

МУНИЦИПАЛЬНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
ДЕТСКИЙ ЭКОЛОГО-БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР

Ряска (*Letna*) как фиторемедиатор нефтезагрязненных вод

Автор работы:

Крюкова Алёна

Уч-ся 11А «Роснефть-класса»

МОУ «СОШ №4»

Руководитель:

Сизова Любовь Николаевна

Педагог дополнительного образования

МОУДО «ДЭБЦ»

Консультант:

Барановская Анна Юрьевна

Аспирант отделения геологии, ТПУ;

специалист 2ой категории

отдела по обращению с отходами

управления по охране окружающей среды

АО «Томскнефть» ВНК

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
1. Обзор литературы	4
1.1. Биологическое описание ряски рода <i>Lemna</i>	4
1.2. Ряска как фиторемедиатор различных поллютантов в водной среде	4
1.3. Загрязнение водоемов нефтью и нефтепродуктами и методы их очистки	5
1.4. Характеристика исследуемых загрязнителей	6
2. Материалы и методика исследования	8
2.1. Методика отбора воды и ряски для исследования	8
2.2. Методика культивирования ряски для исследования	8
2.3. Методика проведения исследования и приготовления экспериментальной среды	9
3. Результаты исследования	11
3.1. Результаты отбора воды и ряски для исследования	11
3.2. Результаты проведенных экспериментальных исследований	11
3.2.1. Результаты проведения эксперимента с бензином	11
3.2.2. Результаты проведения эксперимента с сырой нефтью	15
Заключение	20
Список литературы	23
Приложение	24

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность: Нефтегазовая отрасль является одной из самых загрязняющих в промышленности и наносит урон природным экосистемам. Негативно влияют на окружающую среду разливы нефти на кустах, которые приводят к гибели организмов. На сегодняшний день в целях ремедиации активно используются биосорбенты, а именно специально выведенные штаммы бактерий-деструкторов, метаболизирующих нефтешламы. Данный метод считается наиболее экологически безопасным и эффективным. В то же время, штаммы бактерий являются инвазивными видами по отношению к загрязненному водоему, что не может не сказаться на экологическом состоянии данной среды. Как альтернатива микробиологическому методу может выступать использование водных растений семейства рясковые (*Lemnaceae*). Неоднократно различные исследования подтверждали их уникальные в своем роде свойства гипераккумуляторов огромного количества химических элементов, благодаря чему можно предположить, что это растение может использоваться в качестве биоремедиатора нефтезагрязненных водоемов.

Объектом исследования являются методы биоремедиации нефтезагрязненных водоемов, а **предметом исследования** - растения рода *Lemna* (ряска).

Теоретическая значимость заключается в изучении свойств ряски как аккумулятора нефтепродуктов, а **практическая значимость** в применении ряски в качестве биосорбента на местах разлива нефтепродуктов.

Цель: определить возможность использования ряски в целях ремедиации нефтезагрязненных водоемов.

Задачи:

1. Подготовка материалов для исследования, а именно отбор воды из природной среды и культивация особей ряски для эксперимента.
2. Проведение серии экспериментов с использованием нефтепродуктов (бензина и сырой нефти) в качестве загрязнителей воды и ряски с бактериями-деструкторами (МД-жидкий) в качестве биосорбентов.
3. Подготовка проб воды и ряски для проведения химического анализа
4. Анализ полученных данных по результатам химического и биоиндикационного анализа.

Гипотеза: Мы предполагаем, что использование ряски является эффективным методом очистки нефтезагрязненных водоемов.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ РЯСКИ РОДА *LEMNA*

Водное высшее растение, обычно именуемое ряской (*Lemna*), принадлежит к семейству рясковых (*Lemnaceae*), которое состоит из четырех родов. Имеет плавающую на поверхности или погруженную в воду дискообразную пластинку (стебель с листьями) и очень тонкий корень, исходящий из центра нижней поверхности каждого листа. Ряска редко цветёт и размножается вегетативно, продуцируя новые пластинки. По сравнению со взрослыми растениями молодые, как правило, светлее, имеют более короткие корни и состоят из двух-трех пластинок разных размеров. Она в изобилии плавает на поверхности стоячих медленно текущих вод, что делает это растение доступным для любых исследований.

1.2. РЯСКА КАК ФИТОРЕМЕДИАТОР РАЗЛИЧНЫХ ПОЛЛЮТАНТОВ В ВОДНОЙ СРЕДЕ

Растения рода *Lemna* являются гипераккумуляторами огромного количества химических элементов. Благодаря высокой продуктивности (0,7-1,5 кг/м² в год) ряска поглощает большие количества биогенных элементов (до 98 % от содержания в поступающей воде), тем самым очищая воду. Ряска устойчива к высоким концентрациям нитратов, аммиака, фосфатов. Содержание азота в клетках рясковых может в 2000 раз превышать его концентрацию в воде, фосфора - в 7000, калия - в 5000 раз. Ряска малая, например, за двое суток уменьшает содержание меди в отработанной воде с 5 мг/л до 1 мг/л. Так, по результатам множества исследований доказано, что ряска может извлекать Pb, Si, Cd, Fe, Hg из загрязненных вод. Ряска хорошо зарекомендовала себя в качестве специфического накопителя радионуклидов ⁹⁰Sr (стронций), ¹³⁷Cs (цезий) и ⁶⁰Co (кобальт).

В последние годы широкое распространение получила очистка стоков на гидробиотических площадках и в биопрудах ряской, которая метаболизирует также такие загрязнения, как фенол (до 500 мг/л), нефтепродукты, синтетические поверхностно-активные вещества, полихлорированные бифенилы (ПХБ), несимметричный диметил гидразин, гербициды и множество других веществ.

Использование ряски в качестве тесторганισμού обусловлено изменчивостью её морфологических признаков, которые можно оценить визуально по степени пожелтения, увядания листочков, хлорозам, некрозам и другим специфическим реакциям. Это позволяет без применения сложного оборудования получить представление о токсичности проб воды [3].

Так, зафиксирован случай удачного применения ряски как биофильтра в 1997г. в Ленинградской области при очистке реки, аварийно загрязненной дизельным топливом (ДТ). Основная масса ДТ была задержана системой боновых заграждений, собрана механически и с помощью нефтепоглощающих материалов. Существенную угрозу санитарному благополучию населения поселка, расположенного в 4,5 км ниже по течению реки, представляли высокие концентрации нефтепродуктов в воде, которые превышали фоновые в десятки раз. Была проведена обработка наиболее загрязненных участков прибрежной зоны, водной растительности и зеркала воды нефтеокисляющим биопрепаратом семейства Олеоварин и минеральными удобрениями. Установлен каскад биофильтров с иммобилизованными клетками биопрепарата и минеральными удобрениями и внесена на ограниченные участки реки ряска. *Внесение ряски на определенных локальных участках реки вначале сопровождалось ее массовой гибелью и сорбцией нефтепродуктов на слое мертвых растений, но затем, при повторном внесении ряска сохраняла жизнеспособность*, что позволило интенсифицировать окисление ДТ в приповерхностном слое воды. Использование растения ряски и водоросли хлореллы – это использование фиторемедиации для очистки от мазута и ДТ водных объектов. Такие технологии привлекательны относительно дешевой и результатами, для разрушения в водоемах углеводородов в очень высокой концентрации, не взирая на частичную и контролируемую эвтрофию водоемов. [6].

В апреле 2019 года группой аспирантов СФУ была опубликована статья «Изучение поглощающих свойств высших водных растений ряски малой (*lemna minor*), а так же выявление возможности использования водных растений в качестве сорбента нефтепродуктов для биоремедиации водной среды» [8]. Данное исследование в очередной раз подтвердило ремедиационные свойства ряски, в частности ее способность поглощать нефтезагрязнители.

1.3. ЗАГРЯЗНЕНИЕ ВОДОЕМОВ НЕФТЕПРОДУКТАМИ И МЕТОДЫ ИХ ОЧИСТКИ

Нефть и нефтепродукты являются наиболее распространенными загрязняющими веществами водой среды обитания. Основными источниками загрязнения нефтью являются: регламентные работы при обычных транспортных перевозках нефти, аварии при транспортировке и добычи нефти, промышленные и бытовые стоки. Все нефтепродукты могут подвергаться ассимиляции морскими организмами. Соотношение всех процессов, способствующих удалению нефтяных углеводородов из водной среды, изучено слабо. Вместе с тем установлено, что именно активность бактерий определяет окончательную

судьбу нефти в воде. Общее воздействие нефтепродуктов на морскую среду можно разделить на 5 категорий: непосредственное отравление с летальным исходом, серьезные нарушения физиологической активности, эффект прямого обволакивания живого организма нефтепродуктами, болезненные изменения, вызванные внедрением углеводов в организм, а также изменения в биологических особенностях среды обитания. Каждая из категорий непосредственно влияет на изменение экосистемы водоема. Одним из наиболее перспективных и экологически безопасных методов очистки среды от углеводов является биоремедиация. Под термином биоремедиация принято понимать применение технологий и устройств, предназначенных для биологической очистки почв и водоемов. [1,6].

1.4. ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДУЕМЫХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ

Бензин-растворитель «Галоша» (либо «Калоша» в зависимости от производителя) - нефтяной растворитель «Нефрас С2-80/120», представляющего собой легкокипящую фракцию деароматизованного бензина.

Модификация БР-2 выпускается методом каталитического риформинга; модификация БР-1 - путем прямой перегонки малосернистых нефтей. Относится к группе бензинов-растворителей. Прозрачная бесцветная, иногда желтоватая, легколетучая проникающая жидкость с характерным сладковатым запахом.

Используемая в эксперименте нефть относится к **Советскому нефтяному месторождению**. Расположено на границе Тюменской и Томской областей (Обь-Иртышское междуречье) в Западно - Сибирской нефтегазоносной провинции и приурочено к Советскому, Соснинскому, Медведьевскому и Нижневартовскому поднятиям. Открыто в 1962 г., приурочено к юго-восточной части Нижневартовского свода, представляет собой антиклинальную складку сложного строения. Большая ось складки, по данным сейсморазведки, имеет дугообразную форму - простирается с юго-юго-востока на северо-северо-запад. Северо-восточное крыло более крутое, чем юго-западное. Данное месторождение осваивается нефтедобывающим предприятием АО «Томскнефть ВНК».

Используемый в исследовании **биопрепарат МД-жидкий** был разработан компанией «ЭКОЙЛ», специализирующейся на производстве биопрепаратов, рекультивации нефтезагрязненных земель, обезвреживании нефтешламов, очистке стоков хозяйственно-бытового назначения и производящей комплексные биопрепараты с маркой «МД». Действие биопрепаратов заключается в способности микроорганизмов-деструкторов использовать нефть и нефтепродукты как источники питания. В состав входят несколько штаммов микроорганизмов, которые способны утилизировать все углеводороды, входящие в

состав нефти. Биопрепараты «МД» не наносят вред окружающей среде, нетоксичны. Сфера применения биопрепаратов: рекультивация нефтезагрязненных земель, обезвреживание нефтешламов, рекультивация/консервация нефтешламовых амбаров

Используемый раствор МД-жидкого готовится сотрудниками ООО «Экойл» по разработанной ими методике.

2.МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве тест объекта использовали: ряска (*Lemna*), препарат МД-жидкий.

Оборудование: шприцы инсулиновые, пластиковые ёмкости объемом 3 л с крышками, бутылки объёмами от 0,5 до 5 л, блокнот для записи наблюдений, шпатель, мензурка объемом 900 мл, воронка, сачок, водоотборник поверхностный, фотоаппарат Canon PC1817.

Место проведения: кабинет зоологии МОУ ДО «ДЭБЦ».

Время проведения исследования: август – ноябрь 2019 года.

2.1. МЕТОДИКА ОТБОРА ВОДЫ И РЯСКИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Воду и ряску для эксперимента отбирали из условно чистого водоема, по данным исследований, проводимых с 2015 по 2018 г.г. воспитанницей ДЭБЦ Плотко Элиной под руководством Сизовой Л.Н. Воду собирали при помощи водоотборника в пластиковые ёмкости объёмом 5 литров. Сбор ряски производили с поверхности водоема, в 2-х метрах от берега, используя водоотборник поверхностный. Ряску перемещали в пластиковое ведро объёмом 5литров (с водой из данного водоема) для дальнейшего исследования в МОУДО «ДЭБЦ». Отобранную воду и ряску привозили в кабинет зоологии ДЭБЦ, и путем фильтрации очищали от механических загрязнений.

2.2. МЕТОДИКА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РЯСКИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Особи ряски, используемые в эксперименте, были культивированы в приготовленной нами питательной среде Штейнберга, приготовленной в соответствии с ГОСТ 32426-2013 [4], которая имела следующий состав (мг/л дистиллированной воды, погрешность равна 1 мг/л):

Таблица 1

Состав питательной среды Штейнберга

Вещество	Концентрация, мг/л
KNO ₃	350
Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O	295
K ₂ HPO ₄	12,6
KH ₂ PO ₄	90
MgSO ₄ *7H ₂ O	100
H ₃ BO ₃	120
ZnSO ₄ *7H ₂ O	180
NaMoO ₄ *2H ₂ O	44
MnCl ₂ *4H ₂ O	180
FeCl ₃ *6H ₂ O	760
ЭДТА дигидрат Na	1500

Полученный раствор добавляли в объёме 12,5 мл на 3 л дистиллированной воды. Растения в количестве 100 особей с двумя листецами пересаживали в свежеприготовленный раствор среды и дистиллята через каждые 7 суток при помощи деревянной палочки.

2.3. МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для исследования создали экспериментальную среду, которая представляет из себя раствор, состоящий из нефтезагрязнителей (бензин или нефть) и 2х литров воды из природного водоёма. Полученный раствор разливали в трёхлитровые пластиковые ёмкости (рис.1), которые накрывали крышками, чтобы уменьшить потерю жидкостей за счёт уменьшения испарения.

Состав экспериментальной среды: на 2 литра воды из природного водоёма, добавляли при помощи инсулинового шприца вещество-загрязнитель:

1. 0,1 мл бензина «Галоша»
2. 0,1 мл нефти
3. 2,5 мл нефти

Для исследования использовали три вида биосорбента:

1. Ряска
2. Ряска + бактерии
3. Бактерии



Рисунок 1. Емкости с экспериментальной средой, раствор МД-жидкого, бензин «Галоша»

В пробы с бактериями добавляли 80 мл раствора МД-жидкого, предоставленного сотрудниками ООО «Экойл». В пробы с ряской добавляли по 100 особей ряски с двумя листецами, культивированной в течение месяца на питательной среде Штейнберга. Из культуры выбирали особи с двумя листецами, одинаковые на вид, активно растущие, чистые, зеленые, неповрежденные, здоровые на вид.

Для каждого из биосорбентов (ряска, ряска+бактерии и бактерии) ставили пробы (емкости с раствором и тест-организмами) в двух повторностях для статистической значимости. В каждой из трех серий экспериментов (бензин, сырая нефть 0,1 мл и 2,5 мл) ставили одну контрольную пробу без включения в нее биосорбентов для сравнения ее состава с пробами, среда которых находилась под воздействием ряски и бактерий-деструкторов. Таким образом, всего имели по 7 проб для каждой экспериментальной среды, то есть всего 21, 7 из которых с бензином и 14 с нефтью.

Исследование проводили методом наблюдения и подсчёта прироста растений в трех экспериментальных средах (рис.2). В каждый день контроля фотографировали текущее

состояние экспериментальных проб, фиксировали визуальные изменения объектов наблюдений.



Рисунок 2. Подсчёт листецов

По истечении месяца готовили пробы на атомно-эмиссионный анализ с индуктивно связанной плазмой для определения химического состава макрофита (ТПУ) и анализ воды на наличие нефтепродуктов в ней фотометрическим методом с помощью спектрофотометра и Флюората-02 (АО «Томскнефть ВНК», Химико-аналитическая лаборатория №1). Подготовка происходила следующим образом: воду через воронку переливали в пластиковые бутылки объемом 0,5 л, перед этим выложив из нее ряску для дальнейшей подготовки к элементному анализу.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. РЕЗУЛЬТАТЫ ОТБОРА ВОДЫ И РЯСКИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Участок отбора воды и ряски находится в 16-ти км от города, в 2 км от дороги Стрежевой-Нишневартовск. На 2017г. площадь водоёма равна 216м², а процент покрытия поверхности ряской равен 25%, что является показателем экологически чистой водной среды. Дно торфяное, берег очень топкий. По берегу встречаются поваленные сухие деревья. Концентрация нефтепродуктов в отобранной воде по нашим результатам химического анализа составляет 0,06 мг/дм³.

3.2. РЕЗУЛЬТАТЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РЯСКИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Вся ряска, использованная в исследовании, была отобрана из данного водоема и выращена на питательной среде Штейнберга. Растения в среде росли в течение всего исследования, откуда брали особи ряски при необходимости. Из культуры выбирали особи с двумя листецами, одинаковые на вид, активно растущие, зеленые, неповрежденные, здоровые на вид.

3.3. РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕДЕННЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.3.1. РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА С БЕНЗИНОМ

Длительность исследования с 20.08 по 23.09.

Всего ставили 7 проб, из них: Две пробы с ряской (Р1 и Р2), две с препаратом МД-жидкий (Б1 и Б2), две с ряской и препаратом МД-жидкий (БР1 и БР2) вместе и одна контрольная проба (К). В каждую из них на 2 литра природной воды, добавляли при помощи инсулинового шприца 0,1 мл бензина.

В пробы Б1, Б2, БР1 и БР2 добавляли 80 мл раствора МД-жидкого, приготовленного по технологии, используемой АО «Томскнефть ВНК» для рекультивации нефтезагрязненных водоемов.

В пробы Р1, Р2, БР1 и БР2 добавили по 100 особей ряски с двумя листецами, культивированной в течение месяца на питательной среде Штейнберга. Все наблюдения вносили в Таблицу 2.

Поставили пробу с ряской и природной водой без добавления нефтепродуктов для сравнения развития и прироста ряски в нефтезагрязненной воде и относительно чистой.

Таблица 2

Запись наблюдений за пробами с бензином

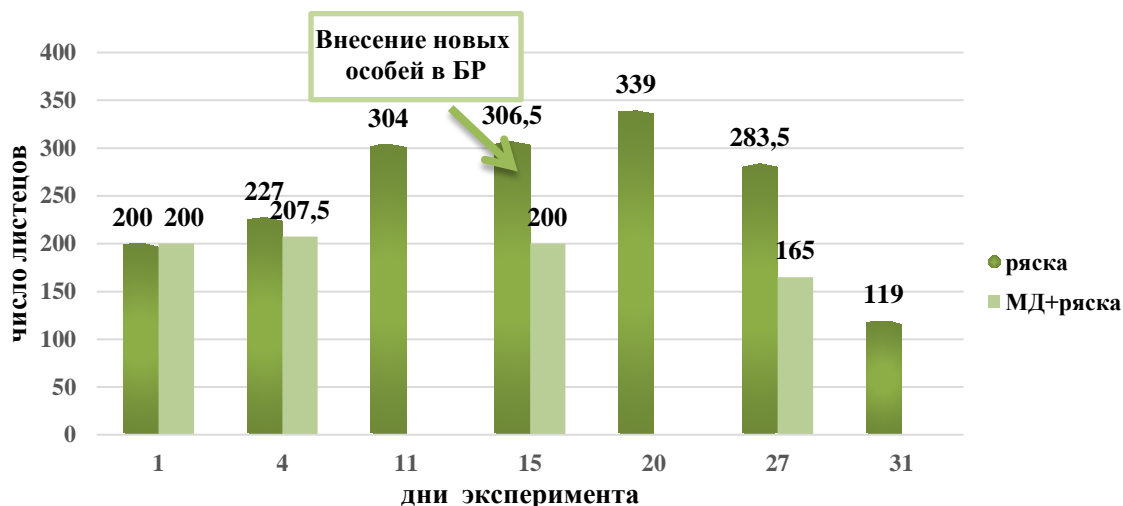
Дата/ проба	Ряска (Р1 и Р2)	Бактерии + Ряска (БР1 и БР2)	Бактерии (Б1 и Б2)
23.08.	Визуально ряска выглядит крупной. Вода темная. корни ряски очень длинные. Плёнка слабо заметна.	Ряска выглядит сравнительно хуже, чем в первый день эксперимента, наблюдается небольшое пожелтение.	Пленка видна отчетливо
25.08.	Выпал рыжий осадок, такой же осадок на корнях. На ряске образовался конденсат.	Произошло почернение корней ряски и их атрофирование (лежат на дне сосуда). Посчитать прирост в этих пробах не представлялось возможным, по причине большого числа пораженных листецов.	Пленка сохранилась и находится на поверхности. Никаких визуальных изменений.
30.08.	Ряска выглядит яркой и крупной. Пленка практически не заметна.	Ряска практически вся поражена хлорозом (не более 14% здоровых особей). Разделение розеток.	Никаких визуальных изменений.
03.09.	Ряска начала желтеть. Наблюдается разделение розеток (4-хлистная делится на 2).	Вся ряска поражена хлорозом и некрозом. Присутствуют мертвые особи. Текущие пробы заменили на новые, с тем же составом.	Никаких визуальных изменений.
08.09	За 19 дней прирост в Р1 и Р2 составил +58% и 82% соответственно.	Присутствие некроза и хлороза у многих особей, а также разделение розеток.	Все так же заметна плёнка бензина на поверхности.
15.09	Присутствие хлороза, потеря цвета, некроз. Наблюдается отрицательный прирост относительно результатов предыдущего подсчёта.	Присутствие некроза и хлороза у многих особей, а также разделение розеток.	Никаких визуальных изменений.
19.09.	Ряска более чем на 50% поражена хлорозом (рис.8).	В пробах (уже повторных) ряска практически вся поражена.	Никаких визуальных изменений. Присутствует несильный запах бензина.
23.09.	Подготовка проб на химический анализ. Запах у воды отсутствует, пленки бензина визуально нет.	Подготовка проб на химический анализ.	Подготовка проб на химический анализ.

Данные о приросте ряски в пробах с бензином представлены на диаграмме 1, на которой видно, что положительный прирост ряски продолжается от начала до середины эксперимента (20.08-08.09), что также было отмечено в процессе наблюдений (см. Таблицу 2). Видна большая разница в приросте ряски в пробах с ряской (Р) и с препаратом МД (БР) (см. кол-во листецов на 15.09). Регресс в пробах с МД-жидким и ряской начался раньше, чем в пробах только с ряской, и характеризовался появлением хлороза и некроза

(на рис. 6 видна визуальная разница между растениями в Р и БР) . Отмирание особей наблюдалось еще в первой половине месяца, вследствие чего пришлось заменить мертвые особи на здоровые (так же, как и в начале, добавили 100 особей по 2 листеца).

Диаграмма 1

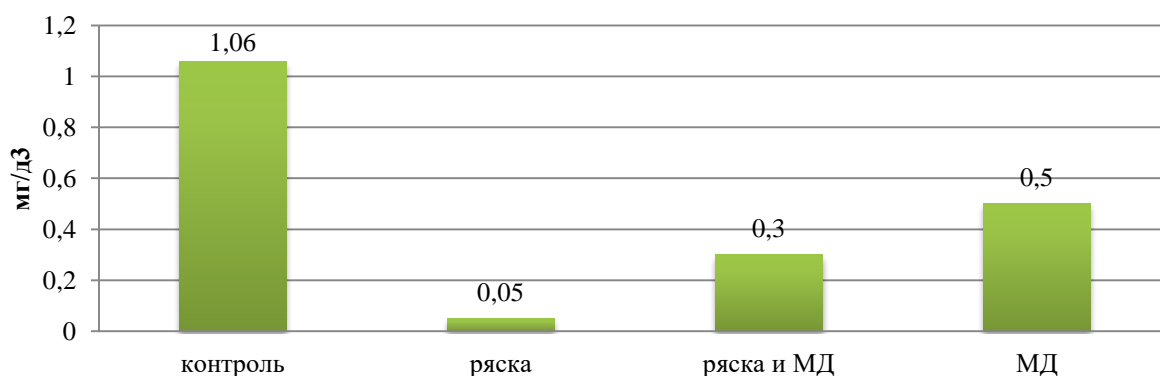
Динамика роста ряски в экспериментальных средах с бензином



Стоит отметить, что ряска, растущая в чистой воде без добавления бензина, через неделю уже была поражена хлорозом. По состоянию она была такая же, как и ряска в пробах с бензином, которая росла в этой среде намного дольше. Данная проба была поставлена нами для сравнения ее с пробами Р и БР. Отрицательный прирост ряски в пробе с чистой водой и положительный прирост ряски в нефтезагрязненной воде позволяют сделать следующее предположение: *питательной средой для роста ряски могли послужить нефтепродукты.*

Диаграмма 2

Результаты химического анализа на определение концентраций нефтепродуктов в пробах с бензином



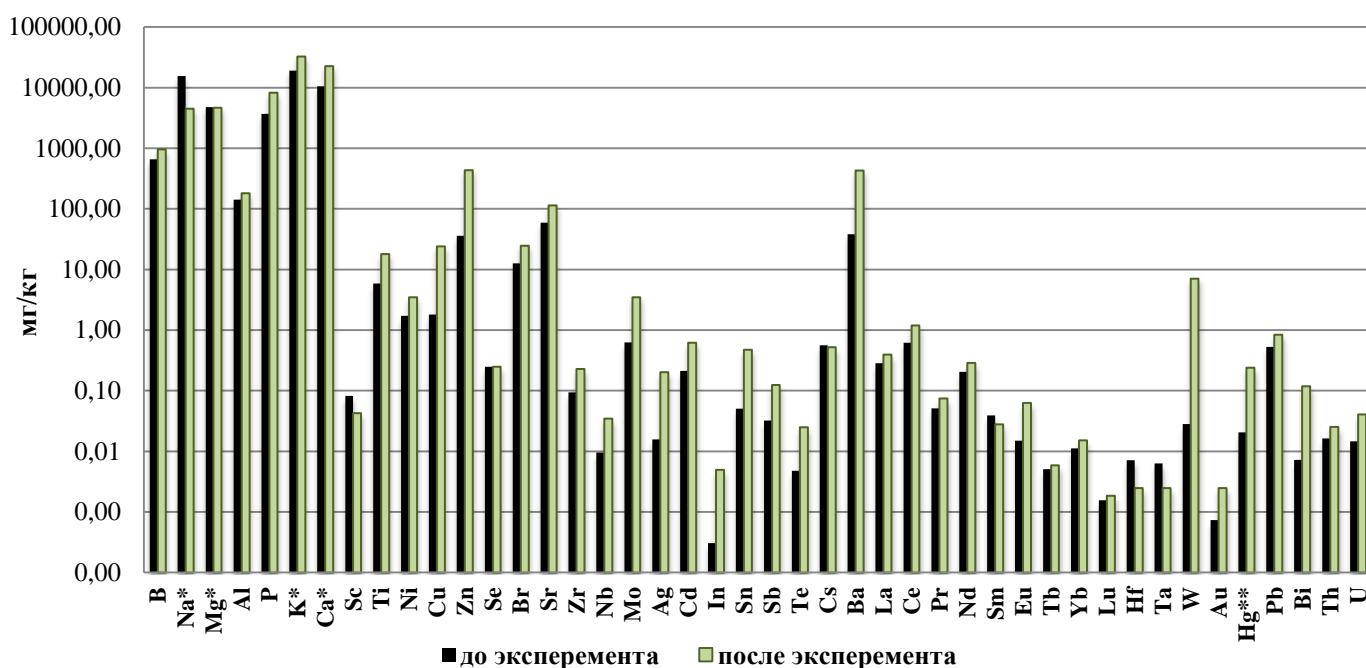
На диаграмме 2 представлены результаты химического анализа экспериментальных проб с бензином. Концентрация нефтепродуктов в контрольной пробе (К) составила 1,06

мг/д³, в пробе с МД-жидким – 0,5 мг/д³, с ряской и биопрепаратом (БР) – 0,3 мг/д³. Наименьшее содержание нефтепродуктов оказалось в пробах с ряской (Р) – 0,05 мг/д³.

Результаты химического анализа близки по значению к результатам биоиндикационного анализа: использование ряски в данных концентрациях нефтезагрязнителя является эффективным методом очистки воды от бензина.

Диаграмма 3

Результаты химического анализа состава макрофита в экспериментальных средах с бензином (ТПУ)



На диаграмме 3 представлены результаты атомно-эмиссионного анализа с индуктивно связанной плазмой для определения химического состава макрофита, который проводился в Томском Политехническом университете. Здесь стоит обратить внимание на многократное увеличение содержания W с 0,028 до 7,10, который является основным компонентом присадок для машинного топлива и масел. Наблюдается повышение концентраций элементов, являющихся маркерами нефтепродуктов, а именно Au, Sb, Ag, Br. Более того ряска наблюдается повышение концентрации различных металлов, в том числе и тяжелых таких, как Ca, Ni, Cu, Zn, Sr, Sn, Mo, Pb, Hg, Cd, Ba. Уменьшение содержания Na и Mg – структурных элементов макрофита – говорит о негативном и деструктивном влиянии нефтепродуктов на живые организмы.

Эти данные согласуются с результатами химанализа воды и биоиндикации, что ещё раз подтверждает наличие у ряски свойств биоремедиатора, а в частности и биосорбента нефтепродуктов.

3.3.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА С СЫРОЙ НЕФТЬЮ

Всего ставили по 7 проб: с объемом нефти 0,1 мл (умеренно загрязненная среда, далее У) и 2,5 мл (экстремальная среда, далее Э). По две пробы с ряской (1РУ и 2РУ, 1РЭ и 2РЭ), по две с МД-жидким (1БУ и 2БУ, 1БЭ и 2БЭ), по две с ряской и МД-жидким вместе (1РБУ и 2РБУ, 1РБЭ и 2РБЭ) и две контрольные пробы (КУ и КЭ). В каждую из них на два литра природной воды добавляли при помощи инсулинового шприца по 0,1 мл (У) и 2,5 мл (Э) нефти соответственно.

Пробы 1РУ и 2РУ, 1РЭ и 2РЭ (только ряска) поставили 28.09 в связи с отсутствием необходимого количества особей ряски в питательном растворе. Добавляли по 100 особей с двумя листецами.

Пробы с МД-жидким были поставлены 11.09, в которые добавляли 80 мл раствора МД-жидкого, приготовленного по технологии, используемой АО «Томскнефть ВНК» для рекультивации нефтезагрязненных водоемов.

Таблица 3

Запись наблюдений за пробами с содержанием нефти 0,1 мл

Дата проба	Ряска (1РУ и 2РУ)	Бактерии + Ряска (1БРУ и 2БРУ)	Бактерии (1БУ и 2БУ)
15.09	-	Присутствуют пораженные хлорозом и некрозом особи. Разделение розеток.	Присутствует неприятный запах биопрепарата с нефтью. Образовался рыжий осадок на поверхности и дне емкости.
19.09	-	В 1РБУ вся ряска стянута очень плотной пленкой. Отчистили ряску от образовавшейся пленки, мешавшей подсчету листецов. В 2РБУ наблюдается хлороз. Добавили из питательной среды недостающее количество особей с 2мя листецами (вместо погибших растений).	Никаких визуальных изменений.
23.09	-	В 1РБУ снова образовалась та же пленка. Подсчёт в этой пробе не вели. В 2РБУ - хлороз.	Вода с черноватым оттенком, мутная
28.09	Подготовка проб для эксперимента. Начало наблюдений.	Никаких визуальных изменений. Хлороз.	Никаких визуальных изменений.
02.10	Рыжий крупный осадок, налет на стенках емкости. Большое количество осо-	Поражение хлорозом. В 2РБУ обнаружена особь с пятью листецами.	Никаких визуальных изменений.

	бей с некрозом и хлорозом, разделение розеток.		
06.10	Разделение розеток. Отрицательный прирост. Около половины растений поражены хлорозом и некрозом.	Большое количество растений с хлорозом и некрозом. Разделение розеток. В 2РБУ обнаружено уже три особи с пятью листецами.	Никаких визуальных изменений.
12.10	Все особи погибли. Подготовка погибшей ряски к хим. анализу. Добавили в среду 100 здоровых особей ряски из питательной среды.	Разделение розеток. Наблюдается отрицательный прирост.	Все тот же неприятный запах биопрепарата с нефтью и осадок.
19.10	Из-за плотного покрытия нефтяной пленкой листецов не представляется возможным их подсчет.	Образовался рыжий осадок на дне и на поверхности. Больше половины растений поражены хлорозом и некрозом.	Никаких визуальных изменений.
26.10	На корнях ряски рыжий осадок. Осадок распределен по всей толще воды.	Ряска практически на 100% поражена хлорозом и некрозом. Пленка слабо заметна.	Никаких изменений.
30.10	В 2РУ обнаружили одну особь с пятью листецами. Ряска практически на 40% поражена хлорозом и некрозом	-	Неприятный запах нефти и биопрепарата, вода мутная, по всей толще воды осадок.

Диаграмма 4

Динамика роста ряски в экспериментальных средах с содержанием нефти 0,1 мл

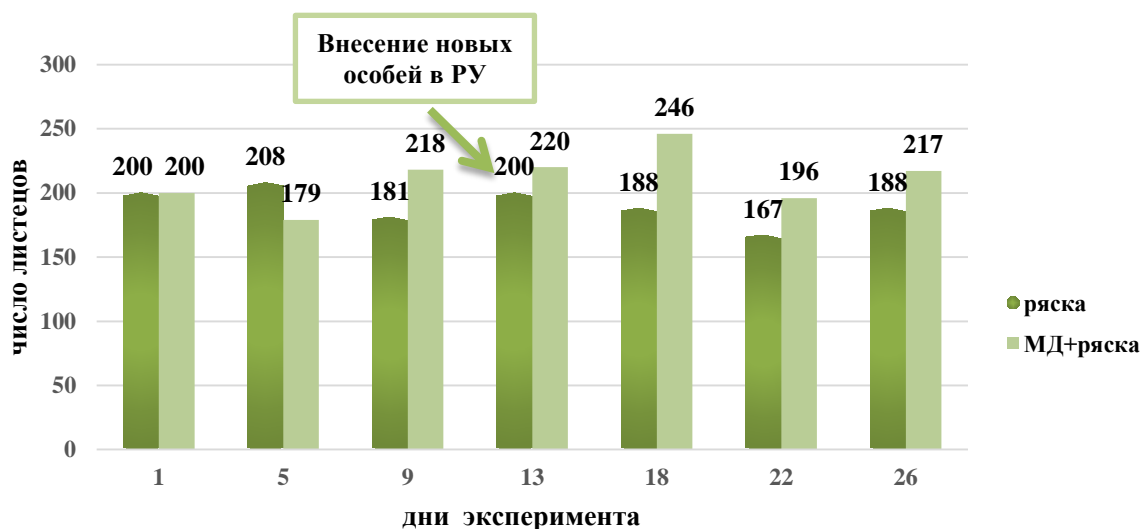




Рисунок 3. Обнаруженная особь с пятью листочками

Данные о приросте ряски в пробах с умеренно загрязненной средой представлены на диаграмме 4. На ней видно, что прирост ряски на протяжении всего периода наблюдений был нестабильным и менял свое значение (был то положительным, то отрицательным). Заметна разница в приросте ряски в пробах с ряской (РУ) и с препаратом МД (БРУ) – в пробах с МД прирост заметно больше. На 13 день исследований пришлось заменить все особи ряски в пробах РУ в связи с их отмиранием.

Так, опираясь на результаты биоиндикационного анализа, можно сделать вывод о том, что наиболее эффективным является совместное применение ряски и биопрепарата в целях очистки водоема от нефти. Обнаруженные особи с пятью листочками (рис. 3) являются ярким примером негативного воздействия нефтепродуктов на живые организмы, так как данная мутация с большой вероятностью является последствием загрязнения воды нефтью, а множество других факторов, которые могли бы быть причиной этого явления, в условиях нашего эксперимента были исключены.

Результаты химического анализа воды на концентрацию нефтепродуктов фотометрическим методом представлены на диаграмме 5. Наименьшее количество нефтепродуктов содержится в пробах с МД-жидким (БУ) – 0,5 мг/д³. Приблизительно те же концентрации нефти содержатся в пробе с препаратом МД и ряской (РБУ) - 0,6 мг/дм³. Относительно не намного больше их содержание в пробах с ряской (РУ). Из этих данных можно сделать вывод о том, что ремедиационная способность макрофита при содержании в воде 0,1 мл сырой нефти не уступает по своим показателям биопрепарату.

Диаграмма 5

Результаты химического анализа на определение концентраций нефтепродуктов в пробах с содержанием нефти 0,1 мл

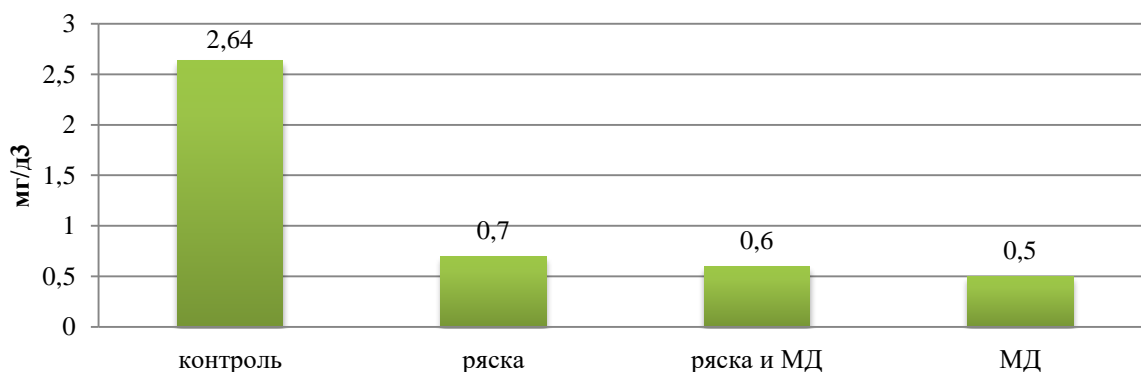


Таблица 5

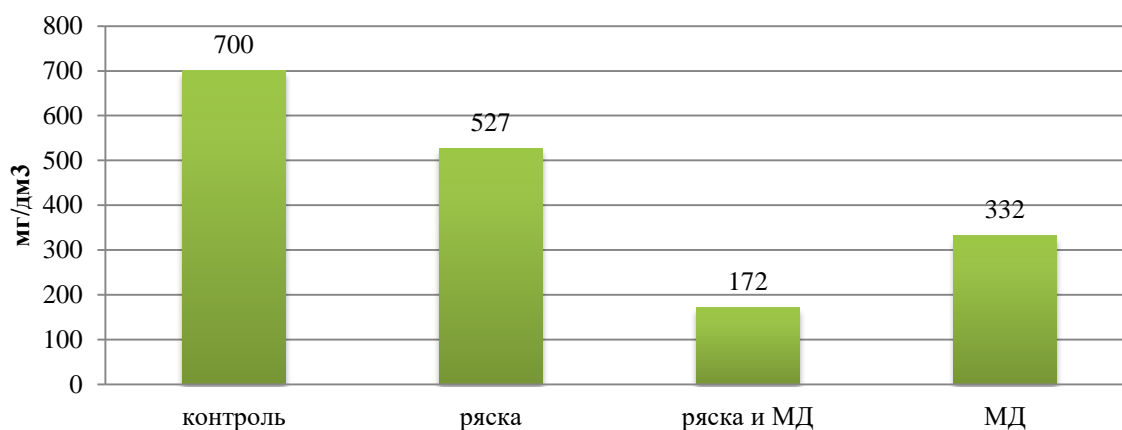
Запись наблюдений за пробами с содержанием нефти 2,5 мл.

Дата/ проба	Ряска (1РЭ и 2РЭ)	Бактерии + Ряска (1БРЭ и 2БРЭ)	Бактерии (1БЭ и 2БЭ)
15.09	-	Присутствует неприятный запах биопрепарата с нефтью.	Присутствует неприятный запах биопрепарата с нефтью.
19.09	-	Нефтяная пленка визуально уменьшилась, неравномерно распределена по поверхности («островками»), вся ряска полностью покрыта нефтяной пленкой. В толще воды образовалась очень плотный полупрозрачный сгусток с ряской, предположительно, штаммы бактерий МД-жидкого.	На поверхности плотная сплошная пленка нефти, визуально нет никаких изменений.
23.09	-	Никаких визуальных изменений.	Никаких визуальных изменений.
28.09	Подготовка проб для эксперимента. Начало наблюдений.	Никаких визуальных изменений.	Никаких визуальных изменений.
02.10	Присутствует запах нефти.	Присутствует неприятный запах биопрепарата с нефтью.	Никаких визуальных изменений. Присутствует запах нефти и биопрепарата.
06.10	Из-за полного покрытия нефтяной пленкой всей ряски не имели возможность вести подсчет листцов. Далее подсчет не вели.	Полупрозрачный сгусток увеличился и потемнел, Захватив всю ряску, этот сгусток плавает в толще воды. Поверх него внесли снова 100 особей ряски по 2 листца.	В толще воды образовалась очень плотный полупрозрачный сгусток, предположительно, штаммы бактерий МД-жидкого.
12.10	Пленка визуально уменьшилась.	Наблюдается хлороз и некроз. Разделение розеток.	Никаких визуальных изменений.
19.10	Никаких визуальных изменений	Количество растений с хлорозом и некрозом увеличилось. Разделение розеток.	Никаких визуальных изменений. Присутствует запах нефти и биопрепарата.
26.10	Никаких визуальных изменений	Количество растений с хлорозом и некрозом увеличилось. Разделение розеток. Подготовка проб на хим. анализ.	-
30.10	Подготовка проб на хим. анализ. Пленка неравномерно распределена по поверхности. Присутствует запах нефти.	-	-

Ввиду отмирания особей и полного их покрытия нефтяной пленкой, подсчёт личинок не представлялся возможным. По этой причине наши выводы основывались только на результатах химического анализа, представленных на диаграмме 6. Здесь *наименьшее количество нефтепродуктов обнаружили в пробах с ряской и МД-препаратом (РБЭ) – 172 мг/д³. Вероятно, объяснить данные результаты можно большей биомассой, метаболизующей нефть в воде.* Больше содержание нефтепродуктов обнаружено в пробах с МД-жидким (БЭ) – 332 мг/д³, и ещё больше концентрация нефти в пробах с ряской (РЭ) – 527 мг/д³, которая оказалась непригодной для жизни растений, вследствие чего особи погибли.

Диаграмма 6

Результаты химического анализа на определение концентраций нефтепродуктов в пробах с содержанием нефти 2,5 мл



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы провели исследование по изучению свойств растений рода *Lemma* как фиторемедиатора нефтезагрязненных вод. В качестве тест-организмов использовали ряску и биопрепарат МД-жидкий, разработанный и предоставленный нам сотрудниками ООО «Экойл». Тестируемые биосорбенты были помещены в три экспериментальные среды, которые представляли собой растворы двух литров природной воды и вещества-загрязнителя. Первая среда содержала в себе бензин, вторая – нефть количеством 0,1 мл (умеренно загрязненная среда), третья – нефть количеством 2,5 мл (экстремальная среда). Для каждой из трех серий экспериментов ставили 7 проб (емкостей с раствором и тест-организмами): две с ряской, две с бактериями-деструкторами нефтешламов (препарат МД-жидкий), две с бактериями и ряской вместе, а также одну контрольную пробу без включения в нее биосорбентов для сравнения ее состава с пробами, среда которых находилась под воздействием ряски и бактерий-деструкторов.

Наблюдения велись в течение двух месяцев, записывались все визуальные изменения состояния ряски, появление хлороза и некроза. По истечении месяца готовили пробы на атомно-эмиссионный анализ с индуктивно связанной плазмой для определения химического состава макрофита (ТПУ) и анализ воды на наличие нефтепродуктов в ней фотометрическим методом с помощью спектрофотометра и Флюората-02 (АО «Томскнефть ВНК»).

По результатам проведенного исследования были получены данные, на основании которых сделаны следующие выводы:

1. В ходе эксперимента с бензином стоит отметить следующее:
 - 1.1. Регресс в пробах с МД-жидким и ряской начался раньше, чем в пробах с одной ряской, и характеризовался появлением хлороза и некроза. Отмирание особей ряски с биопрепаратом наблюдалось еще в первой половине месяца, вследствие чего пришлось заменить мертвые особи на здоровые.
 - 1.2. Ряска, растущая в чистой воде без добавления бензина, через неделю уже была поражена хлорозом. По состоянию она была такая же, как и ряска в пробах с бензином, которая находилась в этой среде намного дольше. Данная проба была поставлена нами для сравнения. Отрицательный прирост ряски в пробе с чистой водой и положительный прирост ряски в воде с бензином позволяют сделать следующее предположение: *питательной средой для роста ряски могли послужить нефтепродукты.*
 - 1.3. По результатам химического анализа воды наименьшее содержание нефтепродуктов оказалось в пробах с ряской. Эти результаты близки по значению к результатам

биоиндикационного анализа: *использование ряски в данных концентрациях нефтезагрязнителя является эффективным методом очистки воды от бензина.*

1.4. По результатам химического анализа состава макрофита выявили повышение концентраций металлов-маркеров нефтепродуктов, а также ряда других элементов-загрязнителей, *что ещё раз подтверждает наличие у ряски свойств биоремедиатора, а в частности и биосорбента нефтепродуктов.*

2. В ходе эксперимента с содержанием 0,1 мл нефти определили, что прирост ряски в пробах с МД заметно больше, чем в пробах с одной ряской и на протяжении всего периода наблюдений был нестабилен. Из химанализа воды получены данные о том, что наименьшие концентрации нефтепродуктов содержались в пробах с МД-жидким, приблизительно те же концентрации нефти содержатся в пробе с препаратом МД и ряской и относительно немного больше их значение в пробах с ряской. Таким образом, можно сделать вывод о том, что *ремедиационная способность макрофита при содержании в воде 0,1 мл сырой нефти относительно незначительно уступает по своим показателям биопрепарату, но наиболее эффективным является совместное применение ряски и биопрепарата в целях очистки водоема от нефти.*

3. Та же тенденция наблюдается и в ходе эксперимента с содержанием 2,5 мл нефти наименьшие концентрации нефтепродуктов обнаружены в пробах с ряской и МД-препаратом. Вероятно, это объясняется большей биомассой, метаболизирующей нефть в воде. Большее содержание нефтепродуктов обнаружено в пробах с МД-жидким, и ещё больше концентрация нефтепродуктов в пробах с ряской, которая оказалась непригодной для жизни растений, вследствие чего все растения погибли.

Обобщив все вышеперечисленное, пришли к выводу, что наша гипотеза частично подтвердилась: ряска действительно обладает свойствами фиторемедиатора, с помощью которого можно производить очистку водоемов от нефтезагрязнителей. Опираясь на биоиндикационный и химический анализ, пришли к заключению, что при загрязнении водоема бензином лучше использовать ряску самостоятельно, то есть без добавления биопрепарата, а в случае ремедиации на местах разлива сырой нефти наиболее рациональным и эффективным методом является совместное применение биопрепарата и ряски. Данное утверждение, помимо результатов нашего практического исследования, основывается и на других фактах.

Использование бактерий-деструкторов имеет свои отрицательные стороны. Несмотря на свое экологическое преимущество по сравнению с другими методами, штаммы микроорганизмов, вносимые в загрязненный водоем, всё-таки являются инвазивными видами для данной среды и не могут не повлиять на нее. Внедрение чужеродных организ-

мов приводит к дестабилизации всей экосистемы и может изменять как ее биологический состав, так и ряд физико-химических факторов. Аборигенные организмы имеют преимущество над внедряемыми. Обменные процессы, осуществляемые штаммами, приводят к уменьшению содержания кислорода в воде. Ряска же в свою очередь насыщает водоем кислородом, поэтому их совместное использование не только позволит уменьшить концентрации нефтепродуктов в воде за счёт увеличения биомассы, метаболизирующей нефть, бензин и другие вещества-загрязнители, но и смягчит негативное влияние вносимых бактерий на очищаемую экосреду.

Кроме того, очевидна экономическая выгода в использовании ряски как биосорбента, поскольку себестоимость и издержки применения везде растущего и очень быстро набирающего биомассу растения-эврибионта стремятся к нулю, тогда как биопрепараты являются специализированными для каждого региона, так как требуют учета всех климатических, почвенных и других особенностей среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вальков В.Б. Биоремедиация: принципы, проблемы,ходы // Биотехнология. 1995. – №34. – С. 2027.
2. ТУ 38.401-67-108-92 «Бензин-растворитель для резиновой промышленности».
3. Цаценко Л.В., Малюга Н.Г. Чувствительность различных тестов на загрязнение воды тяжёлыми металлами и пестицидами с использованием ряски малой *Lemna minor* L. // Экология. 1998. № 5. С. 407–409.
4. ГОСТ 32426-2013 Методы испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Испытание ряски на угнетение роста.
5. Янкевич М. И., Хадеева В. В., Квитко К. В., Лизунов А. Б. //«Очистка воды и почвы от нефтезагрязнений биотехнологическими методами»// Тез. докладов Первой Международной и Второй Всероссийской конфер. «Охрана окружающей Среды при поисках, разведке, разработке месторождений углеводородного сырья, его переработке и транспортировке», 1996 г, Санкт-Петербург, с 40-41.
6. М.И. Янкевич, К.В. Квитко. //Биоремедиация нефтезагрязненных водоемов.//Экология и промышленность России, 1998, октябрь стр.21-28
7. ГОСТ Р 51592–2000. Вода. Общие требования к отбору проб; Введ. 01.07.2001. — М.: Изд-во стандартиформ, 2008.
8. Макаров Андрей Сергеевич, Свобода Иван Владимирович, Бондарева Лидия Георгиевна. Изучение поглощающих свойств высших водных растений ряски малой (*lemna minor*), а так же выявление возможности использования водных растений в качестве сорбента нефтепродуктов для биоремедиации водной среды. Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики». Серия: Естественные и технические науки №4 апрель 2019 г.

ПРИЛОЖЕНИЕ

РЕКОМЕНДАЦИЯ

*на научно-исследовательский проект по теме
«Мониторинг состояния водоемов с помощью ряски»
Крюковой Алены Александровны, учащийся ПГА «Роснефть-класса» МОУ СОШ №5,*

Научно-исследовательский проект «Ряска (Lemna) как фиторемедиатор нефтезагрязненных вод» затрагивает актуальную тему современных экологических и биотехнологических исследований, а именно использование живого организма в качестве биоремедиатора загрязненных водоемов.

В данной работе выполнено изучение ремедиационных способностей водного растения семейства рясковые к нефтепродуктам в воде, а также возможность использования данного макрофита в качестве биосорбента для очистки нефтезагрязненных водных объектов.

Автором проведен ряд экспериментов по очистки нефтезагрязненной воды ряской, а также сравнение предлагаемого способа очистки нефтезагрязненных вод и широко используемого рядом недропользователей (микроорганизмы). Помимо этого автор выполнил эксперименты по совместному использованию исследуемого макрофита и применяемо в настоящее время биопрепарата на основе специализированных микроорганизмов-деструкторов.

По результатам проекта выявлена высокая перспективность использования водных растений как фиторемедиаторов нефтезагрязненных вод. Серии проведенных экспериментов показали толерантность ряски к высоким концентрациям поллютантов в воде, а также положительное взаимодействие растения с биопрепаратом, на основе микроорганизмов-деструкторов.

Автором сделаны объективные и информативные выводы, при этом рекомендуется продолжить проект для проведения большей статистической значимости полученных данных.

Научно-исследовательская работа Крюковой Алены Александровны является самостоятельным и целостным исследованием, затрагивающим одну из актуальных проблем экологического мониторинга окружающей среды и отличающейся уникальностью полученных данных.

Выполненная работа может найти практическое применение в ремедиации нефтезагрязненных вод на территории деятельности нефтегазодобывающей отрасли Западной Сибири, ввиду того, что ряска имеет повсеместное распространение и отличается высокой экономической выгодой использования. Стоит отметить, что предполагаемый метод не имеет существенных рисков и способен сэкономить существующие операционные затраты на очистку нефтезагрязненных участков.

Начальник Управления по охране
окружающей среды
АО «Томскнефть» ВНК



А.А. Варавин