

**РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ НЕФТИ И ГАЗА
им. И. М. Губкина**

факультет химической технологии и экологии

На правах рукописи

Салеем Кайд Мохаммед Абдулла

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГУМИНОВЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ДЕТОКСИКАЦИИ
И БИОДЕГРАДАЦИИ НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ**

03.00.16 –экология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой
степени кандидата химических наук

Работа выполнена в Российском государственном университете нефти и газа им. И. М. Губкина на кафедре промышленной экологии.

Научный руководитель:

Научный консультант:

Официальные оппоненты:

Ведущая организация:

Защита состоится «__» _____ 2004 г. в ауд. В __ часов на заседании диссертационного совета Д _____ при Российском государственном университете нефти и газа им. И. М. Губкина по адресу: 119991, Москва ГСП – 1, Ленинский проспект, д.65.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Российского государственного университета нефти и газа им. И. М. Губкина.

Автореферат разослан «__» _____ 2003 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

Кандидат технических наук

Иванова Л. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Одним из распространенных последствий производственной деятельности является загрязнение почвенного покрова территорий нефтеуглеводородами и продуктами их переработки. Вопрос борьба с нефтяным загрязнением становится все более актуальным, особенно в России, где долгие годы решение экологических проблем откладывалось на будущее.

Одним из негативных последствий интенсификации нефтедобычи является загрязнение почвенного покрова территорий нефтеуглеводородами. При попадании нефти и нефтепродуктов в почву происходят глубокие и часто необратимые изменения морфологических, физико-химических, микробиологических свойств почвенного покрова, а иногда и существенная перестройка всего почвенного профиля, что приводит к потере загрязненными почвами плодородия. На современном уровне развития нефтедобывающей промышленности исключить ее воздействие на окружающую среду невозможно. В связи с этим возникает необходимость разработки новых и совершенствования существующих технологий восстановления нефтезагрязненных и нарушенных земель.

Одним из перспективных направлений рекультивации загрязненных земель является использование гуминовых веществ (ГВ) или сорбентов на их основе. Эти вещества обладают физиологической активностью по отношению к растениям и некоторым штаммам микроорганизмов, что вызывает стимулирование аборигенной микрофлоры почв. Наличие гидрофобного каркаса в гуминовых веществах определяет их способность связывать нефтяные углеводороды. Этот процесс изменяет формы существования углеводородов в окружающей среде и снижает их токсичность.

Цель работы: изучение влияния гуминовых препаратов на токсичность и эффективность биодegradации нефтяного загрязнения почв.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- выделить и охарактеризовать гуминовых препараты.
- охарактеризовать детоксицирующие свойства гуминовых препаратов по отношению к нефтяному загрязнению почве.
- Изучить химические взаимодействия гуминовых препаратов с нефтяными углеводородами.
- выявить влияние гуминовых веществ на эффективность degradation нефти в присутствии биопрепарат «РОДЕР» в модельных системах.
- выявить влияние гуминовых веществ на токсичность и биодegradацию нефти в загрязненной почве.

Научная новизна.

Практическая значимость работы.

Апробация работы.

Отдельные части работы были представлены на международном семинаре: «Использование гуматов для рекультивации загрязненных сред: от теории к практике», (Звенигород, 2002 г.);

Публикация.

По материалам диссертации опубликовано 2 статьи и двое тезисов докладов.

Структура диссертационной работы. Диссертационная работа состоит из обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы и приложений.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Выбор и характеристика объектов исследования

В работе были использованы следующие гуминовых препаратов: гумат калия из леонардита коммерческий препарат (Powhumus) ПГ; Гумат К/Na из окисленного угля коммерческий препарат “Гумат-80” (Иркутск); гиматомелановые и гуминовые кислоты выделены из Иркутского гумата.

Для проведения исследований были выделены два препарата из Иркутского гумата это - гуминовые кислоты и гиматомелановые (ИГК и ИГМК).

ИГК получали путем подкисления раствора гумата калия HCl до pH 1.4 ИГМК выделяли путем этанольной экстракции из гуминовых кислот согласно методике. Гумат железа ГК-Fe (II) был получен в лаборатории физической органической химии Химфака МГУ им. М.В. Ломоносова.

Выбор препаратов был обусловлен следующими факторами: гумат калия и ИГК - дешевизна и доступность, ИГМК - максимальная гидрофобность, и предположительно, максимальная сорбционная способность по отношению к нефтяным углеводородам, гумат ГК-Fe(II) - потенциальный катализатор окислительно-восстановительных процессов. Твердые препараты ИГМК, ИГК, ИГ и ПГ представляли собой аморфные порошки черного цвета. Исследование растворимости препаратов показало, что ИГ и ПГ растворяются в воде, а ИГМК и ИГК не растворимы в воде, но обладают значительной растворимостью в растворах щелочей. Все гуминовые препараты кроме гумата железа (ГК-Fe²⁺) были охарактеризованы методами элементного анализа и ¹³C ЯМР спектроскопии (табл. 1 и 2) и рис 1.

Содержание С, Н, N определяли на элементном анализаторе Carlo Erba Strumentazione-1106. Содержание кислорода рассчитывали по разности. Зольность исследуемых образцов ГП составила 3.22-28.23%.

Количественные ^{13}C ЯМР спектры регистрировали на ЯМР спектрометре AC 400 Bruker (ФРГ). Содержание углерода различных типов определяли интегрированием соответствующих спектральных областей (м.д.): 220-185 – С кетонных и хинонных групп ($\text{C}_{\text{C=O}}$); 185-165 – С карбоксильных и сложноэфирных групп (C_{COOH}); 165-145 – С ароматических О-замещенного углерода ($\text{C}_{\text{Ar-O}}$); 145-100 – С ароматических фрагментов (C_{Ar}); 100-50 – С О-замещенный алифатический углерод ($\text{C}_{\text{Alk-O}}$); 50-5 – алифатический С–Н-замещенный углерод алкильных групп (C_{Alk}).

Из табл. 1 и 2 видно исследованные препараты различались по элементному составу и структурным характеристикам. Так. Наибольшее содержание углерода и наименьшее кислорода было отмечено для ИГК, затем ИГМК и на оборот для гуматов калии, ИГ и ПГ где содержание кислорода на 7-15 % выше остальных гуминовых препаратов. Содержание углерода у ПГ, составляет 52.11%. На основе элементного содержания ГП рассчитывали атомные соотношения Н/С, О/С, которые являются косвенными характеристиками, соответственно, не насыщенности и окисленности молекул ГП. При этом самые низкие атомные соотношения Н/С (0.75) наблюдались для ИГК, что свидетельствует о максимальном вкладе ненасыщенности фрагментов в их структуру. Наиболее высокие значения соотношения О/С (0.80), характерные для гумата калии ИГ, что свидетельствует о значительном вкладе периферической части в его структуру.

Согласно данным табл. 2, максимальное содержание ароматического углерода в исследуемых гуминовых препаратах было в препарате ПГ (61.1%) и минимальное содержание в препарате ИГМК и ИГ (52.6 и 52.9% соответственно). Содержание углерода алкильных групп выше для ИГМК и ПГ и наименьше количество обнаружено в ИГ особенно С О-замещенный алифатический углерод ($\text{C}_{\text{Alk-O}}$) 5.9 %.

Таблица 1

Элементный состав гуминовых препаратов в расчете на безводную пробу

Гуминовые препараты	Содержание элементов (% масс)				Атомные Соотношения		Зольность, %
	С	Н	N	О	H/C	O/C	
ИГ	46.12	3.59	1.40	48.89	0.93	0.80	28.23
ПГ	52.11	4.58	1.35	41.96	1.05	0.60	26.37
ИГК	58.93	3.69	1.76	35.61	0.75	0.45	3.22
ИГМК	55.73	3.58	1.50	39.19	0.77	0.53	14.03

Таблица 2

Распределение углерода в структуре гуминовых препаратов по данным спектроскопии ЯМР ^{13}C

Гуминовые препараты	Доля углерода в составе фрагментов, %						ΣC_{Ar}	ΣC_{Alk}
	$C_{C=O}$	C_{COOH}	C_{Ar-O}	C_{Ar-H}	C_{Alk-O}	C_{Alk}		
ИГ	5.9	20.6	9.7	43.2	5.9	14.6	52.9	20.5
ПГ	4.9	13.2	11.4	49.7	8.5	15.2	61.1	23.7
ИГК	9.1	13.5	13.4	41.0	9.4	13.6	54.4	23
ИГМК	5.9	14.8	10.4	42.2	12.1	14.5	52.6	26.6

$\Sigma C_{Ar} = C_{Ar-O} + C_{Ar-H}$ – суммарные содержание ароматического углерода;

$\Sigma C_{Alk} = C_{Alk-O} + C_{Alk}$ – суммарные содержание алифатического углерода.

Помимо общего содержания ароматического углерода (ΣC_{Ar}), в качестве ^{13}C ЯМР-дескрипторов ароматичности использовали содержание С- и Н- замещенного ароматического углерода (C_{Ar-H}) и содержание алифатического углерода (ΣC_{Alk}).

Рис.1. ^{13}C ЯМР спектроскопии гуминовых препаратов

Характеристика нефти

Для постановки исследований в качестве экотоксиканта было использована сырая и прогретая нефть. Сырая нефть из западной Сибири – Содержание, % масс: смолы – асфальтены - 8.5–11.0; парафины - 2.9–3.5, сера - 0.10-0.055. Вязкость при 50°C – 3.0-3.3 сПа, плотность при 20°C 0.810–0.860 г/см³, температура затвердевания (– 8°C). Содержание углеводородных газов по фракции на установке АТ-6 в 28.11.2001г: C₂-C₄ 1.67 %масс. Прогретую нефть получали при перегонке сырой нефти в кафедре смазочного масла факультета химической технологии и экологии РГУ нефти и газа им. И.М. Губкина. Нефть перегоняли при температуры 272°C. Такой прием применяют для имитации состарившейся нефти в условиях морского загрязнения [5]. Прогретая нефть определяли ее фракционной состав жидкостным хроматографическим методам – Содержание, % масс: парафино-нафтеновые углеводороды 52.7 %, моноциклические ароматические углеводороды 12.5 %, бициклические ароматические углеводороды 8 %, полициклические ароматические углеводороды 11.5 %, смолы 5.2 % и асфальтены 10.2 %.

Фракционный состав сырой и прогретой нефти определяли гравиметрическим методам (метод мини колоночной хроматографии). Содержание фракции в сырой нефти: парафиновая фракции (гексановя фракция) 52.85%, ароматическая фракция (бензолная фракция) 12.00%, тяжелая фракция (спиртбензолная фракция) 5.2%, в прогретой нефти парафиновая фракция 61%, ароматическая фракция 14.3%, тяжелая фракция 5.9%. Обе нефти использовали для создания модельного загрязнениящего песчаного грунта. Чем отличаются ?

В качестве натурального загрязняющего объекта использовали нефтезагрязненной почвы с месторождения Беледжари (Азербайджан).

Нефтяное загрязнение пяти- восьмилетней давности имело концентрацию углеводородов - 180 г/кг и рН 6.5. Также использовали слабозагрязненную почву имела содержания углеводородов 2г/кг и рН 7.0. В одном из вариантов опыта, часть высокозагрязненной почвы была разбавлена песком до концентрации 30 г/кг.

Исследование детоксицирующей способности гуминовых препаратов по отношению к нефтяному загрязнению почв

Оценка токсичности сырой и прогретой нефти

Для построения шкалы токсичности нефти проводили вегетационный эксперимент с использованием в качестве тест-объекта растений пшеницы. Эксперимент проводили на сырой и прогретой нефти. Нефть вносили в дозах, соответствует от слабого до умеренного уровня загрязнения: 1.7, 3.3, 16.7, 33.3, 50, 66.7 г/кг песка. В качестве модельного грунта использовали кварцевый песок (рН 6.8). Опыт проводили в четырех повторностях и чистый песок без нефти (контроль) 10 повторности, всего число кювет 58. после внесения нефти тщательно перемешивали с песком (300г) в экспериментальных кюветах. В подготовленный загрязненный грунт раскладывали семена пшеницы (20 штук на кювету).

Длительность эксперимента составляла 30 дней при температуре 23-27⁰С с естественным освещением. Полив осуществление дистиллированной водой каждый день. В качестве тест-отклика измеряли длину растения и сухую биомассу.

Полученные результаты приведены на Рис.1.

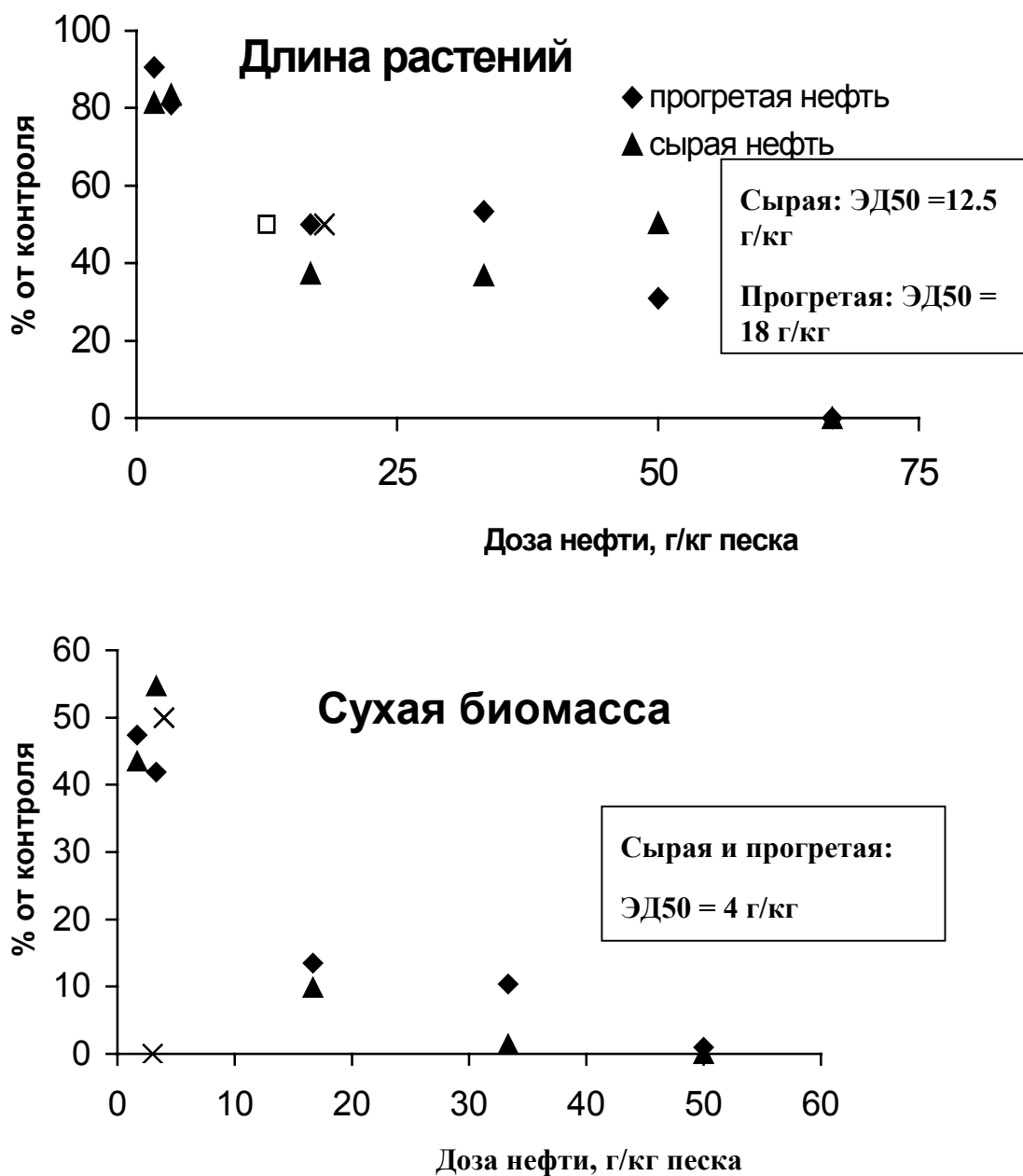


Рис.1. Определение эффективной дозы нефти (ЭД50) при длине и сухой массе.

На основании полученных результатов определяли эффективную дозу нефти (ЭД 50), вызывающую 50%-ное снижение тест-отклика. На рисунке показано зависимость, среднюю массу растений с дозой нефти мы наблюдаем неразличимость между двумя нефтями так как процесс прошел в долговременном периоде и вредная часть сырой нефти (легкие фракции) испарились. Но мы можно замечать не большой разницы по длине растения,

где (ЭД 50) для сырой нефти составила 12.5 г / кг песка, а прогретой нефти – 18 г / кг песка, поэтому в дальнейших экспериментах служила длина растений в качестве тест-отклика.

Дальнейшие эксперименты по детоксицирующей способности гуминовых препаратов проводили при дозах внесения нефти 1.2-1.8 г на 100 г песка.

Обоснование выбора гуминовых препаратов

Для количественной оценки эффекта детоксикации определяли токсичности нефти в присутствии и отсутствие ГП, а также оценивали собственный эффект гуминовых препаратов на рост растений контроля, содержащая нефть ставили дополнительная контроль без нефти с гуминовыми препаратами.

Эксперименты по нефтяного загрязнения гуминовыми препаратами проводили методом биотестирования с описанных выше условиях. В качестве ГП использовали ПГ, ИГМК и ИГ в дозах внесения 0.01 и 0.1 % масс. В качестве загрязняющего агента использовали прогретую нефть, которую вносили в дозе 1 % масс песка. Нефть с песком тщательно перемешивали, на следующей день вносили по 25 мл раствора гуминовых препаратов в концентрации 2 и 20 г/л, кювете, еще раз тщательно помещали после добавления по 25 мл воды.

Полученные результаты приведены в рис.2.

На токсичности влияние гуматов можно увидеть на рис. 2 (А), что с меньшей дозой внесении (0.01%масс) гуминовых препаратов, токсичность нефти уменьшается по сравнению с большей дозы внесения (0.1%масс), особенно с препаратом ИГМК и ПГ где среднее значение (отклик в % от контроля), где составили 43 % (11.4 см), 54 % (14.3 см) и 65% (17.2 см), для ИГ, ПГ и ИГМК соответственно. Где контроль с нефтью составил 45% (длина растения 12 см). Из рисунки 2 (Б) показано влияние ГП на рост растений в отсутствии нефти. Видно, что ИГМК наилучше действует на рост

(длина) растения по отношению к контролю, где средняя длина растения составила 111% (29.5 см) для дозы ИГМК 0.01% масс, а для ПГ средняя длина составила 95% (25.3 см) для той же дозы и 98 % (26 см) для препарата ИГ. При больших дозах ГП 0.1% масс, результаты полученные были хуже, т.е. ГП не дали ни какого положительного эффекта, а на аборт ГП угнетают рост растений для всех ГП где, составили 72, 77, 84% для ИГ, ПГ, ИГМК соответственно.

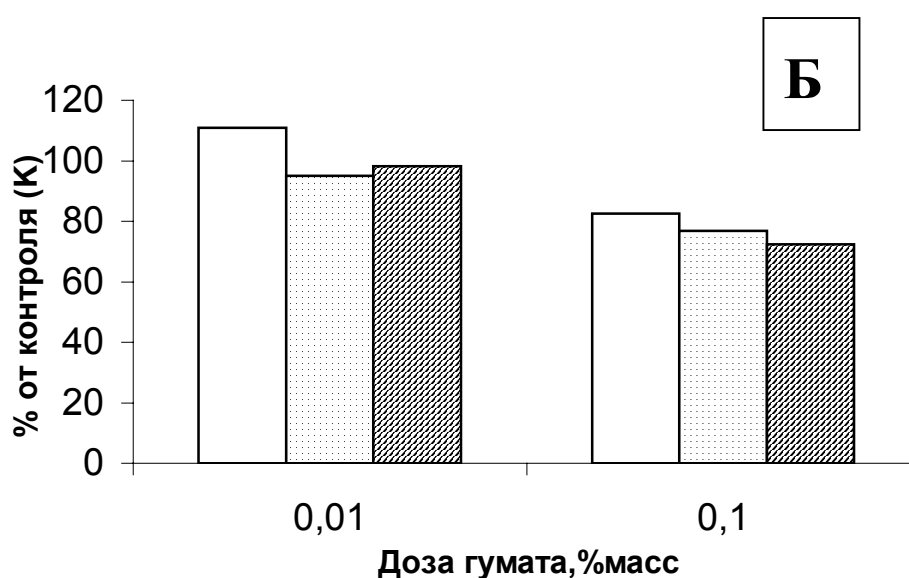
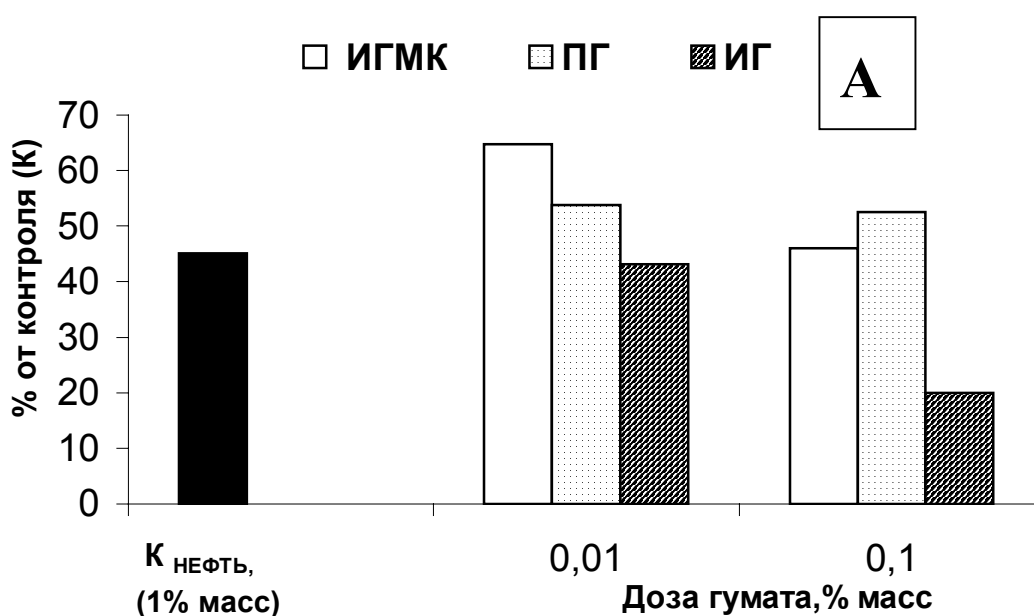


Рис. 2 . Рис. 3. Влияние гуминовых препаратов на (А)токсичность нефти, (Б) удобрительный эффект.

Диаграмма показывающей удобрительный эффект ГП

Токсический эффект нефти ($T_{ЭТ}$) оценивали как относительное уменьшение тест-отклика в присутствии нефти ($R_{ЭТ}$) по сравнению с тест-откликом в контроле (R_0):

$$T_{ЭТ} = \frac{R_0 - R_{ЭТ}}{R_0} \times 100 \% \quad (1)$$

Так как изменение уровня токсичности нефти в присутствии гуминовых препаратов может быть обусловлено их собственным воздействием на тест-пшеницы, то соответствующий токсический эффект ($T_{ГП+ЭТ}$) рассчитывали с использованием в качестве контроля тест-отклика в присутствии гуминовых препаратов ($R_{ГП}$):

$$T_{ГП+ЭТ} = \frac{R_{ГП} - R_{ГП+ЭТ}}{R_{ГП}} \quad (2)$$

Детоксицирующую способность (D) гуминовых препаратов оценивали как относительное уменьшение токсического эффекта нефти в присутствии гуминовых препаратов по сравнению с исходным токсическим эффектом нефти:

$$D = \frac{T_{ЭТ} - T_{ГП+ЭТ}}{T_{ЭТ}} \quad (3)$$

В связи с выше сказанным, коэффициент D рассчитывали через величины соответствующих тест-откликов с помощью следующего уравнения:

$$D = \left(1 - \frac{R_{ГП} - R_{ГП+ЭТ}}{R_{ГП}} / \frac{R_0 - R_{ЭТ}}{R_0} \right) \times 100\% \quad (4)$$

Такой способ расчета позволяет оценить величину детоксицирующего эффекта, вызываемого уменьшением концентрации токсиканта, на фоне собственного воздействия гуминовых препаратов на тест-объект. Т.е.

значение коэффициента D зависит только от связывающей способности ГП по отношению к нефти.

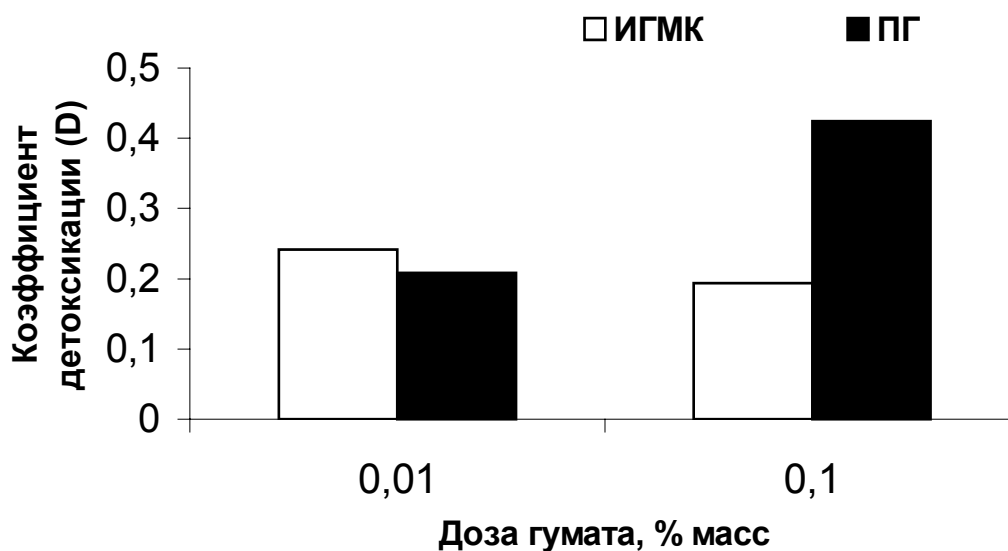


Рис. 4 Детоксицирующая способность гуминовых препаратов при различных дозах их внесения

Как видно из рисунки 3 эффект детоксикации наблюдался для двух гуминовых препаратов - ИГМК и ПГ, тогда как для ИГ детоксицирующего влияния не наблюдалось. ГП (ИГМК и ПГ) обладают детоксицирующей способностью к нефтяными углеводородами, где - уровень детоксикации составил до 43% это значение наблюдалось при ПГ в дозе 0.1%масс и уровень детоксикации до 25% при ГМК в меньших дозах 0.01%масс.

Изучение химического взаимодействия гуминовых препаратов с нефтяными углеводородами

Для изучения химического взаимодействия гуминовых препаратов с нефтяными углеводородами использовали модельную систему песок-нефть-вода и гуминовые препараты. В качестве ГП использовали ИГ, ПГ, ИГМК и ИГК, концентрация гуминовых препаратов лежала в диапазоне 0.02-10 г/л. Доза нефти составляла 30 г/кг песка. Нефть вносили шприцом 10 мл на 300 г песка, затем помещали тщательно. Нефтезагрязненная почва распределили по 10 г в колбах, добавили раствор гуматов с дистиллированной водой в количестве 50 мл и в течение 12 часов помещали при помощи мешалки.

Полученный раствор экстрагировали гексаном по 10 мл. дважды. Экстракт сушили на роторе и весах взвесили остаток. Результаты взаимодействия ГП с нефтяными углеводородами изложено в рис. 5.

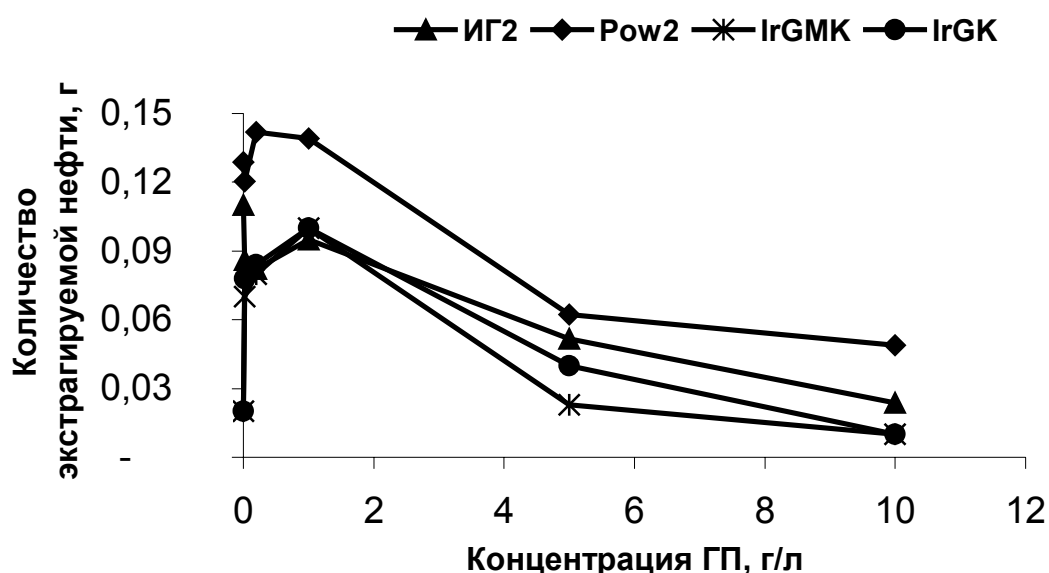


Рис. 5 Типичные графики указанной зависимости для исследованных гуминовых препаратов приведены.

Как видно из рисунки, растворимость нефти в воде возрастает до 0,1 г с увеличением концентрации ГП до одного грамма на литр (1 г/л), затем понижается до 0,01 г при концентрации 10 г/л. Это видно для ИГМК и ИГК. относительно ИГ он типичен, хотя максимальная растворимость не превышает 0,07 г. Другой порядок взаимодействия паухумус (ПГ) с нефтью, растворимость намного ниже, чем ИГМК и ИГК, но растворимость увеличивается с увеличением концентрации Pow до 5 г/л и остается почти постоянно. Результаты показывают перспективность растворов ГП при концентрации 1г/л. Результаты по влиянию гуминовых препаратов на растворимости нефти в воде объясняет результаты по детоксицирующей способностью ГП.

Препарат ИГМК, ИГК обладают максимальной связывающей способностью (т.е. максимальная растворимость нефти в воде) при низкой

концентрации ГП. И детоксицирующая способность этих ГП именно ИГМК наблюдали в пределах такой концентрации ГП, где детоксицирующая способность других препаратов не наблюдалось. Для препарата *III* детоксицирующая способность наблюдали исключительно при большой концентрации 20 г/л (0.1%масс) и связывающая способность при высокой (5 г/л), концентрации наблюдали для самого препарата.

Влияние гуминовых веществ на фракции нефти водорастворимой части

Изучения фракционного состав нефти в водорастворимой части проводили методом жидкостной хроматографии. В качестве загрязнитель использовали прогретой нефти до 272°C в дозе 30 г/кг песка. В качестве ГП использовали гуминовые препараты ИГ, *III*, ИГМК и ИГК в концентрациях 0.02-10 г/л.

Данный хроматографический метод обеспечивает разделение пробы на 6 групп:

Парафино-нафтеновые углеводороды; моноциклические ароматические углеводороды; бициклические ароматические углеводороды; полициклические ароматические углеводороды; смолы; асфальтены;

Для всех препаратов не было обнаружено влияния гуминовых веществ на фракционный состав нефти. Рис. 3 показывает фракционный состав нефти в присутствии ИГМК как пример.

Из рисунки мы не наблюдаем, что гуминовые препараты не влияет фракции при всех концентрации ГП и только замечаем, что отношение содержание нефтяных углеводородов в присутствии гуминовых препаратов $S_{ext.}$ (экстракта) по содержанию нефтяных углеводородов в отсутствие ГП $S_{aq.}$ (водорастворимых) $S_{ext.}/S_{aq.}+1$ не значительно увеличивается от 1 до 2.50 как максимальное влияние.

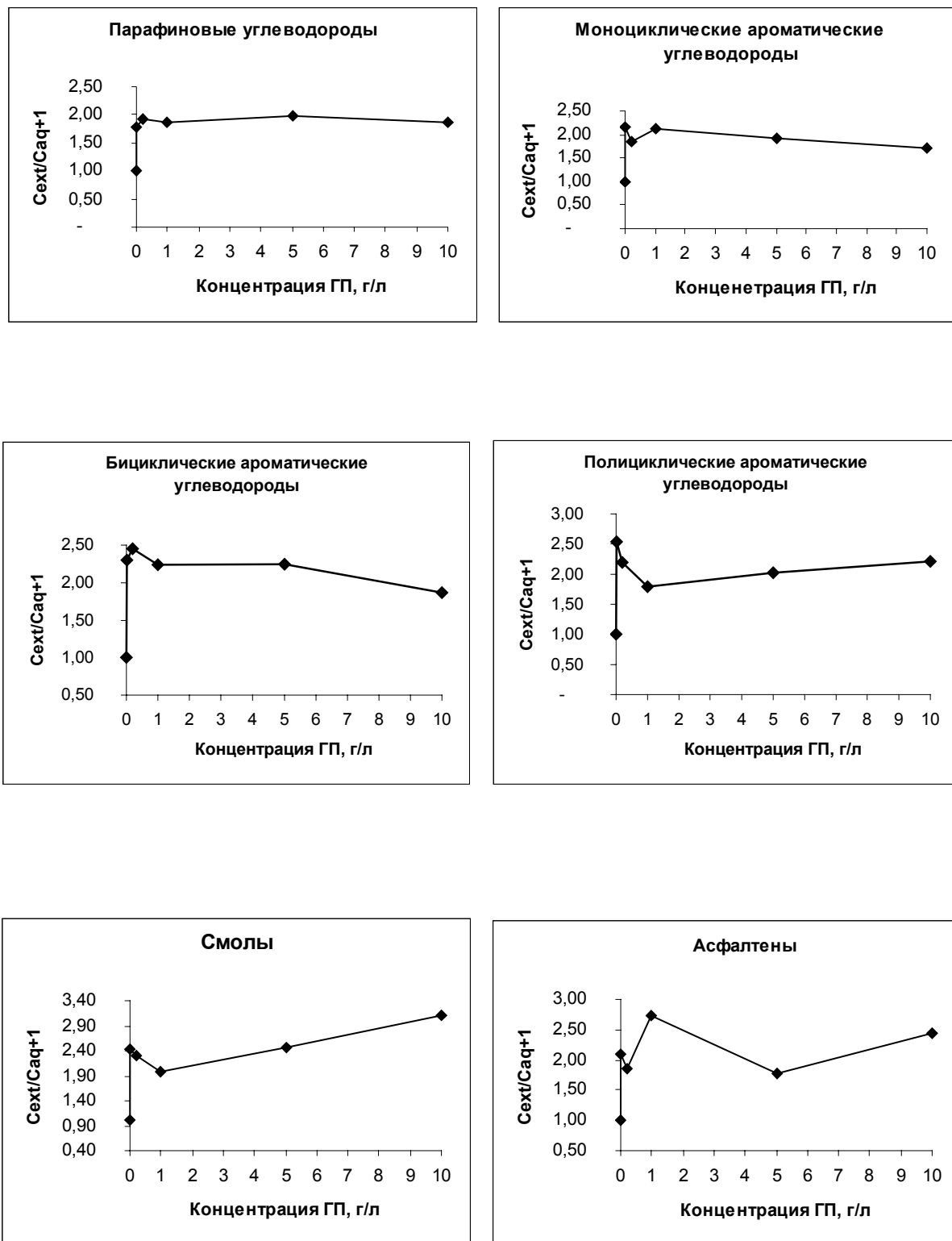
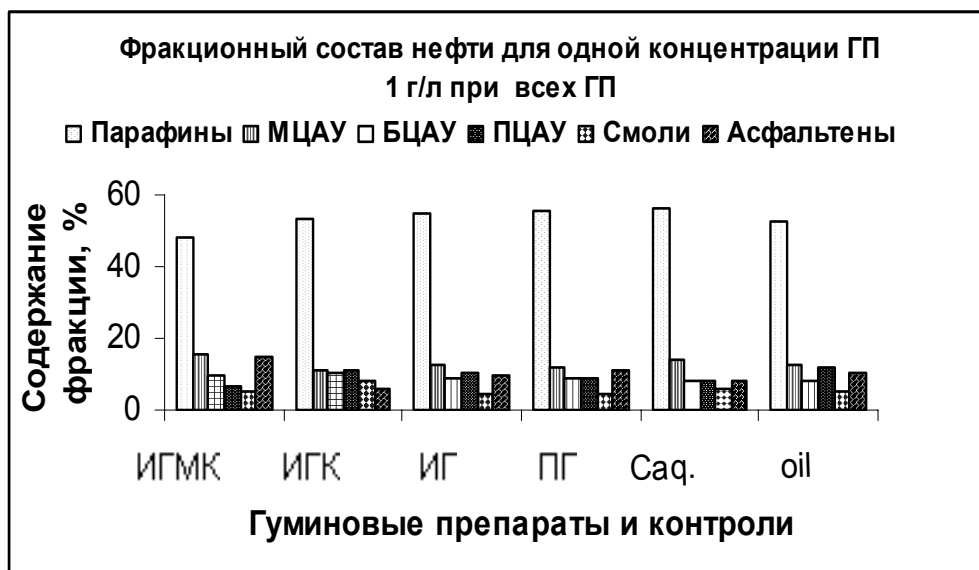
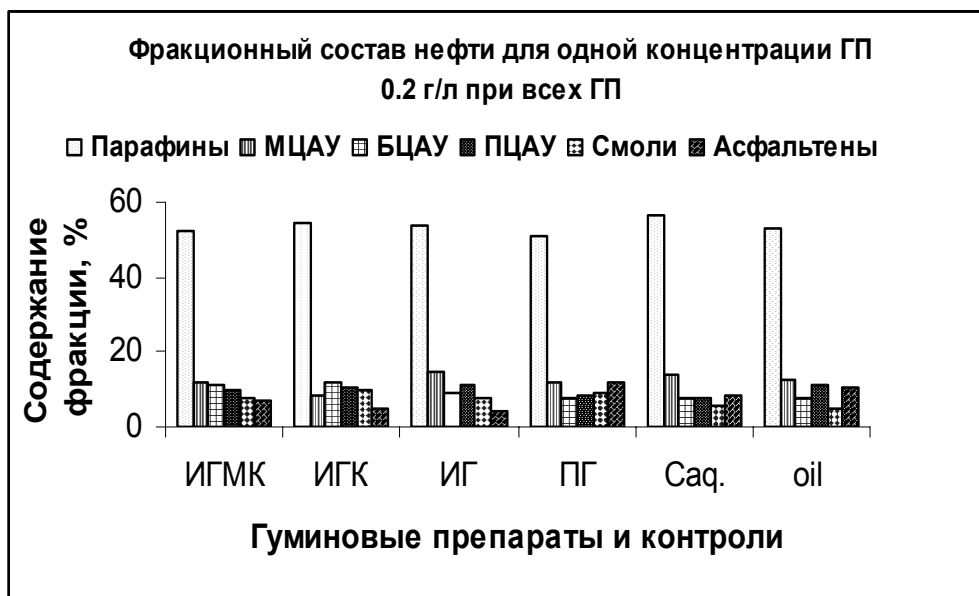
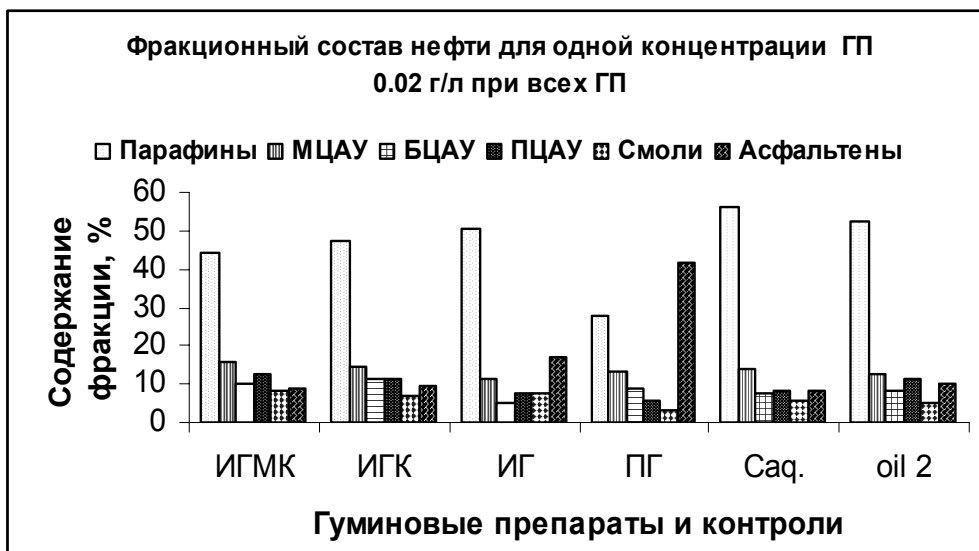


Рис.6. Фракционный состав нефти в присутствии ИГМК



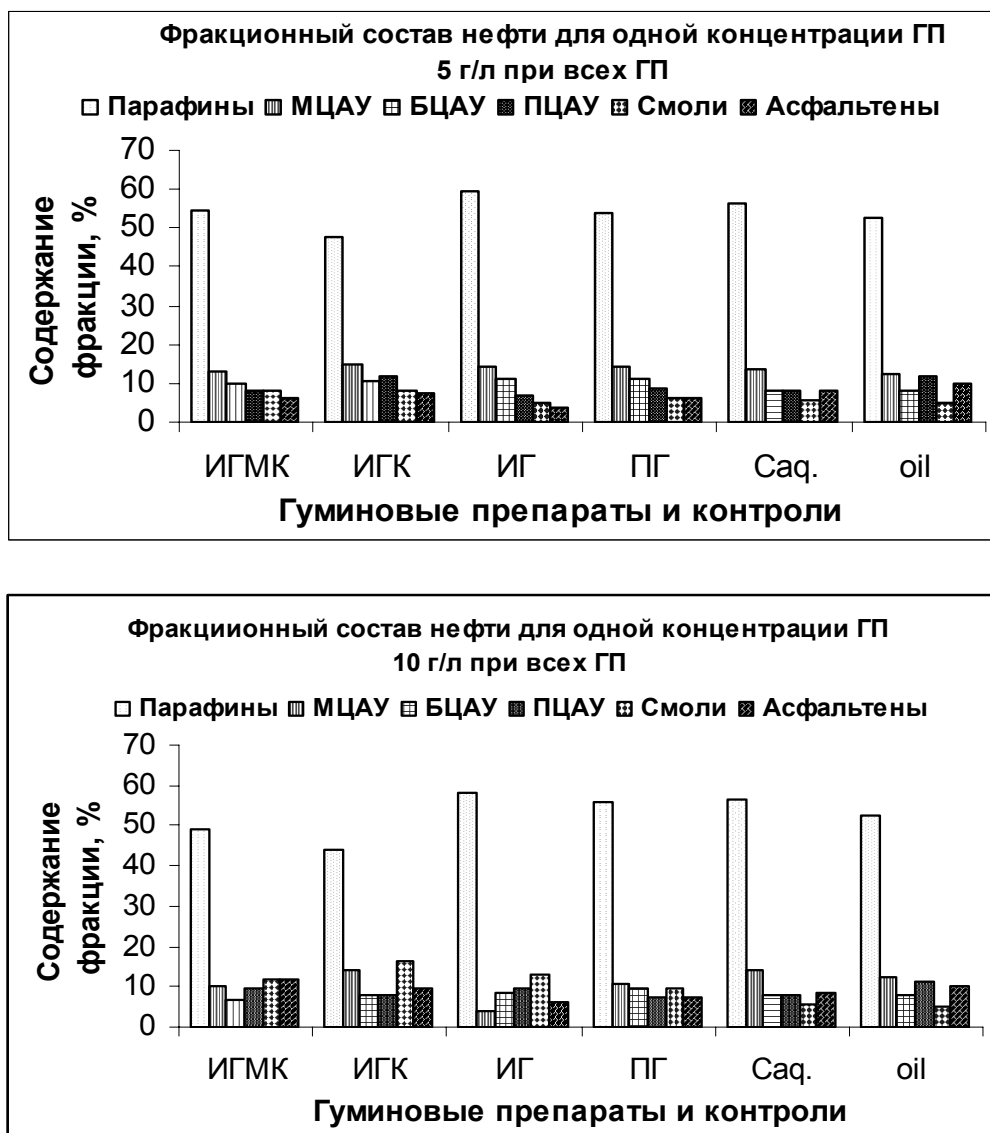


Рис. 7 диаграммы показывают фракционирования нефти для каждой концентрации ГП.

МЦАУ – многоциклические ароматические углеводороды.

БЦАУ – бициклические ароматические углеводороды.

ПЦАУ – полициклические ароматические углеводороды.

Влияние гуминовых препаратов на деградацию нефти биопрепаратом «родер»

В качестве микроорганизмов–деструкторов нефти был использован биопрепарат «Родер».

Для проведения экспериментов по исследованию влияния ГВ на деградацию нефти в почве в присутствии биопрепарата «Родер» было

использовано четыре гуминовых препарата- ИГ, ИГМК, ИГК, ГК-Fe (II) в дозах 0.001, 0.01 и 0.1%масс. Согласно литературным данным [1, 2, 3], ГВ вносимые в почвы в присутствии нефтяного загрязнения в диапазоне концентраций от 0.1 до 0.8 г/л обладают стимулирующим эффектом для аборигенной микрофлоры, в диапазоне от 1 до 9 г/л ГВ используют в качестве удобрений, а в диапазоне концентраций от 10-60 г/л – в качестве сорбентов. В качестве модельного субстрата использовали кварцевый песок, загрязненный прогретой нефтью до 272⁰С согласно [4] в концентрации 4.2 % масс (42 г/кг песка), моделировала застарелое загрязнение.

В процессе модельного эксперимента контролировали общее содержание нефти и контролировали содержание нефтяных углеводородов по фракциям. Длительность эксперимента составляла 2 месяца с периодом отбора проб две недели

Этот анализ проводился для того, чтобы выявить те гуминовые вещества, которые благоприятно действуют на деградацию нефти в модельном грунте микроорганизмами. Анализ проводили методом гравиметрии на аппаратах сокслетов.

Уровень деградации (степень очистки) - оценивали по убыли углеводородов в динамике, принимая исходное количество загрязняющего агента за 100%. Если обозначали для разложения нефти (уровня деградации) (X), то можно писать формулу расчета:

$$X = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100 \% \quad (5)$$

где X– разложение нефти, %.

C_0 – содержание нефти в начале эксперимента, г/кг почвы

C – содержание нефти в конце эксперимента, - через 8 недель, г/кг почвы

Результаты влияния ГП на общее содержание нефти в модельных системах представлены на рис. 8. Как видно из представленных данных,

наиболее явно выраженный положительный эффект оказывает на деградацию нефти ИГМК в концентрации 0.1% масс, деградация нефти в этом варианте составляет 23%, а в случае с и ГК-Fe²⁺ 0.001%масс 21.4% , тогда как степень разложения нефтяного загрязнения в варианте с положительным контролем (без гуминовых веществ) составила лишь 20 %.

Более наглядно увидеть динамику разложения нефти микроорганизмами биопрепарат «Родер» помогает рисунки 9. Из рисунки видно, что во всех вариантах опыта наблюдается лишь благоприятное воздействие ГП на биodeградацию углеводородных ксенобиотиков, степень разложения отличается на 1-2 %. В варианте опыта с отрицательным контролем деструкции нефти, на протяжении всего эксперимента, не произошло. Самый низкий уровень деградации нефти показал опыт с присутствием гиматомелановой кислоты в концентрации 0.001%масс, степень деградации составила всего 16.7 %.

Результаты из приведенных данных, в выбранных условиях эксперимента микроорганизмы биопрепарата «Родер» деградировали прогретую нефть на 20 %. Внесение ГП незначительно влияло на степень биodeградации. Так, наибольший эффект наблюдался в первых двух неделях после этого не каких действия от препаратов не было видно как на рис. по сравнению с положительным контролем (К+).

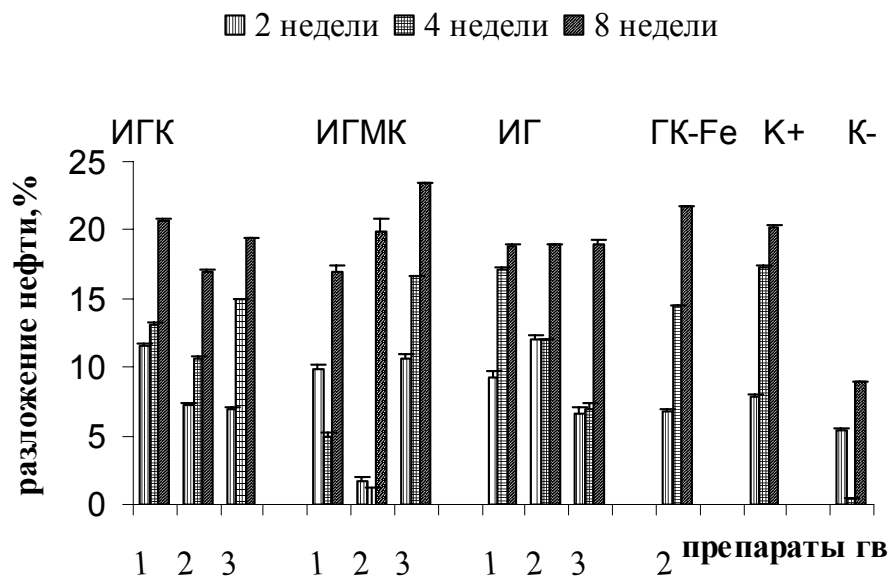


Рис 8. Разложение нефти в почве в присутствии препаратов ГВ для трех точек. (1, 2, 3 - концентрация препаратов ГВ 0,001,0,01,0,1 соответственно).

В целях выявления влияния различных гуминовых биостимуляторов на разложение тяжелой полициклической, алифатической, ароматической фракций нефти в динамике, проводили фракционным экспресс анализом нефтяного загрязнения методом мини колоночной хроматографии. Как известно, используемый нами биопрепарат «Родер» состоит из микроорганизмов, которые в первую очередь окисляют алифатические фракции нефти. Но, как было выявлено, в присутствии гуминовых веществ они (микроорганизмы) ведут себя по-другому.

Результаты ГП на разложение тяжелой фракции, где наибольший эффект (степень разложения) гуминовых препаратов в табл. Из таблицы видно, что в первую очередь микроорганизмами окисляется тяжелая (степень разложения 20-32%) фракция. На остальные фракции не наблюдалось не каких положительных эффектов по сравнению с контролем, хотя степень разложения ароматической фракции для препарата ИГК 0.01%масс составил 20% и 11% для препарата ИГМК 0.1%масс.

Влияние ГВ на разложение тяжелой фракции нефтяного загрязнения углеводородокисляющими бактериями препарата (Родер) (содержание фракций для первого дня 10.89 %).

Препараты	Содержание тяжелой фракции, %				Разложение фракции, %
	2 недели	4 недели	6 недели	8 недели	
ИГК 0.001	9.2 ± 0.3	9.4 ± 0.3	6.9 ± 0.3	10.8 ± 0.3	0.8
ИГК 0.01	9.6 ± 0.3	9.4 ± 0.3	8.9 ± 0.4	7.6 ± 0.4	30.2
ИГК 0.1	8.9 ± 0.3	11.9 ± 0.4	7.8 ± 0.1	7.8 ± 0.1	28.4
ИГМК 0.001	11.3 ± 0.8	9.7 ± 0.1	8.1 ± 1.1	7.4 ± 1.1	32.0
ИГМК 0.01	9.7 ± 0.1	9.6 ± 1.1	8.2 ± 0.1	8.1 ± 0.1	25.6
ИГМК 0.1	9.2 ± 0.4	11.7 ± 0.1	7.7 ± 1.1	8.0 ± 1.1	26.5
ИГ 0.001	9.6 ± 0.6	10.4 ± 1.1	8.6 ± 0.5	8.7 ± 0.5	20.1
ИГ 0.01	9.0 ± 0.5	10.7 ± 0.5	7.6 ± 0.1	9.5 ± 0.1	12.8
ИГ 0.1	12.2 ± 0.5	9.2 ± 0.1	8.8 ± 0.3	9.3 ± 0.3	14.6
ГКFe ²⁺ 0.01	9.1 ± 0.4	9.0 ± 0.3	7.7 ± 0.1	9.5 ± 0.1	12.8
К+	9.1 ± 1.6	9.2 ± 0.1	7.7 ± 0.7	9.8 ± 0.7	10
К-	9.8 ± 0.9	10.9 ± 0.8	8.0 ± 0.5	10.9 ± 0.5	0

Исследование влияние ГП на токсичность и биodeградацию нефти в загрязненной почве

В ходе эксперимента контролировали изменение количественного содержания нефти в опытных образцах почвы. Этот анализ проводился гравиметрическим методом для того, чтобы выявить те гуминовые вещества, которые, благоприятно действуют на деградацию нефти в загрязненной почве микроорганизмами, микрофлорами и в отсутствие их.

В качестве модели почвы в лабораторном эксперименте использовали почву, загрязненную аварийно разлитой нефтью, отобранную в Республике Азербайджан, месторождение Беледжари-Азербайджан, содержание нефтеуглеводородов в ней до 180 г/кг, рН почва 6.5.

Для проведения экспериментов по исследованию влияния ГВ на деградацию нефти в загрязненной почве в присутствии и отсутствие биопрепарата «Родер» и удобрении было использовано два гуминовых препаратов ИГМК и ПГ (ПГ, которые дали наилучший результат при проведении модельных экспериментов гуминовые препараты в концентрации 0.01 % масс) вносили их в виде раствора в начале эксперимента перед интродукцией биопрепарата и удобрений.

В эксперименте применяли биопрепарат Родер, состоящий из двух штаммов родококков (*Rhodococcus ruber* Ac-1513D, *Rhodococcus erythropolis* Ac-1514D) Клетки штаммов, предварительно выращивали в жидкой богатой по составу среде, г/л:

панкреатический гидролизат рыбной муки – 20, глюкоза –20, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 1.9, KH_2PO_4 –0.5, NH_4Cl – 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ –0.1, Na_2CO_3 – 0.05, CaCl_2 – 0.005, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ –0.005, NaCl –5.0, pH 6.9 – 7.0.

Концентрация активных нефтеокисляющих клеток у каждого штамма была не менее 1×10^9 кл/мл концентрата.

Удобрения и биопрепарат Родер вносили трижды (раз в две недели).

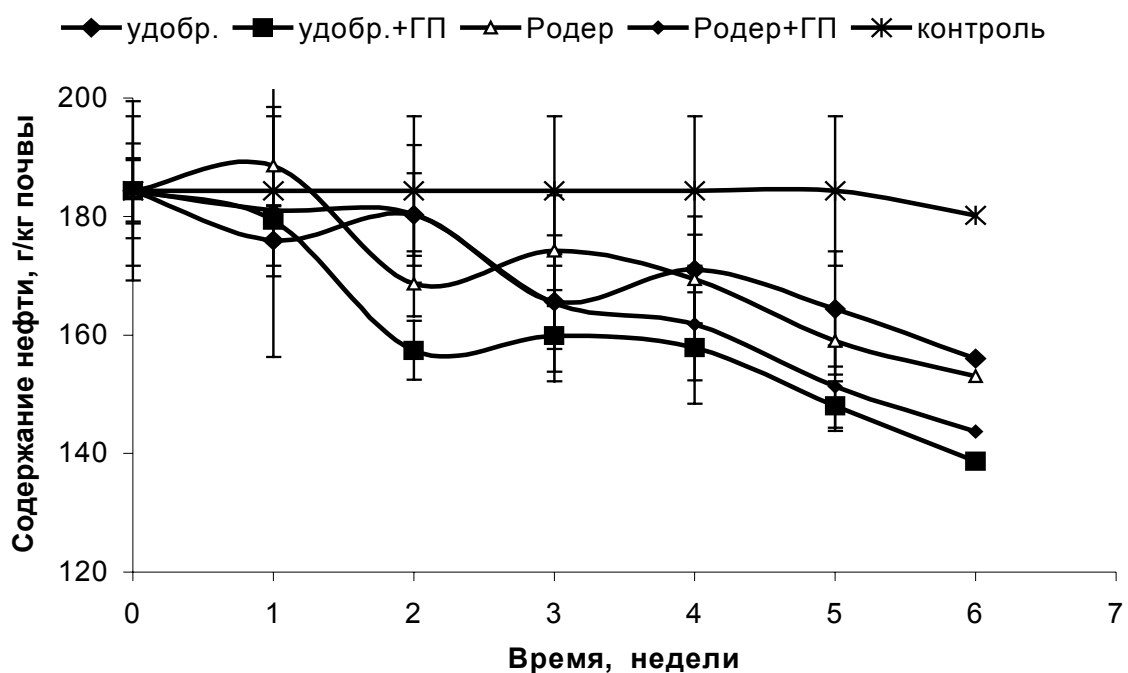
Исследование проводили на сильнозагрязненной почве (содержание нефти 180 г/кг почва) и на почве при рабочей концентрации нефти - на основании диапазонов токсичности и составила 30 г/кг почва (т.е. 3% масс). Концентрация 30 г/кг почва получили путем разбавления сильнозагрязненной почвы 6-кратным объемом песка, т.е. в шесть раз понизили концентрации разбавленным песком до 30 г/кг.

Длительность эксперимента составляла 45 дней с периодом отбора проб на содержании нефти один раз в недели.

Результаты эксперимента представлены на рис. и рис. Как видно из представленных данных, Наиболее явно выраженный положительный эффект на деградацию нефти при высоких содержаниях нефти в почве (180г/кг) оказывают гуминовые вещества (ГП) с аборигенной микрофлорой

(удобрение) степень деградации составил 26.4% т.е содержание нефтяных углеводородов понизились от 184 до 138.7г/кг почвы по сравнению с контролем, а в случае удобрения без гуминовых веществ деградации составляет всего 15%. Гуминовое вещество с микроорганизмами «родер» разлагают нефтяных углеводородов в степени 22.3%, тогда как степень разложения нефтяного загрязнения в варианте с микроорганизмами «родер» (без гуминовых веществ) составила лишь 17%. Из результатов *Powhumus* оказывает положительное влияние на разложении нефти при высоких содержаниях нефти в почве.

При низких содержаниях нефти в почве 30 г/кг почвы, гуминовые вещества не показали не каких действия на разложении нефти в почве по сравнению с микроорганизмами или микрофлорами см. рис. 9 степень разложения нефти в присутствии и отсутствии ГП составляет 34%. Это разложение можно сказать в результате окисления бактерии нефтяными углеводородами и микрофлорой.



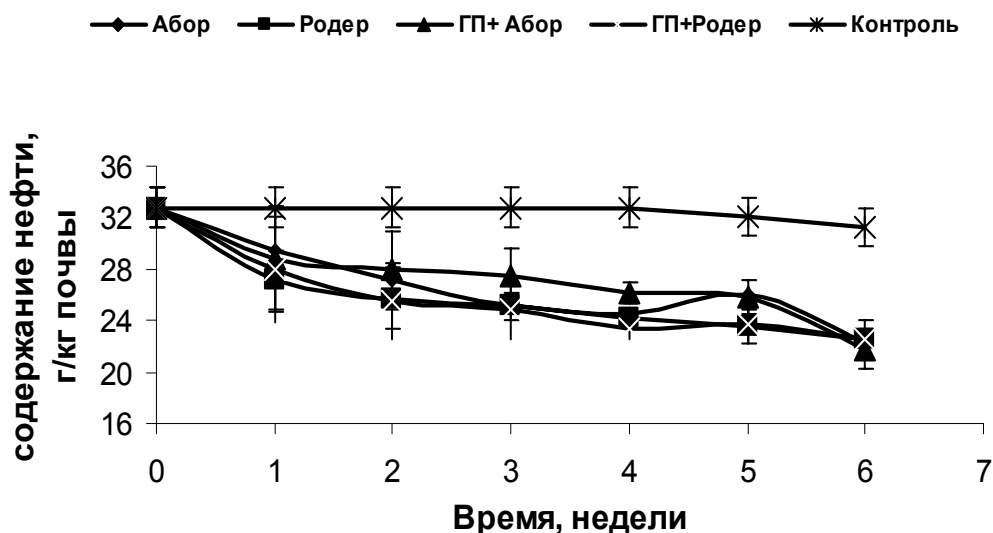


Рис. 9 Влияние ГП на биодegradацию нефти в высокозагрязненной почве (180 г/кг) и при низкозагрязненной почве (30 г/кг)

Одновременно определили изменение численности микроорганизмов в нефтезагрязненной почве. Биологическая активность загрязненной почвы характеризовался следующий параметр: углеводород окисляющих бактерий (УВО) $1,0 \times 10^5$ кл/г. Полученные данные см. рис.10 показывают, что в почве, сильно загрязненной нефтью, присутствует много аборигенных углеводород окисляющих микроорганизмов ($1,0 \times 10^5$ кл/г), присутствуют и, следовательно, там идут активные процессы естественной санации. В чистой почве и в загрязненной нефтью почве, разбавленной чистым кварцевым песком, также содержатся те же группы микроорганизмов в среднем на один порядок отличающиеся по численности от сильно загрязненной почвы.

+ МИКРОБИОЛОГИЯ

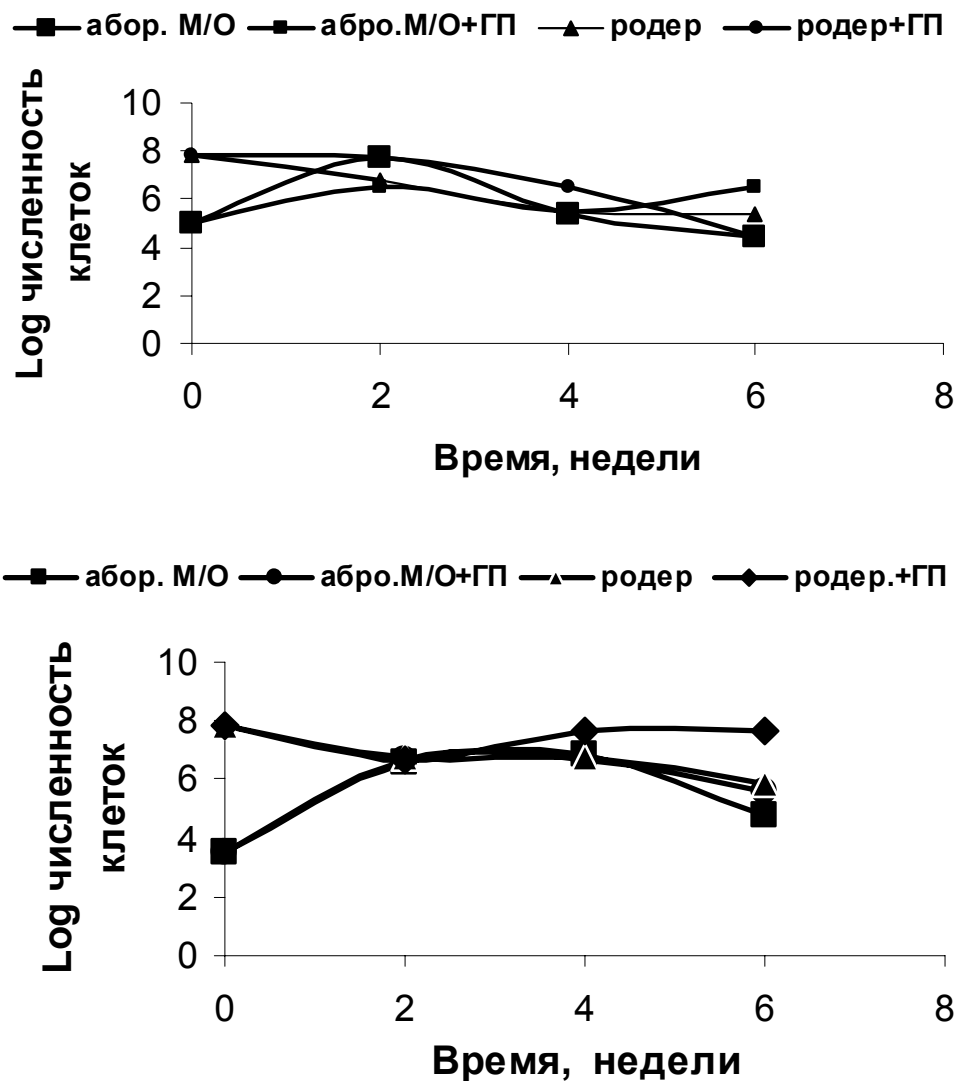


Рис. 10 Типичные кривые численность углеводородокисляющих бактерии для нефтзагрязненной почвы 180 г/кг и 30 г/кг почвы

Список цитируемой литературы

1. Глебова Г.И.//Гиматомелановые кислоты и их место в системе гумусовых веществ// автореферат на диссертацию.,МГУ.,1980 г.,23 с.
2. Данченко Н.Н., Перминова И.В., Гармаш А.В., Кудрявцев А.В.//Вестник МГУ. Сер. 2.. Химия. 1998. Т. 39. № 2. С. 127-131.
- 3.Левинский Б.В.,Калабин Г.А.// Гуматы из Иркутска и их эффективность//Химия в сельском хозяйстве,1997 г.,30-32 с.
- 4.Другов Ю.С., Родин А.А. Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов, С-Пб,2000 г.

5. Мурыгина В.П., М.У. Аринбасаров, А.Н. Шкидченко, Н.П. Кузьмин, А.М. Боронин Микробиологическая очистка грунтов от застарелого нефтяного загрязнения на территории Западной Сибири. 2000г Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино.

Выводы

1. гуминовые препараты выделенные из препарата гумата калия (ИГ) т.е. ИГК и ИГМК, характеризовались наибольшим содержанием углерода, а гуматы калия ИГ и ПГ наибольшим содержанием кислорода.
2. Методом биотестирования показано, что гуминовые препараты обладают детоксицирующей детоксикации способностью по отношению к нефтяным углеводородам. При этом уровень в порядке 43 % Показано, что в ряду исследованных препаратов максимальной детоксицирующей способностью обладают ПГ и ИГМК.
3. Для детоксикации нецелесообразно использование концентрированных растворов гуматов.
4. Полученные результаты показывают большую перспективность растворов гуматов с концентрацией 1 г/л по сравнению с концентрацией 10 г/л, в целях промывания нефтезагрязненных горизонтов.
5. Установлено, что гуминовые препараты оказывают благоприятное влияние на биodeградацию нефти как аборигенной микрофлорой, так и специализированными бактериями-нефтедеструкторами (Родер): для аборигенной микрофлоры содержание нефти снижалось на 25%, а для биопрепарата Родер – на 30%. Максимальной стимулирующей активностью обладали препараты Powhumus и ИГМК. на фракционном составе наблюдалось влияние ГМК на тяжелой фракций где уровень деградации составил до 33%. На остальных фракции, деградации не наблюдалось. ПГ как сказано положительно влияют на

аборигенной микрофлоры и Родер на активности микробиологии при высокозагрязненной почве.

Список работ

1. использование гуминовых препаратов при биорекультивации нефтезагрязненных почв . Салеем Каид М., Перминова И.В.*., Гречищева Н.Ю., Муригина В.П., Мещеряков С.В.
(Российский государственный университет нефти и газа им. И.М. Губкина, *Московский государственный университет).
2. Изучение детоксифицирующей способности ГП по отношению к нефтяному загрязнению почв. Салеем Каид М., Перминова И.В., Гречищева Н.Ю., Мещеряков С.В.
3. Saleem K.M., Mikailov G.G., Murygina V.P., Perminova I.V., Grechicheva N.U., Mecherikov S.V.. Influence of humates on degradation of oil by oil-oxidizing microorganisms.
4. Saleem K.M., Perminova I.V., Grechicheva N.U., Murygina V.P., Mecherikov S.V. Application of humic substances for biological remediation of oil polluted soil. Abstract book. Use of humates to remediate polluted environments: From theory to practice, September 23-29, 2002, Zvenigorod, Russia.