

М. Ю. Марченко (асп.)¹, М. И. Шуктуева (м.н.с)²,
В. А. Винокуров (д.х.н., проф.)¹, Л. М. Краснополяская (д.б.н., зав.лаб.)²
Биоремедиация нефтезагрязненных почв

¹Российский государственный университет нефти и газа им. И. М. Губкина,
кафедра физической и коллоидной химии

119991, г. Москва, ГСП -1, В-296, Ленинский проспект, 65; тел. (499) 2339589, e-mail: vinok_ac@mail.ru

²Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе РАМН,
лаборатория биологически активных соединений
119021, г. Москва, ул. Б. Пироговская, 11; e-mail: labbas@yandex.ru

М. Y. Marchenko¹, M. I. Shuktueva², V. A. Vinokurov¹, L. M. Krasnopolskaya²
Bioremediation of oil-contaminated soil

¹Gubkin Russian State University of Oil and Gas

65, Leninskiy Pr., 119331, Moscow, Russia; ph. (499) 2339589, e-mail: vinok_ac@mail.ru

²Gause Institute of New Antibiotics Russian Academy of Medical Sciences

11, B. Pirogovskaya Str., 119021, Moscow, Russia; e-mail: labbas @yandex.ru

Запасы «черного золота» остаются на высоком уровне, не прекращается строительство новых трубопроводов, увеличиваются объемы добычи, и вместе с тем, транспортировка нефти. В то же время все это влечет за собой возникновение аварийных ситуаций, в результате которых нефть и нефтепродукты попадают в различные экосистемы: атмосферу, почву, акватории. В статье представлен обзор механических, физико-химических, биологических методов ликвидации нефтезагрязненных почв. Выявлены оптимальные условия для роста микроорганизмов-деструкторов, что является основополагающей задачей при биоремедиации.

Ключевые слова: биоремедиация; загрязнение почв; ликвидация нефтегазразнообразий.

Загрязнение почвенного покрова различных территорий углеводородами и продуктами их переработки является прямым следствием производственной деятельности человека. Попадание нефтяных углеводородов в почву вызывает в ней негативные изменения. В районах нефтедобычи и нефтепереработки наблюдается интенсивная трансформация морфологических и физико-химических свойств почвы. В результате загрязнения почвы нефтью формируются почвенные ареалы, в которых изменяются зональные условия на техногенные модификации, что в итоге ведет к снижению продуктивности почв вплоть до необходимости вывода загрязненных земель из сельскохозяйственного оборота ¹. Необходимо отметить, что, несмотря на опасные последствия от загрязнения нефтью и нефтепродуктами, в небольших количествах нефть и некоторые ее

Stocks of crude oil remains at a high level, does not stop the construction of new pipelines, increasing the output and at the same time the transportation of oil. At the same time, it gives rise to accidents resulting in oil and oil products fall in different ecosystems: the atmosphere, soil, waters. This paper provides an overview of the mechanical, physical, chemical, and biological methods for the elimination of oil-contaminated soils. Create optimal conditions for growth and development of soil microorganisms is a fundamental task in bioremediation.

Key words: bioremediation; soil pollution; oil pollution elimination.

компоненты оказывают стимулирующее действие на почвенную биоту.

В настоящее время существует большое количество методов ремедиации загрязненных различными поллютантами почв. Наиболее распространенными методами являются: механические, физико-химические и биологические ². Но основную роль при очистке окружающей среды от различных загрязнений играет биологический фактор – активность микроорганизмов, участвующих в процессах трансформации различных органических соединений. Например, основными продуктами биodeградации углеводородов нефти являются углекислый газ, вода и биомасса микроорганизмов, выросших на углеводородах. Необходимо отметить, что биовосстановление оказывает меньшее воздействие на окружающую среду по сравнению с другими методами очистки.

К механическим методам ликвидации нефтезагрязнения относятся:

Дата поступления 27.09.11

1. Откачка нефти в емкости; обвалка загрязнений — первичные мероприятия при крупных разливах. Производится при наличии соответствующей техники и резервуаров. Данный метод не решает проблему очистки почвы при просачивании нефти в грунт.

2. Замена почвы — почву снимают и вывозят на полигон для естественного разложения нефти.

К физико-химическим методам ликвидации нефтезагрязнения относятся:

1. Сжигание — метод относится к экстренным мерам в условиях угрозы попадания нефти в водные источники. С помощью сжигания уничтожается от 50 до 70 % разлива нефти в зависимости от типа нефти и нефтепродукта. Остальная часть просачивается вглубь почвы. Недостаточно высокая температура приводит к попаданию продуктов возгонки и неполного окисления нефти в атмосферу. Почву после сжигания необходимо вывезти на свалку.

2. Предотвращение возгорания — изоляция разлива сверху противопожарными препаратами (пенами), засыпание сорбентами. Нужно в случае, если возгорание опаснее загрязнения почвы (в жилых кварталах, в цехах промышленных предприятий, на автомагистралях)

3. Промывка почвы — производится на полигонах в промывных барабанах с применением ПАВ. Вода после промывки отстаивается в гидроизолированных прудах или емкостях, где впоследствии проводятся ее разделение и очистка.

4. Экстракция растворителями — проводится в промывных барабанах с помощью летучих растворителей с последующей отгонкой их остатков паром.

5. Сорбция — использование сорбентов для поглощения нефтепродукта и снижения пожароопасности. Применяется на сравнительно твердой поверхности.

6. Электрохимическая обработка — в загрязненную почву погружают электроды, к которым подводится постоянный электрический ток. Многие загрязняющие вещества растворяются в почвенной воде и под действием электрического поля перемещаются в направлении к электродам, осаждаются на них и затем извлекаются.

7. Термическая десорбция — применяется крайне редко при наличии нужного оборудования. Применение позволяет получать полезные продукты вплоть до мазутных фракций.

К биологическим методам ликвидации нефтезагрязнения относятся:

1. Биоремедиация — при нефтезагрязнениях применяются микроорганизмы (бактерии, актиномицеты, дрожжи, мицелиальные грибы), способные разлагать нефть.

2. Фиторемедиация — частный случай биоремедиации, включает в себя устранение остатков нефти путем высева устойчивых к нефти видов растений.

Термин «биоремедиация» означает применение технологий и устройств, предназначенных для биологической очистки почв. В общем смысле это комплекс методов очистки вод, грунтов и атмосферы с использованием метаболического потенциала биологических объектов — растений, грибов, насекомых, червей и других организмов. Двумя основными приемами биоремедиации являются биостимуляция и биоаугментация (биодополнение).

Биостимуляция — активизация деградирующей способности аборигенной микрофлоры, содержащейся в загрязненной почве или воде, и потенциально способной утилизировать загрязнитель;

Биодополнение — интродукция природных и генно-инженерных штаммов-деструкторов чужеродных соединений.

Биостимуляция основана на стимулировании роста природных микроорганизмов, обитающих в загрязненной почве и потенциально способных утилизировать загрязнитель, но не способных делать это эффективно из-за недостатка основных биогенных элементов или неблагоприятных физико-химических условий³.

Применение биоаугментации целесообразно в случаях, когда загрязнитель плохо поддается разложению естественной микрофлорой, если для нее даже созданы оптимальные условия роста; концентрация загрязнителя в почве относительно высока; физико-химические характеристики места загрязнения делают невозможным рост естественной микрофлоры; есть реальная возможность ускорить время биоремедиации или улучшить ее качество^{4,5}.

Существующие два пути интенсификации биodeградации ксенобиотиков в окружающей среде — стимуляция естественной микрофлоры и интродукция активных штаммов, не только не противоречат, но и дополняют друг друга⁶.

Для ускорения темпов ремедиации загрязненной среды необходимо создать условия, оптимальные для роста и развития микроорганизмов-деструкторов (аборигенных и/или интродуцированных штаммов). Создание оптимальных условий для роста и развития микроорганизмов почвы является основополагающей задачей при биоремедиации. Это достигается простыми и экономичными технологиями, из которых чаще всего используются:

1. Аэрация почв. Известно, что для окисления углеводов микроорганизмам необ-

ходимо наличие молекулярного кислорода. Для активизации роста и физиологической активности деструктора в почвах необходимо проводить принудительное аэрирование почв за счет снижения гравиметрической плотности посредством проведения рыхления. Возможность интенсификации разложения нефти в почве путем рыхления, частой вспашки и дискования показана в ряде исследований^{7–9}. Кроме улучшения условий микробиологической деструкции нефти и увеличения биологической активности, рыхление способствует снижению концентрации углеводородов в результате испарения легких фракций и более равномерному распределению компонентов нефти в толще почвы, что увеличивает активную поверхность¹⁰.

Для улучшения аэрации почв можно применять перфторорганические соединений с газотранспортной функцией. По данным Бакулина с соавторами¹¹, внесение препарата «Перфторан» в минеральную среду с нефтью способствовало увеличению концентрации бактерий в сравнении с контролем в 5,5–6,8 раза уже на третьи сутки культивирования.

Источником кислорода при биоремедиации почв, в которых невозможно перепахивание грунта, может служить перекись водорода, которая разлагается под действием пероксидазы и каталазы — ферментов, которые высокоактивны у углеводородокисляющих микроорганизмов¹².

2. Создание оптимального температурного режима. Физиологическая активность микроорганизмов в значительной степени определяется температурой окружающей среды. Многочисленные данные свидетельствуют, что хорошие результаты биодеструкции микроорганизмы проявляют при температуре выше 5–10 °С. По мнению Sveinung с соавторами¹³ оптимальной температурой для разложения загрязнителей в почве является 18 °С, по данным других авторов 20–37 °С¹⁴. Одним из эффективных приемов регулирования температуры почвы в зонах с умеренным и холодным климатом является использование темной полиэтиленовой пленки¹⁵. Эффективны также и другие методы зачернения поверхности грунта: использование саж, угля, торфяной мульчи и других. Этот метод является не только достаточно эффективным в зоне низких среднегодовых температур, но и необходимым.

3. Поддержание необходимой влажности почв. Для интенсивного роста и развития растений и микрофлоры необходима оптимальная влажность, которая для разных типов почв составляет 15–35 % от массы почвы. Гидрофобность почв, обусловленная нефтяным загрязнением, ведет к ухудшению водного режима.

4. Регуляция кислотности почв. Рост и активность микроорганизмов зависит от активной кислотности (рН) среды. Кислотность почв, например, играет важную роль в разложении нефти. Значения рН, близкие к нейтральным (7.0), являются оптимальными для роста на углеводородах большинства микроорганизмов. Нейтральные значения среды оптимальны для разложения большинства поллютантов, загрязняющих почву. В ходе экспериментов установлено, что многие углеводородокисляющие микроорганизмы активнее растут в интервале рН 6.0–7.5¹⁶, у половины испытанных культур в пределах этих значений рН наблюдалось максимальное потребление нефти. В кислых почвах для создания оптимального уровня рН рекомендовано проводить известкование^{9,17}. Для нейтрализации сильнощелочных загрязненных почв, превратившихся, например, в результате загрязнения нефтепродуктами в техногенные солончаки, рекомендуется гипсование, то есть внесение гипса¹⁸.

5. Внесение минеральных удобрений. В загрязненных почвах изменяются агрохимические свойства — снижается содержание таких важных элементов питания, как обменный калий, подвижный фосфор, изменяется соотношение форм азота. В зависимости от типа почвы и загрязнителя необходимо подбирать наиболее подходящий состав минеральных добавок. Для нормального роста бактерий на 10 частей углерода (С) требуется одна часть азота (N). Если это отношение больше, рост бактерий и утилизация углеводородов происходит медленно. В загрязненной почве соотношение углерод:азот может достигать 400–420 по сравнению с 17 для незагрязненной почвы¹⁹. Однако необходимо учитывать, что, например, восстановление нарушенного соотношения С:N только внесением азотных удобрений невозможно. Внесение биогенных элементов является, по мнению многих авторов, эффективным и необходимым^{6,20,21}. Например, внесение в черноземную почву азотно-фосфатных удобрений приводило к возрастанию количества углеводородокисляющих и гетеротрофных бактерий и увеличению скорости деструкции углеводородов²².

6. Внесение органических удобрений интенсифицирует процесс разложения углеводородов не только наличием в удобрениях биогенных элементов. Определяющими факторами также являются наличие в этих удобрениях микроэлементов (в таких как навоз, активный ил, биогумус), легкоусвояемых и биологически активных веществ (навоз, биогумус, сидераты, активный ил) и наличие дополнительной

активной микрофлоры (навоз, активный ил, биогумус, перегной). Кроме того, такие удобрения, как активный ил и торф, обладают высокой активной поверхностью, что обуславливает их большую адсорбционную способность²³. Торф, вследствие развитой поверхности и наличие углеводов окисляющих микроорганизмов, может служить как сорбентом нефтяных компонентов, так и их деструктором, его используют для микробиологической деструкции нефти и нефтепродуктов микроорганизмами торфов. Показано, что после физико-химической активации торфа количество исследуемых в нем углеводов окисляющих микроорганизмов возрастает в 100 раз²⁴. Таким образом, органические удобрения оказывают стимулирующее воздействие на интенсивность деструкции.

7. Диспергирование с помощью поверхностно-активных веществ. Значительный эффект на очистку и биоремедиацию загрязненных поллютантами, например, нефтью и нефтепродуктами, объектов оказывают поверхностно-активные вещества (ПАВ), которые увеличивают степень дисперсности гидрофобных субстратов и их растворимость и тем самым улучшают физические и водно-воздушные свойства почвы, обеспечивают улучшение контакта клеток с углеводородным субстратом, кислородом и питательными веществами, что интенсифицирует биоутилизацию нефти. Моющие вещества вымывают мазут из почвы вместе с водой и влияют на активность микроорганизмов. Однако, повышение концентрации ПАВ до 5% вызывает угнетение микрофлоры^{25–27}. С целью активизации биodeградации нефти в почве применяются ПАВ-С1, неонол АФ-14, ПАВ ОП-10, полиакрилонитрил. По данным Киреевой²⁸, после внесения ПАВ (неонола АФ-14) в дозе 1 мг на 1 г АСВ загрязненной нефтью почвы было отмечено увеличение численности основных групп микроорганизмов (гетеротрофов, актиномицетов и целлюлозо-разрушающих).

8. Фитомелиорация — один из наиболее экономичных и биологически-ориентированных способов очистки почв от нефти. Фитомелиорация подразумевает применение растений для очистки загрязненных экосистем от токсичных органических трудноразлагаемых веществ, тяжелых металлов, радионуклидов и других загрязнителей. Успешная очистка от загрязнений происходит за счет комплексного воздействия на загрязненный субстрат микробно-растительного комплекса. Микроорганизмы, находящиеся в ризосфере растений, обладают повышенной скоростью деструкции ксенобиотиков, обусловленной выделениями растений. Считается, что лег-

кодоступные аминокислоты, углеводы, органические кислоты, содержащиеся в выделениях растений, повышают разложение органических загрязнителей микроорганизмами вследствие кометаболизма. Однако присутствие легкоусвояемых соединений в выделении корней может и затормозить деструкцию трудноразлагаемых ксенобиотиков из-за эффекта катаболитной репрессии²⁹. По данным Исмаилова⁸, посев в нефтезагрязненную почву бобовых и злаковых растений, посадка плодовых деревьев улучшает аэрацию почв, создает условия для интенсификации жизнедеятельности почвенных микроорганизмов, ускоряет процесс минерализации нефти и, следовательно, является приемом интенсивной рекультивации. Постоянный рост корневой системы растений приводит к рыхлению почвы, что улучшает водный и воздушный режимы почвы. Результатом является успешная микробная деградация органических поллютантов.

9. Внесение микроорганизмов в почву. Активацию аборигенных почвенных микроорганизмов, способных к деструкции ксенобиотиков, можно производить внесением в почву различных микроорганизмов из разнообразных систематических групп (цианобактерии, дрожжи, вермиккультура — кольчатые черви).

10. Иммобилизация микроорганизмов. Иммобилизованные микроорганизмы обладают более высокой активностью и стабильностью, обладают большим сроком жизни в реакционной среде по сравнению с необработанными клетками. Для иммобилизации клеток микроорганизмов могут быть использованы адсорбенты органической (хитин, целлюлоза и т. д.) или неорганической (глины, песок, кремнеземы, угли и т. д.) природы, искусственные неорганические носители (углеродные материалы, металлические сплавы, керамика и т. д.) и синтетические полимеры (полиэтилен, нейлон, полиуретаны и т. д.). Иммобилизация микроорганизмов путем адсорбции позволяет значительно повысить эффективность биodeградации. У адсорбированных на углеродсодержащих носителях родококков более чем в 3 раза возрастает оксигеназная активность по сравнению с аналогичными показателями свободных клеток^{30,31}. Иммобилизация микроорганизмов путем включения в структуру гелей (агар, агароза, κ -каррагинан, желатина, коллаген, альгинат, хитозан, целлюлоза и др.) обладает рядом недостатков. Так, гель с включенными в него клетками может быть механически непрочным. Ранее для очистки окружающей среды природные гели не использовали. Однако в последнее время кальций-альгинатный гель постепенно получает все более

широкое распространение в качестве носителя штаммов-деструкторов³².

11. Внесение сорбентов. Применение сорбентов позволяет не только производить очистку почвы от ксенобиотиков и дозированно вносить удобрения и микроэлементы, но и способствует активации микрофлоры почвенного биоценоза. Наибольший вклад в активацию почвенных микроорганизмов среди сорбентов вносят сорбенты на основе торфа. В торфе, предварительно активированном введением минеральных добавок, значительно увеличивается численность углеродородокисляющих микроорганизмов³³.

12. Использование светокорректирующих пленок. Такая пленка эффективно активизирует рост и ферментативную активность почвенных бактерий³⁴.

Способность микроорганизмов к трансформации или деградации ксенобиотиков, в том числе углеводородов нефти, хорошо известна и позволяет использовать их для биоремедиации загрязненных территорий. Микробиологические процессы в почве, в том числе разложение попавших в почву поллютантов, протекают с желаемой интенсивностью лишь тогда, когда их обитатели находятся в активном состоянии. Таким образом, различные способы активации деятельности микроорганизмов почвы ведут к интенсификации разложения различных ксенобиотиков.

Литература

- Орлов Д. С., Садовникова Л. К. Дохановская И. Н. Экология и охрана биосферы при химическом загрязнении. — М.: Высшая школа, 2002. — 334 с.
- Справочник. Технологии восстановления почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами. — М.: РЭФИА, НИА-Природа, 2001. — 185 с.
- Логинов О. Н. и др. Биотехнологические методы очистки окружающей среды от техногенных загрязнений. — Уфа: Изд-во «Реактив», 2000. — 100 с.
- Jorgensen K. S., Puustinen J., Suortti A. M. // *Environ. Pollut.* — 2000. — V. 107. — P. 245.
- Вельков В. В. // *Биотехнология.* — 1995. — №3-4. — С. 20.
- Коронелли Т. В. // *Прикл. биохим. и микробиол.* — 1996. — Т. 32, №6. — С. 579.
- Оборин А. А., Калачникова И. Г., Масливец Т. А. и др. / *Восст. нефтезаг. почв.* — М.: Наука, 1988. — С. 140.
- Исмаилов Н. М., Ахмедов А. Г., Ахмедов В. А. / *Восст. нефтезаг. почв.* — М.: Наука, 1988. — С. 206.
- Самосова С. М., Фильченко В. И., Мусина Г. Х., Кипрова Р. Р., Губайдуллина Т. С. / В сб. тез. докл. конф. «Микробиологические методы борьбы с загрязнением окружающей среды». Пушкино, 1979. — С. 8.
- Исмаилов Н. М., Пиковский Ю. И. // *Восст. нефтезаг. почв.* — М.: Наука, 1988. — С. 222.
- Бакулин М. К., Дармов И. В., Кучеренко А. С., Бакулина Л. В. // *Биотехнол.* — 2004. — №3. — С. 55.
- Wilson J. T., Kampbell D. H., Armstrong J. M., Raymond R. L., Thomas J. M., Fiorenza S. // *DECHEMA-Biotechnol. Conf.* — 1989. — V. 3. — P. 45.
- Sveinung S., Aaslaug L., Arve P. T. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 1986. — V. 23, № 3-4. — P. 297.
- Atlas R. M. // *Crit. Rev. Microbiol.* — 1977. — V. 5, № 4. — P. 371.
- Gudin C, Syrratt W. // *Environ. Pollut.* — 1975. — V. 8, №2. — P. 107.
- Морозов Н. В., Николаев В. Н. // *Гидробиологический журнал.* — 1978. — №4. — С. 55.
- Демидиенко А. Я., Демурджан В. М. / *Восст. нефтезаг. почв.* — М.: Наука, 1988. — С. 197.
- Киреева Н. А., Тарасенко Е. М., Онегова Т. С., Бакаева М. Д. // *Биотехнология.* — 2004. — №6. — С. 63.
- Oudot J., Dupont J., Haloui S., Roquebert M. F. // *Soil Biol. Biochem.* 1993. — V. 25, №9. — P. 1167.
- Грищенков В. Г., Шкидченко А. Н., Воронин А. М. и др. / В сб. матер. конф. «Современные методы очистки территории от нефтяных загрязнений, утилизации отходов, аналитический контроль, приборы и оборудование». — М., 1995. — С. 114.
- Hart S. // *Environ. Sci. Technol.* — 1996. — V. 30, №9. — P. 398A
- Карасева Э. В., Гирич И. Е., Худокормов А. А. и др. // *Биотехнология.* — 2005. — №2. — С. 67.
- Чурбанова И. И. *Микробиология.* — М.: Высшая школа, 1987. — 239 с.
- Бурмистрова Т. И., Алексеева Т. П., Перфильева В. Д., Терещенко Н. Н., Стахина Л. Д. // *Химия растительного сырья.* — 2003. — № 3. — С. 69.
- Samuel R. R., Stack A., Weston L. // *Abstr. Gen. Mett. Am. Soc. Microbiol.* — 1996. — V. 96. — P. 439.
- Furtado M. A. L. // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* — 1996. — V. 37, №1-2. — P. 122.
- Jimenez I. Y., Bartha R. // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1996. — V. 62, №7. — P. 2311.
- Киреева Н. А. Микробиологические процессы в нефтезагрязненных почвах: Автореф. ... докт. биол. наук. — СПб. — 1996. — 25 с.
- Назаров А. В., Иларионов С. А. // *Биотехнология.* — 2005. — №5. — С. 54.
- Коваленко Г. А., Перминова Л. В., Хомов В. В. // *Биотехнология.* — 2006. — №1. — С. 76.
- Демаков В. А., Максимова Ю. Г., Максимов А. Ю. // *Биотехнология.* — 2008. — №2. — С. 30.
- Федоров А. Ю., Волченко Е. В., Сингирцев И. Н. и др. // *Прикладная биохимия и микробиология.* — 2000. — Т. 36, № 1. — С. 59.
- Пат. 2137559 РФ Способ очистки почвы от загрязнения нефтью и нефтепродуктами / Алексеева Т. П., Терещенко Н. Н., Бурмистрова Т. И., и др. // Б. И. — 20.09.1999.
- Филатов Д. А., Сваровская Л. И., Алтунина Л. К. Биодеструкция нефтяного загрязнения с применением светокорректирующей пленки в комплексе с минеральной подкормкой / В сб. «Научное творчество молодежи» Материалы XIV Всерос. науч.-практ. конф. — Томск: Изд-во Том. ун-та, 2010. — Ч. 1. — С. 232.