих пленок в качестве укрывного материала повышает биологическую активность нефтезагрязненных почв:

возрастает активность каталазы, дегидрогеназы, полифенолоксидазы, пероксидазы, уреазы и интенсивность дыхания.

3. С использованием светокорректирующих пленок в качестве укрывного материала ускоряются процессы разложения нефти в почве, а при использовании пленок в комплексе с азотсодержащими удобрениями наблюдается практически полная биодеструкция нефтяного загрязнения.

Практическая значимость работы. Разработаны теоретические основы и показана перспективность нового биотехнологического высокоэкологичного метода очистки и биорекультивации нефтезагрязнённых территорий с использованием светокорректирующей пленки в качестве укрывного материала. Полученные результаты указывают на большие перспективы одновременного использования светокорректирующих пленок совместно с минеральными и органическими стимулирующими субстратами в процессе биоремедиации нефтезагрязнений.

Диссертационная работа выполнена при финансовой поддержке фонда Бортника (проект № 5208р / 7638).

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на VII и VIII Всероссийской научно-практической конференции студентов и аспирантов «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2006, 2007), Международной научной конференции из серии наука и бизнес «Международное сотрудничество в биотехнологии: Перспективы и реальность» (Пушино, 2006), Международной молодежной конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2006), Всероссийской научной молодежной конференции. «Под знаком Σ ». (Омск, 2007), Международной научно-практической конференции «Новые технологии в решении экологических проблем ТЭК» (Москва, 2007), Всероссийской научно-практической конференции. «Научное творчество молодежи» (Анжеро-Судженск, 2007), IV Школе–семинаре молодых ученых России. Проблемы устойчивого развития региона (Улан-Удэ, 2007), Всероссийской научно-практической конференции «Добыча, подготовка, транспорт нефти и газа» (Томск, 2007), III Международной научно-технической конференции «Полимерные и композиционные материалы и покрытия» (Ярославль, 2008), Международной научной конференции «Проблемы биоэкологии и пути их решения» (Саранск, 2008), I Всероссийском конгрессе, с международным участием, студентов и аспирантов биологов «Биология: традиции и инновации в 21 веке» (Казань, 2008), 6-ой международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования, промышленность» (Санкт-Петербург, 2008).

Публикации. Самые значимые результаты исследований опубликованы в 19 печатных работах.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 147 страницах, содержит 50 рисунков, 21 таблицы; состоит из введения, обзора литературы, главы материалов и методик исследований, двух глав экспериментальных

результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы, включившего 193 наименования.

Автор выражает глубокую благодарность за помощь в планировании и выполнении работы А.Е. Иваницкому, а также всем сотрудникам лаборатории коллоидной химии нефти, лаборатории углеводов и высокомолекулярных соединений, лаборатории превращения природных соединений нефти.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность исследования, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость работы.

В первой главе изложен обзор литературы, в котором представлены основные механизмы биодegradации УВ нефти разного строения. Проведена оценка эффективности различных способов очистки почв от нефти и нефтепродуктов. Изложен научный обзор теоретических исследований, лабораторных экспериментов и промышленного опыта по способам рекультивации почв от нефтяных загрязнений. Обобщены данные по созданию, методам получения и применения светокорректирующих пленок, как светофильтров лучистой энергии солнца. А также описана суть полисветанового эффекта и приведены данные о существовании у микроорганизмов фитохромной системы регуляции.

Во второй главе описаны объекты и методы исследований.

В работе использованы:

- светокорректирующие полимерные пленки марок ФЕ, ОЛ и Л-50, показавшие хорошие результаты при выращивании под ними растений. Эти пленки содержат в своем составе в качестве люминофоров комплекс нитрата европия с фенантролином, оксисульфид лантана, активированный европием и фосфат-ванадат иттрия, активированный европием соответственно. Такие пленки преобразуют часть длинноволнового УФ-излучения в красную область спектра с максимумом люминесцентного излучения 615 нм.

- нефть Лас-Еганского месторождения Западной Сибири.

- комплексное минеральное удобрение «Унифлор», ТУ 21 86-001-23081828-00, ЧП «Молодцов», Санкт-Петербург.

- удобрение на основе биогумуса «Радуга», ТУ 9896-016-11158098-2000, ЗАО «МНПП Фарт», Санкт-Петербург.

Для получения модельного нефтяного загрязнения в подготовленные образцы почвы вносили определенное количество нефти.

В лабораторных экспериментах применяли универсальный нейтральный грунт «Гарант» (производство ПК Темп-2, Томская область, Россия). В полевых опытах использовали серую лесную суглинистую почву.

Отбор, подготовка почвенных образцов и микробиологические исследования проводились по стандартным методикам. Динамику численности

определяли по трем группам микроорганизмов – амонификаторы, актиномицеты и микромицеты. Содержание остаточной нефти определяли весовым методом, нефть из почвы экстрагировали горячим способом в аппарате Сокслета хлороформом. Дегидрогеназную, полифенолоксидазную, пероксидазную и уреазную активность определяли фотоколориметрическим методом, каталазную активность газометрическим методом. Интенсивность дыхания определяли на газовом хроматографе.

Для всех экспериментов проведены контрольные опыты и статистическая обработка данных с помощью пакета компьютерных программ Microsoft Excel version 5.0.

Качественный состав экстрактов, полученных из образцов нефтезагрязненной почвы, анализировали методами газожидкостной хроматографии (ГЖХ), хроматомасс – спектрометрии (ГХ-МС), спектроскопии ЯМР на ядрах H^1 , ИК-спектроскопии и элементного анализа.

В 3 и 4 главе приведены экспериментальные результаты и их обсуждение.

Влияние нефтяного загрязнения на оксигеназную активность почвенной микрофлоры

В лабораторных условиях проведена оценка влияния 5 и 10% концентрации нефти на динамику численности и оксигеназную активность аборигенной углеводородокисляющей почвенной микрофлоры. Нами установлено, что УВ нефти, загрязняющие почву в 10 % концентрации, оказывают угнетающее действие на аэробную группу микроорганизмов. При 10 %-ном загрязнении численность микроорганизмов понижается в 2-4 раза по сравнению с незагрязненной почвой. Загрязнение в 5 % - ной концентрации, стимулирует рост численности и окислительную активность основных групп почвенной углеводородокисляющей микрофлоры: гетеротрофных бактерий, микромицетов и актиномицетов. Их численность повышается примерно на порядок.

В зависимости от численности микроорганизмов находится уровень биодegradации углеводородов нефти. Хроматографический анализ остаточной нефти в опытных образцах почвы показал изменения в концентрации насыщенных УВ $C_9 - C_{19}$. Коэффициент биодegradации (отношение изопренанов Pg и Ph к сумме n -алканов C_{17} и C_{18}) для исходного загрязнения составлял 0.6. При 5 % - ном загрязнении отмечены изменения в составе насыщенных УВ $C_9 - C_{14}$, их относительное содержание понизилось на 50-90 %, $K_{\text{биод.}}$ увеличился до 1.45, повышение абсолютного значения этой величины по отношению к исходной указывает на процессы биодеструкции нефти. При 10% - ном загрязнении процессы биодеструкции незначительны, небольшие деструктивные изменения насыщенных УВ отмечены в области $C_9 - C_{11}$, $K_{\text{биод.}}$ составил 0.8. Во всех вариантах опыта изменений в области тяжелых УВ $C_{20} - C_{32}$ не отмечено.

Влияние покрытия почвы светокорректирующими пленками на аборигенную почвенную микрофлору

Экспериментально установлено, что нефтяное загрязнение в 5 % концентрации не угнетает и даже стимулирует рост численности и биохимическую активность аборигенной углеводородоокисляющей почвенной микрофлоры. Но увеличение численности всего на один порядок недостаточно для глубокой биодеструкции нефти. Для дальнейшей активации биодеструкции УВ нефти в почве применялись светокорректирующие пленки в качестве укрывного материала.

Биодеструкция углеводородов нефти в почве с применением светокорректирующих пленок в условиях лабораторного эксперимента

Установлено, что светокорректирующие пленки ФЕ и ОЛ положительно влияют на процессы микробиологического окисления углеводородов нефти в почве.

В чистой почве под светокорректирующими пленками численность учитываемой микрофлоры увеличилась в 11-12 раз, в почве, загрязненной нефтью, численность микроорганизмов увеличилась в 13-18 раз.

Каталаза и дегидрогеназа – ферменты группы оксигеназ, катализирующие окислительно-восстановительные процессы и трансформацию отдельных групп органических соединений, в том числе УВ нефти. Активность этих ферментов является динамичным показателем самоочищения почвы от нефтяного загрязнения. В опытных образцах чистой почвы активность каталазы к концу эксперимента возрастает от 0.23 до 0.55-0.57 мл/г, в контрольном варианте не превышает 0.35 мл/г (табл.1).

Таблица 1 – Изменение каталазной и дегидрогеназной активности под светокорректирующими пленками

Варианты опыта	Каталаза, мл O ₂		Дегидрогеназа, мг ТФФ	
	В чистой почве	В нефтезагрязненной почве	В чистой почве	В нефтезагрязненной почве
Исходное	0.22±0.01	0.25±0.03	0.37±0.03	0.4±0.04
ПЭВД	0.34±0.02	3.8±0.5	0.44±0.02	0.42±0.04
ОЛ	0.55±0.07	7.9±0.4	0.59±0.04	0.99±0.09
ФЕ	0.57±0.09	8.3±0.8	0.63±0.03	1.04±0.08

В нефтезагрязненной почве активность каталазы возрастает почти в 2 раза и составляет 8-8.3 мл/г, в контрольном варианте (пленка ПЭВД) 3.8 мл/г. Активность дегидрогеназы в чистой почве увеличивается от 0.38 до 0.62 мг/г, что в 1.5 раза превышает контрольные данные. В нефтезагрязненной почве дегидрогеназная активность возрастает от 0.4 до 1.04, в контроле не превышает 0.42 мг/г (табл.1).

Утилизация нефти за 30 суток в опытных вариантах составила 37.4% и 38.2%, в контрольном варианте 18.2%.

Общая деструкция n-алканов в контрольном варианте составила 25%, с применением светокорректирующих пленок 40-45 %. $K_{\text{биод}}$ для исходного загрязнения составляет 0.6, в контрольном варианте 0.99, что указывает на низкую степень биодеструкции. При использовании пленок с люминофорами ФЕ и ОЛ $K_{\text{биод}}$ составляет 4.1 и 2.7 соответственно. Биодеструкция затронула УВ с молекулярной массой $C_{19} - C_{30}$. В контрольном варианте изменений в этой области не отмечено.

Процессы биодеструкции углеводородов нефти в почве, закрытой светокорректирующими пленками марки ФЕ, ОЛ, Л-50 и пленкой ФЕ товарного образца

Влияние покрытия нефтезагрязненной почвы светокорректирующими плёнками на биодеструкцию изучали в условиях полевого эксперимента. Опытные лизиметры с загрязнённой почвой закрывали подвижными рамками, затянутыми светокорректирующими пленками марки ФЕ и ОЛ, контрольные - пленкой ПЭВД.

Сопоставительный анализ светокорректирующего пленочного покрытия и аналогичной не модифицированной пленки ПЭВД показал его стимулирующее действие по отношению к участвующим в разложении нефти почвенным микроорганизмам, численность которых увеличилась в 13-19 раз по сравнению с контролем (рис. 1 а, б).

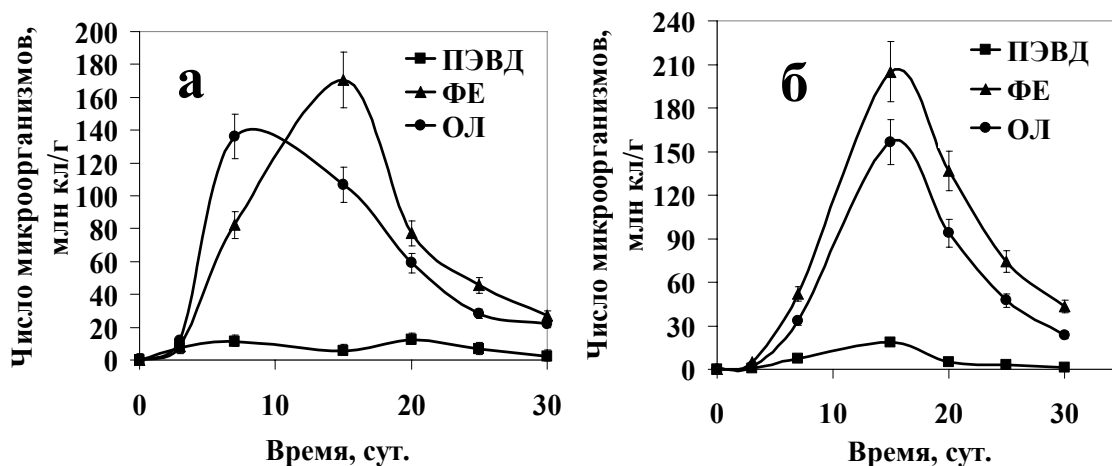


Рисунок 1 – Динамика численности гетротрофных бактерий (а) и микромицетов (б) в почве под светокорректирующими пленками.

Весовой анализ показал, что утилизация нефти в вариантах, где применялась пленка ФЕ и ОЛ, за 30 суток составила 38.5% и 37.5% соответственно, в контрольном варианте 18.3 %.

Доля n-алканов в загрязняющей почву нефти снижалась на 24 % под пленкой ПЭВД, на 41.4 и 45.6 % - под пленками ОЛ и ФЕ (рис. 2, а). В опытных

вариантах биодеструкция затронула углеводороды с молекулярной массой C_{19} – C_{28} , $K_{\text{биод}}$ вырос в 3-3.5 раза (рис. 2, б), что указывает на более глубокие процессы биодеструкции.

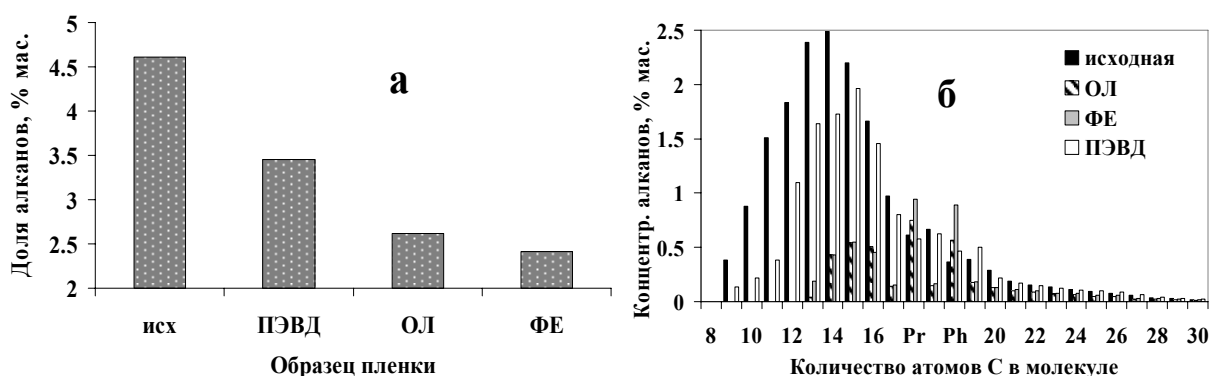


Рисунок 2 – Изменение содержания (а) и молекулярно-массового распределения (б) n-алканов нефти после биодеградации в почве под светокорректирующими пленками. ПЭВД – контроль.

Целью следующего эксперимента был сравнительный анализ пленки Л-50 и ранее изученной ФЕ. (Контроль – ПЭВД). Под обеими пленками численность учитываемых групп микроорганизмов (гетеротрофных бактерий, актиномицетов и микромицетов) в нефтезагрязненной почве увеличивается в 20-25 раз по сравнению с контролем. По результатам весового анализа, в контроле деструкция нефти составила 36.2 %, под пленками Л-50 и ФЕ – 70.4 и 76.2 % соответственно (табл. 2).

Таблица 2 – Изменение содержания нефти в почве после биодеструкции под светокорректирующими пленками ФЕ и Л-50.

Исследуемые параметры	Исходное	ПЭВД	ФЕ	Л-50
Содержание нефти в почве, г/кг	50	31.9	11.9	15.3
Деструкция нефти, %	-	36.2	76.2	70.4

По данным ГЖХ, коэффициент биодеструкции в опытных вариантах увеличивается в 4-5 раз и составляет 4.8-5.2, что указывает на более интенсивную деградацию нефти по сравнению с контролем ($K_{\text{биод.}} = 1.03$).

По результатам ГХ-МС, содержание некоторых ароматических соединений нефти в опытных вариантах снизилось в 3-30 раз по сравнению с контролем. Т.е. микроорганизмы в результате биохимического окисления разрушают не только насыщенные и изоалканы, но и ароматические соединения, являющиеся наиболее токсичными компонентами нефти.

В следующем опыте тестировали светокорректирующую пленку ФЕ товарного образца, имеющуюся в широкой продаже. Контроль - пленка ПЭВД. Под пленкой ФЕ отмечена стимуляция роста аборигенной микрофлоры нефтезагрязненной почвы.

Максимальная численность гетеротрофных бактерий, актиномицетов и микромицетов в контроле не превышала 7, 18 и 4.5 млн. кл/г соответственно. В опытном варианте их максимальная численность составила 270, 760 и 48 млн. кл/г соответственно.

Под пленкой ФЕ товарного образца наблюдается повышение активности каталазы в 3 раза. Максимальное значение активности в опытных пробах составило 6, в контрольных - 2 мл/г почвы (рис. 3, а).

Интенсивность дыхания почвы является показателем скорости разложения органического вещества, в том числе нефти. Максимальное значение выделения CO_2 , характеризующее интенсивность дыхания в опытном образце нефтезагрязнённой почвы в 2.5 раза превышает контрольные показатели (рис. 3, б).

Весовой анализ показал, что за 60 суток утилизация нефти под пленкой ФЕ составила 68 %, под пленкой ПЭВД - 30 %.

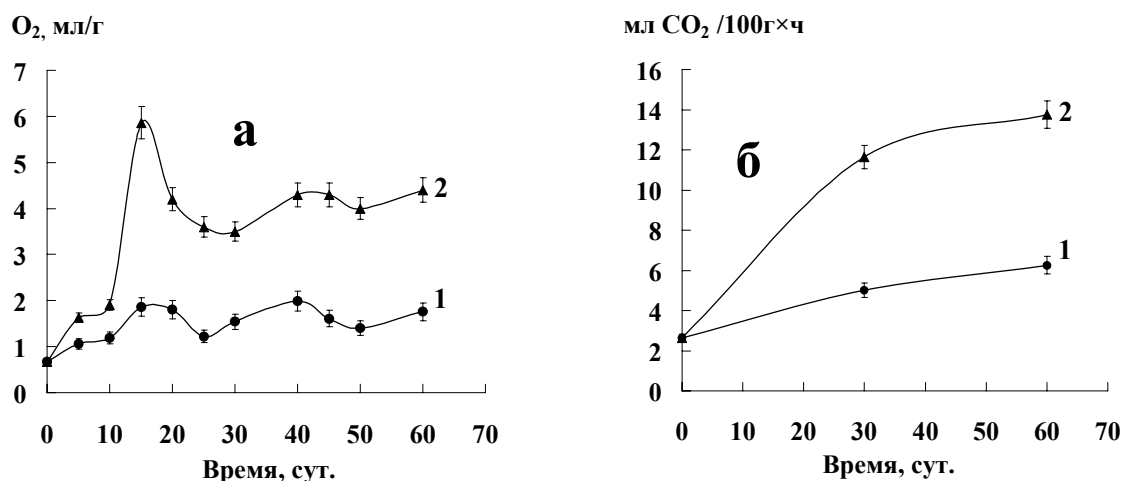


Рисунок 3 – Изменение каталазной активности (а) и интенсивности дыхания (б) нефтезагрязнённой почвы под пленкой ФЕ (2) товарного образца. ПЭВД – контроль (1).

Кроме того, показателями биodeградации служат изменения спектральных коэффициентов (соотношений оптических плотностей характеристических полос поглощения) записанных из ИК-спектров (табл. 3).

Таблица 3 – Изменение спектральных коэффициентов нефти после биodeградации в почве под плёнкой ФЕ. ПЭВД – контроль.

Спектральные коэффициенты	Исходная нефть	ПЭВД	ФЕ
$C_1 = D_{1610}/D_{720}$	0.38	0.60	2.00
$C_2 = D_{750}/D_{720}$	0.67	0.85	1.89
$\text{CH}_3/\text{CH}_2 = D_{1380}/D_{720}$	2.40	2.80	5.20
$(\text{C}=\text{O}/\text{C}=\text{C}) = D_{1710}/D_{1610}$	0.01	0.08	0.42
$(\text{C}=\text{O}/\text{CH}_3) = D_{1170}/D_{1380}$	0.10	0.20	0.37

После биодegradации в почве под пленкой ФЕ в нефти в 2.5-3 раза увеличились коэффициенты C_1 и C_2 , что говорит об уменьшении содержания н-алканов. В 2-5 раз увеличиваются коэффициенты окисленности ($C=O/C=C$) и ($C=O/CH_3$) и в 2 раза - коэффициент разветвленности (CH_3/CH_2), что свидетельствует о микробном окислении длинных цепей н-алканов и накоплении промежуточных продуктов их окисления (альдегидов, кетонов, эфиров и др.)

По данным ЯМР H_1 спектров, в опытном варианте наблюдается относительное увеличение кислородсодержащих соединений (α) на 74 %, относительно уменьшаются сигналы в области β (CH_2) и более интенсивно в области γ (CH_3) по сравнению с контролем. В процессе биодеструкции уменьшается среднее значение длины алифатической цепи, в контрольном варианте длина цепи уменьшилась на 29 %, в опытном варианте на 49 %.

По данным элементного анализа в биодegradированных нефтях снизилось содержание С, Н, N. Снижение С и Н свидетельствует о преимущественной деструкции алифатических УВ либо алкильных заместителей в ядрах ароматических и нафтеновых колец. Об этом же свидетельствует снижение отношения Н/С (отношение насыщенных и ароматических УВ). Соединения азота в нефтях могут являться источниками органогенных элементов для микроорганизмов, что приводит к снижению N в биодegradированных образцах. Увеличение S свидетельствует об относительном возрастании гетероциклических соединений, т.к. сера в основном входит в состав смол и асфальтенов, трудно доступных для микроорганизмов. Возрастает содержание кислородных соединений, являющихся устойчивыми продуктами микробиологического окисления УВ нефти. Наибольшие изменения в элементном составе, и, следовательно, более интенсивные процессы биодеструкции, наблюдаются в образце под пленкой ФЕ (табл. 4)

Таблица 4 – Изменение элементного состава нефти после биодegradации под пленкой ФЕ. ПЭВД – контроль.

Образец	Содержание, %					Н/С
	С	Н	N	S	O	
Исходная	86.55	12.37	0.25	0.64	0.19	0.145
ПЭВД	85.65	11.93	0.11	1.28	1.04	0.139
ФЕ	84.90	10.36	0.1	2.03	2.61	0.122

Результаты хроматографического анализа также подтверждают более интенсивные процессы деструкции УВ нефти в опытном варианте. $K_{\text{биод}}$ при использовании пленки ПЭВД составил 0.9, при использовании пленки ФЕ $K_{\text{биод}}$ увеличился до 5.

Таким образом, использование светокорректирующих пленок ФЕ, ОЛ и Л-50 в качестве укрывного материала нефтезагрязненной почвы стимулирует рост численности и ферментативную активность микроорганизмов. И, как

следствие, процессы биодegradации нефтяного загрязнения протекают значительно интенсивнее по сравнению с контрольными вариантами.

Процессы биодеструкции УВ нефти в почве под влиянием УФ облучения, прошедшего через фотолюминесцентные пленки.

Известно, что преобразование светокорректирующими пленками солнечного излучения сопровождается поглощением УФ-излучения и трансформацией его в красную область спектра (Кособрухов, 2000).

В данном опыте показано, что при облучении нефтезагрязненной почвы УФ светом (с максимумом в спектре люминесценции 365 нм) через светокорректирующие пленки численность всех изучаемых групп микроорганизмов увеличивается в 18–28 раз (рис. 4).

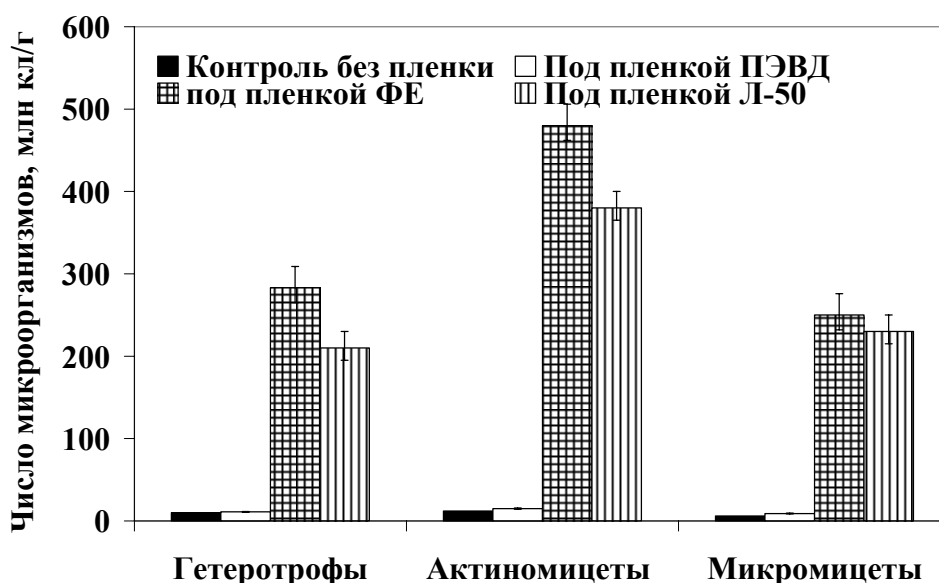


Рисунок 4 – Влияние светокорректирующих пленок на численность микроорганизмов нефтезагрязненной почвы при облучении УФ светом

Полифенолок시다за и пероксидаза катализируют окисление органических соединений ароматического ряда: фенолы, пирокатехин, ортокрезол, гетероатомные соединения нефти и участвует в образовании гумуса в почве. С действием уреазы связаны процессы гидролиза и превращения азота в доступную форму для микроорганизмов, при окислении УВ нефти.

В вариантах, где применялись светокорректирующие пленки, повышается ферментативная активность: каталазы в 2-4, дегидрогеназы в 2.5, уреазы в 4.5, полифенолок시다зы и пероксидазы в 1.5-2 раза. Это свидетельствует об интенсификации процессов биохимического разложения нефти в опытных вариантах.

По данным весового анализа в опытных вариантах (пленки Л-50 и ФЕ) утилизация нефти за 45 суток составила 60-65 %, в контрольных вариантах (без пленки и пленка ПЭВД) – 16-25 %.

С использованием светокорректирующих пленок происходит возрастание спектральных коэффициентов C_1 , C_2 в 2-2.5 раза. Коэффициент окисленности ($C=O/C-C$) увеличивается в 4-4.5 раза, коэффициент разветвленности (CH_3/CH_2) в 2.5-3 раза, что также свидетельствует об интенсификации биодegradации нефти в опытных вариантах.

В опытных вариантах полностью элиминировали n-алканы с длиной цепи $C_{11} - C_{14}$, на 70-80 % уменьшилось содержание УВ с молекулярной массой $C_{15} - C_{28}$. При использовании пленок ФЕ и Л-50 коэффициент биодеструкции увеличивается в 4-5 раз, что указывает на более глубокие процессы окисления УВ нефти.

Процессы биохимического окисления УВ нефти в почве под влиянием красного монохроматического излучения с длиной волны 615 нм.

Результаты исследований показали, что поток красного монохроматического излучения с максимумом 615 нм соответствующей спектру люминесценции светокорректирующей пленки, стимулирует процессы роста и оксигеназную активность микроорганизмов в нефтезагрязненной почве. При облучении нефтезагрязненной почвы красным светом численность всех изучаемых групп микроорганизмов повышается в 14-20 раз.

Увеличение численности микроорганизмов коррелирует с ферментативной активностью нефтезагрязненной почвы. Сравнительные исследования показали, что в нефтезагрязненной почве при облучении красным монохроматическим светом $\lambda=615$ нм активность каталазы и дегидрогеназы увеличивается по сравнению с контрольными данными на 85 % и 60 % соответственно.

Увеличение дегидрогеназной и каталазной активности в нефтезагрязненной почве указывает на интенсификацию окислительных и биохимических процессов.

За 30 суток деструкция нефти в почве при стимуляции красным светом составила 14.7 г/кг (29.4 %) от исходного нефтезагрязнения, при облучении лампой дневного света – 7.6 г/кг (15.2 %) (табл. 5).

Таблица 5 – Изменение содержания нефти в почве после биодеструкции при облучении почвы красным монохроматическим светом с длиной волны $\lambda=615$ нм. Контроль – белый свет

Исследуемые параметры	Исходное	Облучение	
		белым светом	красным светом
Содержание нефти в почве, г/кг	50	42.4	35.3
Деструкция нефти, %	-	15.2	29.4

Процессы биодеструкции подтверждаются данными ИК-спектроскопии. В опытном варианте в 1.5-2 раза увеличиваются коэффициенты C_1 и C_2 , в 2-3.5 раза возрастают коэффициенты окисленности (группа C=O на частоте 1710 см^{-1} и 1170 см^{-1}) и разветвленности УВ нефти. Это свидетельствует о более интенсивных процессах биодеградации при облучении нефтезагрязненной почвы красным светом (табл. 6).

По данным ЯМР-спектров по сравнению с контролем, снижена интенсивность сигналов β (CH_2) и более интенсивно в области γ (CH_3), возрастает количество кислородсодержащих соединений (α).

Таблица 6 - Изменение спектральных коэффициентов нефти после биодеградации в почве при облучении красным монохроматическим светом с длиной волны $\lambda=615\text{ нм}$. Контроль – белый свет

Спектральные коэффициенты	Исходная нефть	Облучение	
		белый свет	красный свет
$C_1 = D_{1610}/D_{720}$	0.38	0.64	0.94
$C_2 = D_{750}/D_{720}$	0.67	0.89	1.29
$\text{CH}_3/\text{CH}_2 = D_{1380}/D_{720}$	2.40	3.40	4.1
$\text{C=O}/\text{C=C} = D_{1710}/D_{1610}$	0.02	0.09	0.32
$\text{C=O}/\text{CH}_3 = D_{1170}/D_{1380}$	0.09	0.14	0.25

По результатам хроматографического анализа, в опытном варианте полностью элиминировали н-парафины с длиной цепи $\text{C}_8 - \text{C}_{15}$, на 40-50 % уменьшилось содержание УВ с молекулярной массой $\text{C}_{14} - \text{C}_{30}$. При этом коэффициент биодеградации в опытном варианте равен 2.6, при облучении лампой дневного света – 0.8, для исходного загрязнения – 0.6.

Таким образом, показано, что красный монохроматический свет с длиной волны 615 нм, соответствующий спектру люминесценции светокорректирующей пленки ФЕ оказывает стимулирующее влияние на динамику численности и биохимическую активность микроорганизмов. Возможно, красный свет выполняет триггерную функцию, запуская определенную систему последовательных реакций, приводящих к биологическому эффекту, в данном случае ускоряются процессы биодеградации нефти в почве.

Биодеструкция УВ нефти в жидкой среде с применением светокорректирующей пленки

Для опыта, проведенного в жидкой среде, использовали эксикаторы со средой Раймонда. В каждый эксикатор помещали по 300 мл среды и вносили нефть в концентрации 2 мл на 100 мл среды. В жидкую среду вносили 2 штамма углеводородокисляющих микроорганизмов рода *Pseudomonas* и *Micrococcus*, выделенные из пластовой воды Усинского месторождения.

Эксикаторы закрывали светокорректирующей пленкой ФЕ. В качестве контроля использовали эксикаторы закрытые обычной пленкой ПЭВД и закрытые стеклянной крышкой помещенные в темноту без освещения.

Результаты опыта показали, что свет, трансформированный люминофорами полимерной пленки марки ФЕ, стимулирует рост численности микроорганизмов и в жидкой среде. Численность микроорганизмов увеличивается на 1.5-2 порядка.

С увеличением численности микроорганизмов возрастает и ферментативная активность, а следовательно и уровень биodeградации УВ нефти. С применением светокорректирующей полимерной пленки, активность каталазы возрастает от 0.21 до 4.3 мл/мл, в контрольных вариантах не превышает 1.8-2 мл/мл. Активность дегидрогеназы возрастает до 1.25 мг/мл, в контрольных вариантах не превышает 0.56-0.63 мг/мл (рис.5 а, б).

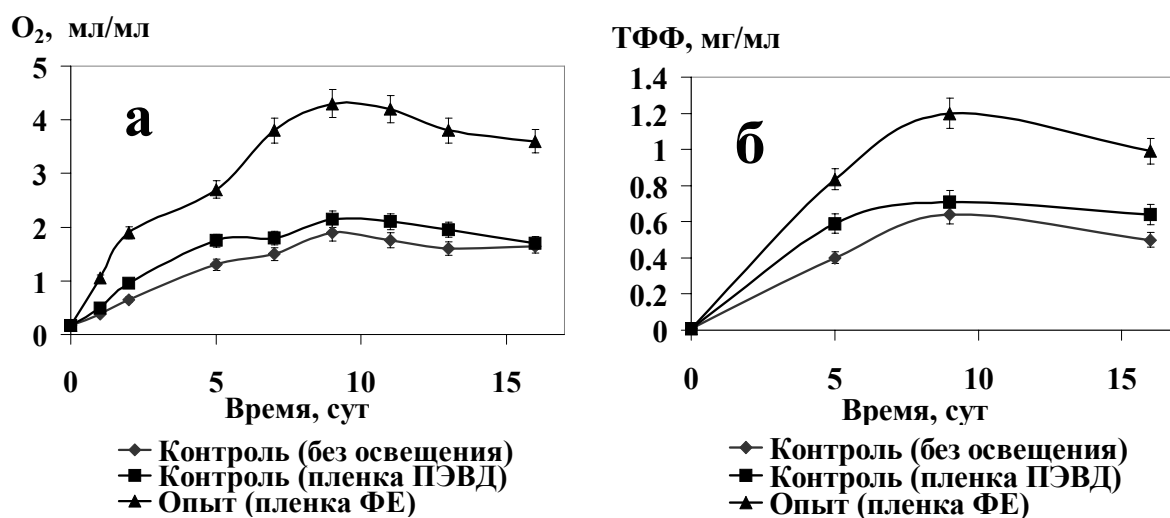


Рисунок 5 – Изменение активности каталазы (а) и дегидрогеназы (б) при биodeградации нефти в жидкой среде под пленками

При использовании светокорректирующей пленки в 2.5 раза увеличивается динамика накопления альдегидов как промежуточных продуктов метаболизма при микробном окислении нефти.

Процессы биodeструкции в опытном варианте подтверждаются данными ИК-спектроскопии. Изменение спектральных коэффициентов (окисленности, ароматичности, разветвленности и тд.) подтверждают более интенсивную деcтрукцию нефти в опытном варианте.

По данным ЯМР-спектроскопии в биodeградированной нефти уменьшается содержание коротко- и длинноцепочечных алканов, увеличивается процент кислородсодержащих соединений, входящих в область α . Последние являются промежуточными продуктами метаболизма при микробном окислении нефти. Наибольшие деcтруктивные изменения произошли с остаточной нефтью, выделенной из опытного образца.

Как следует из рисунка 6, в опытном варианте биодegradация затронула все n-алканы. Полностью элиминировали n-алканы от C₉ до C₁₅, на 80-90 % уменьшилось содержание УВ с молекулярной массой C₁₆- C₃₀. Коэффициент биодegradации для исходного загрязнения составляет 0.6, в образце остаточной нефти с пленкой ПЭВД – 1.2. При использовании пленки ФЕ коэффициент биодеструкции вырос до 4.9, что указывает на глубокие процессы окисления УВ нефти.

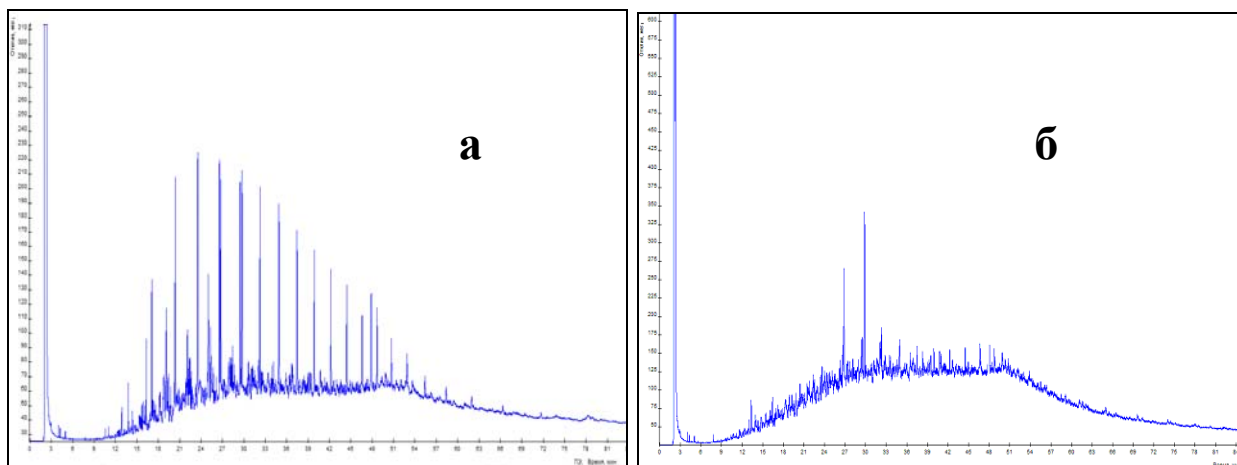


Рисунок 6 - Хроматограммы исходной (а) нефти и после биодegradации в жидкой среде под пленкой ФЕ (б)

Таким образом, с применением светокорректирующих пленок, ускоряются процессы дegradации нефти и в жидкой среде.

Биодеструкция УВ нефти с применением фотолюминесцентной пленки в комплексе с минеральными и органическими удобрениями

Загрязнение почвы нефтью ведет к исчезновению нитратного азота. Обусловлено это как подавлением жизнедеятельности нитрифицирующих бактерий, развитие которых угнетается избытком углеродсодержащих соединений и продуктов их распада, так и сдвигом соотношения C:N. В нефтезагрязненных почвах это соотношение может достигать 400-420:1, по сравнению с 17:1 для незагрязненной почвы. Обволакивание почвенных частиц нефтяной пленкой препятствует миграции подвижных соединений азота в раствор. Поэтому без дополнительного внесения азотсодержащих субстратов в нефтезагрязненную почву невозможно добиться глубокой биодegradации нефти (Киреева и др., 2001).

Эффективность применения светокорректирующей пленки в комплексе с минеральными и органическими удобрениями в процессе биохимического окисления УВ нефти проверялась нами как лабораторными, так и полевыми опытами.

Биодеструкция нефтяного загрязнения с применением светокорректирующей пленки и органического удобрения

В лабораторных условиях проведен опыт совместного применения светокорректирующей пленки марки ФЕ и органической подкормки «Радуга», содержащей гуминовые вещества (ГВ).

Стимулирующий эффект в наибольшей степени выражен в варианте с применением светокорректирующей пленки и подкормки. Численность микроорганизмов повысилась в 8-9 раз по сравнению с контрольными вариантами (рис. 7).

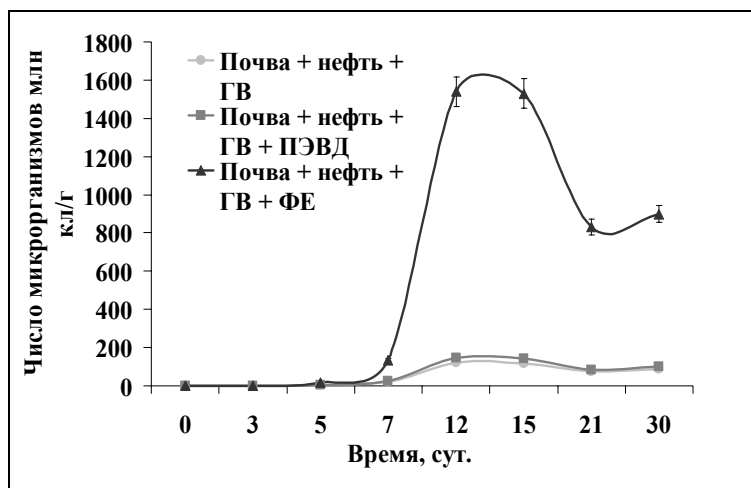


Рисунок 7 – Рост численности гетеротрофных бактерий в нефтезагрязненной почве с применением ГВ и светокорректирующей пленки ФЕ

Рост численности микроорганизмов сопровождается повышением их ферментативной активности, которая обеспечивает процессы деструкции УВ нефти. Ферментативная активность почвы повышается параллельно со временем нахождения нефти в почве благодаря уменьшению токсичности остаточной нефти по мере снижения ее концентрации за счет выноса из почвы и биоразложения. Наиболее четко это прослеживается на примере каталазы и дегидрогеназы, демонстрирующих возрастание процессов окисления остаточных УВ нефти.

Активность каталазы в опытном варианте возрастает почти в 2 раза по сравнению с контрольными вариантами. Активность дегидрогеназы увеличивается на 34-35 % относительно контрольных вариантов. То есть применение светокорректирующей пленки стимулирует процессы самоочищения почвы от нефтяного загрязнения.

Наиболее интенсивно разложение УВ отмечено в варианте, где совместно с ГВ использовалась светокорректирующая пленка. Утилизация нефти за 30 суток составила 27.4 г/кг (54.8%) почвы, в контрольных вариантах (под пленкой ПЭВД) и без пленки 17.7 и 16.4 г/кг (35.4 и 32.8 %) соответственно.

Анализ остаточной после деструкции нефти методами ИК, ЯМР и ГЖХ подтверждает более интенсивные процессы биодеструкции в варианте с применением светокорректирующей пленки и органической подкормки.

Биодеструкция нефтяного загрязнения с применением светокорректирующей пленки и минерального удобрения

Лизиметры с загрязненной почвой накрывали светокорректирующей пленкой ФЕ и обычной пленкой ПЭВД. Нефть в почву вносили в 6 %-ной концентрации. Раз в месяц в почву вносили минеральную подкормку «Унифлор». Контролем служила загрязненная почва под пленкой ПЭВД, ФЕ без внесения подкормки и ПЭВД + подкормка.

Результаты экспериментов показали, светокорректирующая пленка марки ФЕ, стимулирует рост численности аборигенной почвенной микрофлоры на 1-2 порядка. С применением подкормки и пленки ФЕ на 3-4 порядка.

Применение светокорректирующей пленки в качестве укрывного материала совместно с минеральным удобрением способствует повышению активностей окислительно-восстановительных и гидролитических ферментов в загрязненной нефтью почве. Значительное повышение ферментативной активности свидетельствует о более интенсивных процессах биохимического окисления нефтяного загрязнения в почве.

Активность изучаемых ферментов в почве с применением светокорректирующей пленки ФЕ увеличивается в 2-2.5 раза по сравнению с почвой под обычной пленкой ПЭВД и в 5-6 раз с использованием пленки ФЕ и минерального удобрения (табл. 7).

Таблица 7 – Изменение активности ферментов в почве с применением светокорректирующей пленки и подкормки

Активность фермента		ПЭВД	ФЕ	ПЭВД + подкормка	ФЕ + подкормка
Исходная	Каталаза, мл O ₂	0.0.2			
	Дегидрогеназа, мг ГФФ	0.47±0.01			
	Уреаза, мг NH ₃	0.29±0.02			
	Пероксидаза, мг хинон	0.21±0.02			
	Полифенолоксидаза, мг хинон	0.12±0.01			
В конце эксперимента	Каталаза, мл O ₂	2.2±0.4	4.9±0.2	5.8±0.4	11.6±0.5
	Дегидрогеназа, мг ГФФ	0.19±0.01	0.34±0.02	0.43±0.01	0.73±0.02
	Уреаза, мг NH ₃	0.45±0.02	1.8±0.02	2.15±0,04	3.3±0,03
	Пероксидаза, мг хинон	0.23±0.01	0.35±0.01	0.37±0.03	0.58±0.01
	Полифенолоксидаза, мг хинон	0.135±0.02	0.22±0.02	0.3±0.02	0.43±0.03

Утилизация нефти за 90 суток с применением пленки ФЕ + подкормка составила более 90 % (табл. 8).

Таблица 8 - Изменение содержания нефти в почве после биодеструкции под пленкой ФЕ с минеральной подкормкой

Исследуемые параметры	Исходное	ПЭВД	ФЕ	ПЭВД + подкормка	ФЕ + подкормка
Содержание нефти в почве, г/кг	60	37.2	19	17	5
Деструкция нефти, %	-	37	68	72	92

Процессы микробного окисления нефти значительно усиливаются в варианте с применением опытной пленки и внесением подкормки. Об этом свидетельствуют данные ИК, ЯМР спектроскопии, ГЖХ и элементного анализа остаточных компонентов нефти, экстрагированных из почв.

С применением пленки ПЭВД деструкция прошла незначительно. В вариантах с применением пленки ФЕ и ПЭВД + подкормка биодеструкция н-алканов прошла на 70-75 %. Наиболее глубокие процессы биодеструкции насыщенных УВ наблюдались в варианте с применением опытной пленки ФЕ и подкормки. В конце эксперимента практически полностью элиминировали все н-алканы и изоалканы $C_9 - C_{30}$. (рис. 8).

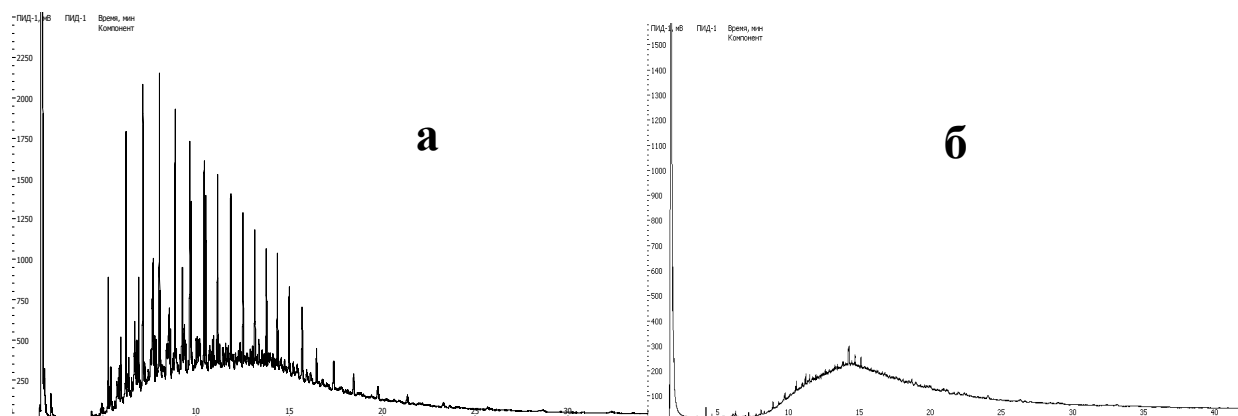


Рисунок 8 - Хроматограммы исходной (а) и биодegradированной нефти (б) с применением светокорректирующей пленки ФЕ и подкормки

Таким образом, применение светокорректирующей пленки в качестве укрывного материала нефтезагрязненной почвы в сочетании с минеральным или органическим удобрением оказывает еще более стимулирующее влияние на процессы биохимического окисления нефтяных УВ, чем при их отдельном применении. При этом деструкция нефтяного загрязнения в почве проходит более чем на 90 %.

ВЫВОДЫ

1. Было показано, что концентрация нефти в почве до 5 % стимулирует рост численности и окислительную активность аборигенной углеводородокисляющей почвенной микрофлоры. Но увеличение численности почвенной микрофлоры на один порядок недостаточно стимулирует ее окислительную активность. 10 % загрязнение оказывает угнетающее действие на почвенную микрофлору. И, как следствие, процессы биodeградации насыщенных углеводородов нефти незначительны.
2. С применение светокорректирующих пленок ФЕ, ОЛ и Л-50 в качестве укрывного материала в 15-30 раз возрастает численность всех исследованных групп микроорганизмов, при этом деградация нефти в почве протекает значительно интенсивнее как в естественных, так и в контролируемых лабораторных условиях.
3. В условиях лабораторного эксперимента показано, что УФ-излучение (с длиной волны 365 нм), прошедшее через светокорректирующие пленки, стимулирует ферментативную активность и процессы биохимического окисления углеводородов нефти в почве.
4. Показано, что при освещении нефтезагрязненной почвы красным монохроматическим излучением с длиной волны 615 нм, соответствующей спектру люминесценции светокорректирующей пленки, активируется естественная микрофлора, ферментативная активность и ускоряются процессы биodeградации нефти в почве.
5. Трансформация УВ нефти и значительное увеличение численности нефтеокисляющих микроорганизмов в жидкой среде существенно интенсифицируется с применением светокорректирующих пленок. Предложен принципиально новый экономичный и экологичный биотехнологический метод биоремедиации нефтезагрязненных почв с помощью светокорректирующих пленок в комплексе с минеральными или органическими удобрениями.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Работы, опубликованные в ведущих научных рецензируемых журналах, включенных в Перечень изданий, рекомендованных ВАК:

1. Сваровская Л.И., Иванов А.А., Юдина Н.В., Филатов Д.А. Стимулирующее влияние гуминовых кислот на оксигеназную активность микроорганизмов нефтезагрязненных почв // Биотехнология. 2007. № 6. С. 60-64.
2. Сваровская Л.И., Алтунина Л.К., Филатов Д.А. Полимерные материалы для фотолюминесцентной активации аборигенной микрофлоры нефтезагрязненных почв // Прикладная биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 6. С. 647-652.

3. Сваровская Л.И., Алтунина Л.К., Филатов Д.А. Влияние УФ-излучения, на ферментативную активность нефтезагрязненных почв // Сибирский экологический журнал. 2008. № 3. С. 457-463.

Работы, опубликованные в других научных изданиях:

4. Сваровская Л.И., Алтунина Л.К., Филатов Д.А. Биодеструкция углеводородов нефти почвенной микрофлорой, активированной фотолюминесцентными пленками // Нефтехимия. 2007. Т. 47. № 3. С. 240-245.
5. Сваровская Л.И., Филатов Д.А., Гэрэлмаа Т., Алтунина Л.К. Оценка процессов биодеструкции нефти методами ИК и ЯМР ¹Н спектроскопии // Нефтехимия. 2009. Т. 49. № 2. С. 1-7.
6. Филатов Д.А., Сваровская Л.И., Овсянникова В.С. Микроорганизмы в процессе восстановления загрязненных почв // Экология, природопользование, охрана окружающей среды: фундаментальные и прикладные аспекты : материалы II Международной научно-практической конференции. – Томск : Изд-во Том. гос. ун-та, 2005. С. 150-154.
7. Филатов Д.А., Сваровская Л.И., Алтунина Л.К. Стимуляция оксигеназной активности нефтеокисляющей микрофлоры в условиях закрытого грунта светокорректирующими пленками // Химия нефти и газа : материалы VI международной конференции. Томск : Изд-во Ин-та оптики атмосферы СО РАН, 2006. С. 279-281.
8. Филатов Д.А., Сваровская Л.И., Алтунина Л.К. Оксигеназная активность микроорганизмов нефтезагрязненных почв в условиях закрытого грунта фотолюминесцентными пленками // Международное сотрудничество в биотехнологии: Перспективы и реальность : материалы 3-й международной научной конференции из серии «Наука и бизнес». Пущино : ИЦ «БиоРесурсы и Экология», 2006. С. 145-149.
9. Филатов Д.А., Сваровская Л.И., Алтунина Л.К. и др. Восстановление биологической активности нефтезагрязненных почв с применением фотолюминесцентных полиэтиленовых пленок // Химия нефти и газа : материалы VI международной конференции. Томск : Изд-во Ин-та оптики атмосферы СО РАН, 2006. С. 227-279.
10. Филатов Д.А., Сваровская Л.И., Алтунина Л.К. Влияние светокорректирующих пленок на биодеструкцию углеводородов нефти, загрязняющей почву // Химия и химическая технология в XXI веке : материалы VII Всероссийской научно-практической конференции студентов и аспирантов. Томск : Изд-во Том. политех. ун-та, 2006. С. 232-236.
11. Svarovskaya L.I., Altunina L.K., Filatov D.A. Biodestruction of Oil Originated Hydrocarbons by Soil Microflora Activated with Photoluminescence Films //

- István Lakatos (ed.): Recent Advances in Enhanced Oil and Gas Recovery. Budapest : Akadémiai Kiadó, 2007. P. 237-244.
12. Алтунина Л.К., Сваровская Л.И., Филатов Д.А. Светокорректирующие пленки для стимуляции активности биоценоза нефтезагрязненных почв // XVIII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии, посвященный 100-летию Менделеевских съездов (Москва, 23-28 сентября 2007 г.). М. : ООО Издательская группа «Граница», 2007. С. 498.
 13. Алтунина Л.К., Филатов Д.А., Сваровская Л.И. Полимерные светокорректирующие пленки для стимуляции окислительной активности биоценоза нефтезагрязненных почв // Новые технологии в решении экологических проблем ТЭК : материалы докладов 2-й Международной научно-практической конференции (Москва, 7-8 февраля 2007 г.). М., 2007. С. 3-4.
 14. Филатов Д.А. Трансформация нефтяного загрязнения с использованием фотолюминесцентной полимерной пленки // Научное творчество молодежи : материалы XI Всероссийской научно-практической конференции (Анжеро-Судженск, 20-21 апреля 2007 г.) : в 2 ч. Томск : Изд-во Том. гос. ун-та, 2007. Ч. 1. С. 157-159.
 15. Сваровская Л.И., Филатов Д.А., Овсянникова В.С. Биодеструкция нефти в почве, защищенной фотолюминесцентными пленками // Проблемы устойчивого развития региона : IV Школа-семинар молодых ученых России : материалы конференции (Улан-Удэ, 4-8 июня 2007 г.). Улан-Удэ : Изд-во Бурят. научного центра СО РАН, 2007. С. 154-155.
 16. Филатов Д.А., Алтунина Л.К., Сваровская Л.И. Перспективы производства и применения фотолюминесцентных полимерных пленок // Полимерные и композиционные материалы и покрытия : материалы III Международной научно-технической конференции (Ярославль, 20-22 мая 2008 г.). Ярославль : Изд-во ЯГТУ, 2008. С. 460-464.
 17. Филатов Д.А., Сваровская Л.И., Алтунина Л.К. Светокорректирующие полимерные пленки для стимуляции деструктивной активности микроорганизмов нефтезагрязненных почв // Биология: традиции и инновации в 21 веке : сб. статей. Казань : Изд-во Казанск. гос. ун-та, 2008. С. 116-118.
 18. Филатов Д.А., Алтунина Л.К., Сваровская Л.И. Применение светокорректирующих полимерных пленок для восстановления почв, загрязненных нефтью // Проблемы биоэкологии и пути их решения : Вторые Ржавитинские чтения : материалы международной научной конференции (Саранск, 15-18 мая 2008 г.). Саранск : Изд-во Мордов. ун-та, 2008. С. 441-442.
 19. Svarovskaya L.I., Altunina L.K., Filatov D.A. Biodestruction of Oil Hydrocarbons by Soil Microflora Activated with Photoluminescence Films // Eurasian Chemico-Technological Journal. 2008. Vol. 10. № 1. P. 61-66.