

УДК 577.15+623.459

Основные технологические операции и стадии биоремедиации почв и очистки вод *in situ*

© 2014. Н. В. Завьялова¹, д.б.н., г.н.с., И. В. Филимонов¹, к.т.н., с.н.с.,
В. А. Ковтун¹, к.х.н., зам. командира, А. Н. Голипад¹, к.т.н., начальник управления,
С. В. Петров¹, д.т.н., г.н.с., К. К. Стяжкин¹, д.б.н., начальник, Е. Н. Ефременко², д.б.н.,
зав. лабораторией, В. И. Холстов³, д.х.н., директор, А. А. Янковская⁴, офицер отдела,

¹27 Научный центр Минобороны России,

²Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова,

³Департамент реализации конвенционных обязательств

Министерства промышленности и торговли Российской Федерации,

⁴Федеральное управление по безопасному хранению и уничтожению химического оружия,

e-mail: natzavjalova@rambler.ru

В статье приведены разработанные технологические операции и стадии биотехнологических способов проведения ремедиации почв и очистки вод с помощью экобиопрепаратов на основе ферментов и микроорганизмов-деструкторов. Представлена структурная схема и изложен порядок действий при проведении санации территорий *in situ* на ОХУХО.

Технологические операции, стадии, структурная схема и порядок действий при проведении биоремедиации почв и очистки вод *in situ* имеют универсальный характер, могут быть применены для обезвреживания любых продуктов детоксикации ФОВ, полученных при различных технологиях химической нейтрализации и свидетельствуют о возможности осуществления, на основе биокаталитических и микробиологических процессов, экологически безопасной биоремедиации почв и очистки вод и проведения обезвреживания значительных объёмов и концентраций загрязнителей, а также больших территорий.

The work presents the main technological operations and stages of biotechnological methods of remediation of soils and water purification using ecological and biological preparations based on enzymes and microorganisms- destructors. Is a block diagram, and set out the procedures for carrying former chemical weapons storage and destruction facilities.

The technological operations, stages, blocks of diagrams and stages of operations during realization *in situ* have a universal character. They can be used in neutralizing of any organophosphorus agents, talon from different chemical technologies and are evidence of possibility of realization, on the base of biocatalysts and micro-biological processes, bioremediation ecology security of soils and water purification and realization of neutralizing of considerable volumes and concentrate of agents, and large territories.

Ключевые слова: микроорганизмы-деструкторы, биокатализатор, биоремедиация почв и очистка вод, детоксикация фосфорорганических отравляющих веществ, фермент, экотоксиканты.

Keywords: microorganisms-destructors, biocatalysts, bioremediation of soils and water purification, detoxication organophosphorous agents, enzyme, toxic substances.

Федеральной целевой программой «Уничтожение запасов химического оружия в Российской Федерации» предусмотрено соблюдение санитарных норм и правил, санитарно-гигиенических нормативов и стандартов безопасности, регламентирующих работы по хранению и уничтожению ХО, конверсии или уничтожению объектов по его производству или разработку, а также работы по ликвидации последствий деятельности ОХУХО, включая разработку технологий санации загрязнённых территорий и осуществление этих работ

в сроки, установленные Правительством Российской Федерации [1].

Санитарные правила СП 2.2.1.2513-09 предусматривают проведение санации территорий ОХУХО при выводе их из эксплуатации, но не определяют технологий очистки [2]. Поэтому на этапе завершения процесса уничтожения ХО важной задачей является выбор наиболее перспективных направлений и разработка конкретных технологий санации.

Необходимость разработки таких технологий связана с тем, что сверхнормативное

загрязнение природной среды вероятно не только в случае аварий, но и при работе ОХУХО в штатном режиме.

При работе ОХУХО в штатном режиме возможно рассеивание и распространение продуктов детоксикации ОВ. Загрязнения территорий могут быть незначительны по количественному показателю, однако площадь таких территорий может превосходить размеры самой промышленной площадки Объекта. Так на примере ОХУХО в п. Горный [3] показано, что фито- и генотоксичность проб почвы на территории санитарно-защитной зоны (СЗЗ) и зоны защитных мероприятий (ЗЗМ) отличается. Всхожесть семян растений (одуванчик лекарственный – *Taraxacum officinale* Wigg. l) из района объекта оказалась в 1,5–2 раза ниже, а уровень хромосомных aberrаций выше, чем у семян растений из экологически чистых зон (Саратовский р-н, с. Багаевка), причём, чем выше был уровень загрязнения, тем ниже была всхожесть.

Это может быть следствием длительного срока хранения ХО на этом объекте (с 40-х годов). При этом требования по экологии были значительно ниже, чем в настоящее время. Известно, что такие загрязнения могут быть причиной также отдалённых последствий таких, как: торможение хода почвообразовательных процессов и самоочищения почв; снижение урожайности; накопление вредных веществ в окружающей среде, в водных бассейнах, в растениях. Указанные последствия прямо или опосредованно могут оказывать влияние на организм человека.

Разнообразие природных условий, в которых расположены ОХУХО, характер и степень фонового и специфического загрязнения компонентов природной среды исключают возможность использования какой-то одной технологии и одного препарата детоксикации специфических загрязнений. В связи с этим при разработке мероприятий по очистке загрязнённых территорий необходимо учитывать результаты наблюдений, оценки и прогноза, оформленные в виде карт рассеивания и распространения контролируемых соединений в компонентах природной среды (почве, воде, воздухе) с указанием уровней загрязнения [4].

Для санации загрязнённых территорий могут быть использованы физические, химические, физико-химические и биотехнологические методы или их комбинации.

В зависимости от масштаба и степени загрязнения территорий возможны два основных подхода: снятие верхнего слоя почвы для обра-

ботки на специальных установках (реакторах) и деструкция вредных веществ непосредственно на месте – *in situ*.

Биотехнологические методы предусматривают использование бактерий и продуцируемых ими ферментов, активного ила, фиторемедиацию, грибковые технологии и др.

Согласно оценкам экспертов [5] биотехнологии очистки почв и вод значительно экономичнее традиционных физико-химических способов. Применение биокатализаторов на основе клеток-деструкторов примерно в 50 раз дешевле принятых химических или физических методов. Использование биотехнологий позволяет решить проблему вторичных загрязнений, так как разрушение ксенобиотиков можно провести без накопления вредных или токсичных вторичных продуктов. Кроме того, благодаря использованию ферментов, специальных анаэробных или аэробных штаммов деструкторов или их консорциумов возможно осуществить обезвреживание значительных объёмов и концентраций загрязнителей, а также больших территорий. Бионейтрализация ФОВ и продуктов их детоксикации делает процесс их уничтожения полностью необратимым [6].

Целью биоремедиации почв и очистки вод, загрязнённых ФОВ и продуктами их детоксикации, является полная минерализация загрязнителей с помощью биокатализаторов на основе ферментов, штаммов-деструкторов или их консорциумов. Биоразложение фосфонатов протекает за счёт прямого расщепления P-F, P-O, C-S, P-CN и даже C-P связей [7].

Возможность биодеструкции практически всех ФОВ в малых концентрациях и любых продуктов их детоксикации с помощью микроорганизмов и ферментов, выделенных из тканей беспозвоночных, инфузорий и бактерий, была показана в исследованиях 1980–90 гг. [8].

В настоящее время в мире наиболее целесообразным с экологической точки зрения признаётся очистка почв и вод *in situ*, поскольку не требуется снятия и транспортировки загрязнённых слоёв почвы. Кроме того, не уничтожается гумус, что имеет место при термической обработке, когда потеря его составляет до 60%, и не требуется внесение большого количества реагентов (до 100 л/м³ почвы рецептуры «Макс»), как при химической обработке.

Требуемое для внесения количество биопрепарата составляет 4,0–30,0 мг на квадратный метр или 40,0–300,0 г на гектар [9].

Как наиболее перспективные для получения экибиопрепаратов для очистки загряз-

нённых территорий ОХУХО были отобраны ферменторганофосфатгидролаза (ОФГ, ЕС 3.1.8.1) с гексагистидиновой последовательностью (His₆-ОФГ) на N-конце молекулы белка и штамм микроорганизмов-деструкторов *Pseudomonas specias 78Г* [5, 6, 10]. Немаловажным фактором, обуславливающим указанный выбор, является их безвредность для окружающей среды – отсутствие токсичного и экотоксичного действия – и возможность масштабной наработки препаратов для практического использования [9, 11].

Внешний вид препарата фермента His₆-ОФГ, биокатализатора, созданного на его основе и делигнифицированной пшеничной соломы, а также гранул биокатализатора на основе клеток-деструкторов *Ps. sp 78Г*, иммобилизованных в криогель поливинилового спирта (ПВС) представлены на рисунках 1 и 2.

Основные технологические операции и стадии биотехнологических способов ремедиации почв и очистки вод *in situ* с помощью биокатализаторов на основе ферментов и микроорганизмов-деструкторов

Анализ отечественных и зарубежных литературных источников по биотехнологическим способам санации почв и очистки вод выявил, что стадии и технологические операции ремедиации почв и очистки вод от ФОВ и продуктов их детоксикации *in situ* конкретно не описаны, также отсутствуют предложения по порядку действий при проведении биоремедиации почв и очистки вод на ОХУХО.

Исходя из вышесказанного, нами были предложены стадии биотехнологической ремедиации почв и очистки вод, загрязнённых ФОВ и продуктами их детоксикации, *in situ*. Кроме того, была разработана структурная схема экологически безопасной санации почв и очистки вод в местах бывшего производства, хранения, уничтожения и исследования ФОВ и предложен порядок действий при проведении ремедиации почв и очистки вод с помощью биокатализатора ОХУХО (далее по тексту – Порядок действий).

По нашему мнению, биоремедиацию почв и очистку вод следует проводить *in situ* в три стадии.

На **первой стадии** биоремедиации почв и очистки вод *in situ* при слабом загрязнении необходимо проводить стимуляцию роста природных микроорганизмов-деструкторов путём аэрации и введения питательных ве-

ществ. Благодаря тому, что почва содержит огромное многообразие микроорганизмов, при оптимизации основных параметров их жизнедеятельности достигается быстрая и эффективная трансформация многих веществ органического происхождения, загрязняющих природную среду. Питательные вещества и кислород следует вводить через специальные скважины на глубину до 40 см.

В случаях, когда загрязняющие соединения, попавшие в почву, не являются сильно токсичными, иногда достаточно использования обычных агротехнических приёмов с внесением необходимых минеральных удобрений, чтобы способствовать быстрому самоочищению пахотного слоя.

При среднем загрязнении на первой стадии кроме внесения питательных веществ и кислорода через специальные скважины или непосредственно на поверхность почвы следует вносить биокатализаторы на основе ферментов и штаммов микроорганизмов-деструкторов или их консорциумов в виде суспензий, препараты в лиофилизированном или иммобилизованном состоянии, а также проводить адаптацию этих препаратов к местным условиям. При такой обработке используются биокатализаторы, обладающие деструктивной активностью по отношению к установленным определённым токсичным веществам.

При сильном загрязнении в почву и воду следует вносить биокатализаторы – иммобилизованные ферменты или бактерии-деструкторы, устойчивые к большим концентрациям экотоксикантов, и проводить адаптацию этих препаратов к местным условиям. Кроме того, закачивать питательные вещества и кислород необходимо на протяжении нескольких дней или недель.

Применение ферментных и микробных биокатализаторов в иммобилизованном виде наиболее предпочтительно в случаях средней или сильной степени загрязнения, поскольку иммобилизация фермента и штаммов-деструкторов, направленная на их стабилизацию, позволяет рассчитывать на увеличение длительности пребывания в месте введения в почву или грунтовые воды, что особенно важно в случае применения на практике. Также иммобилизация биокатализаторов обеспечивает возможность их многократного использования в условиях высоких концентраций токсичных субстратов.

На **второй стадии** биоремедиации почв и очистки вод *in situ* определяются: жизнеспособность естественной биоты почвы и воды, а также жизнеспособность и деградирующая

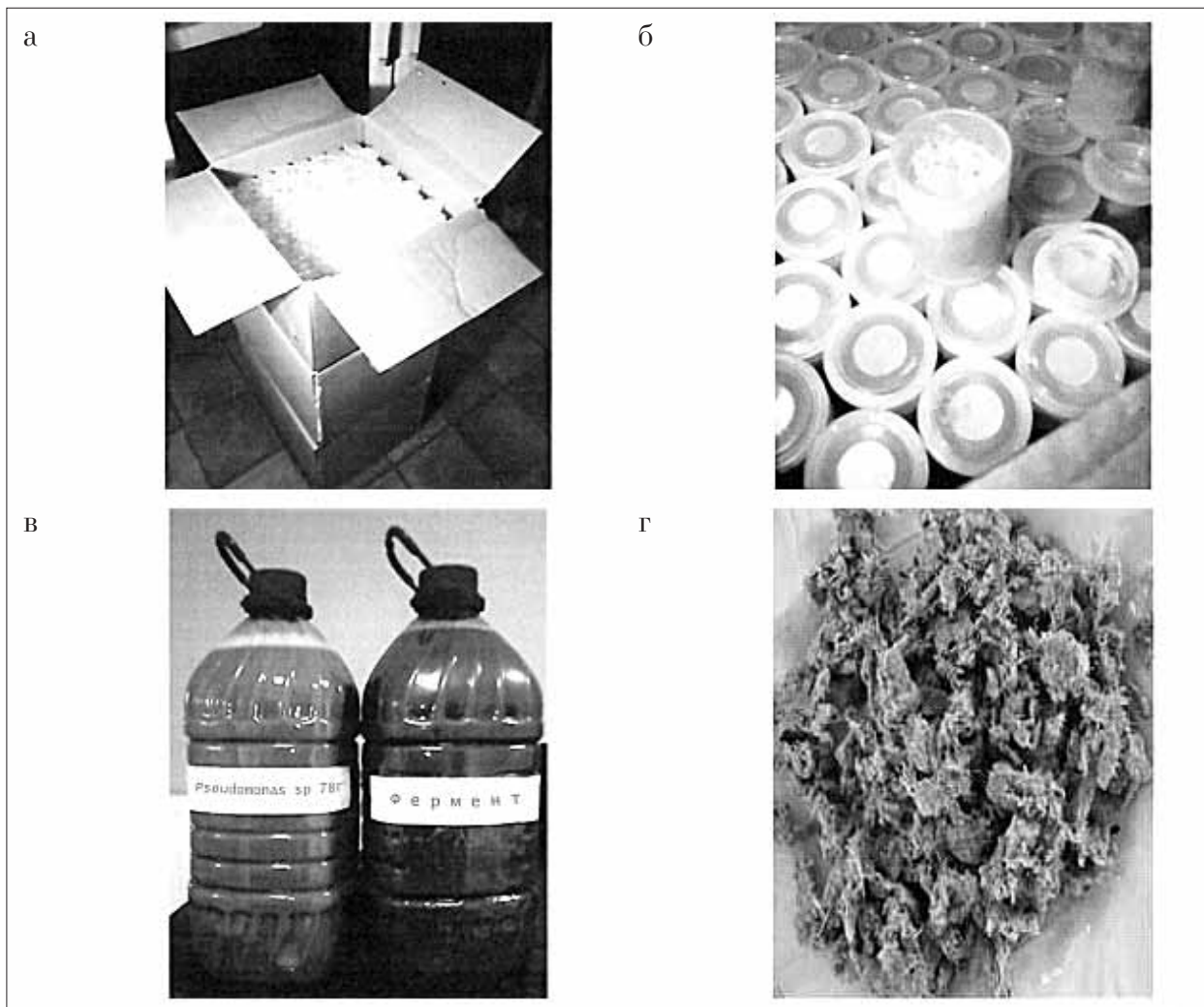


Рис. 1. Препарат фермента His₆-ОФГ:

а, б – полученный для длительного хранения; в – подготовленный для использования в процессе деструкции загрязнителей почв и вод от ФОВ; г – в виде катализатора на основе фермента и делигнифицированной пшеничной соломы.

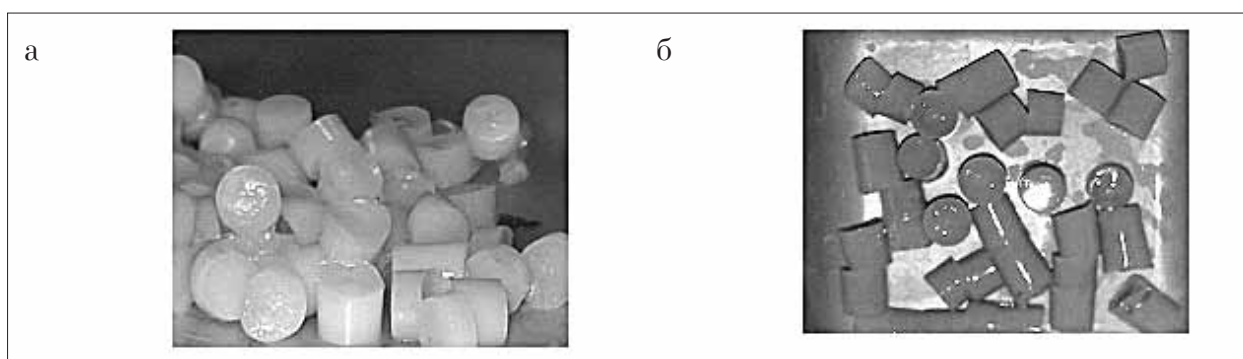


Рис. 2. Гранулы биокатализатора с клетками *Pseudomonas sp78Г*, иммобилизованными в криогель ПВС:

а – первично приготовленные; б – переплавленные из ранее использованных гранул.

активность биокатализаторов; остаточные концентрации загрязнителей и, при необходимости, вносятся дополнительные количества биокатализаторов.

Внесение биопрепаратов в почву следует проводить с аэрированными на специальной

установке грунтовыми водами по методу Biox-S. При сильном загрязнении закачку питательных веществ, кислорода и биокатализаторов можно проводить несколько раз.

На **третьей стадии** обработки почвы *in situ* аналитическими методами определяются пери-

од разрушения загрязнителей, а также степень ремедиации почв и очистки вод. Период очистки может варьировать от нескольких часов и дней до нескольких недель, в зависимости от деградирующей способности использованных биокатализаторов, а также от площадей и степени загрязнённости территории.

Для определения полноты биодеструкции, времени протекания процесса биоремедиации и жизнеспособности микроорганизмов-деструкторов проводится отбор проб через специальные скважины. Пробы анализируются, результаты заносятся в специальные протоколы.

После завершения процесса санации, когда почва и вода полностью очищаются от экотоксикантов или степень загрязнённости достигает ПДК, содержание внесённых в почву микроорганизмов резко снижается.

Во всех случаях очистки почв и вод от загрязнений завершающим моментом является токсикологический тест с использованием живых микроорганизмов [12–15]. Биотестирование позволяет выбрать способы, которые обеспечивают достаточное разложение загрязнителей, и дать гарантированную оценку полноты детоксикации почвы и грунтовых вод. Это особенно актуально при загрязнении почвы и воды продуктами деструкции ОВ.

Структурная схема экологически безопасной ремедиации почв и очистки вод в местах бывшего производства, хранения, уничтожения и исследования фосфорорганических отравляющих веществ

Разработанная структурная схема экологически безопасной ремедиации почв и очистки вод в местах бывшего производства, хранения, уничтожения и исследования фосфорорганических отравляющих веществ представлена на рисунке 3.

После выявления факта химического загрязнения территории необходимо отобрать пробы для установления характера, степени загрязнения почв и вод и определения масштабов загрязнённых территорий (1); составить характеристику местности (2); определить тип почвы, её влажность и рН, а также процент содержания гумуса.

На основании составленной характеристики, используя методы оценки токсического действия продуктов деструкции ОВ на естественные микроорганизмы почвы и воды (3), а также методы оценки токсического действия продуктов деструкции ОВ на биокатализаторы

на основе ферментов и микроорганизмов-деструкторов (4) необходимо подобрать методы внесения и адаптации (5, 6, 9). Осуществить выбор биокатализаторов и отбор микроорганизмов-деструкторов из музея (7, 8).

Используя методы культивирования и наработки биомассы штаммов деструкторов и методы получения биокатализаторов, наработать катализаторы в рассчитанных необходимых количествах (10, 11, 12, 13). Выбирать технологический принцип деградации загрязнителей. Разработать рекомендации по технологическим параметрам. Используя методы количественного определения, установить степень биодеструкции продуктов детоксикации ФОВ (14–16). Провести ремедиацию почв и очистку вод.

В случаях сильного загрязнения, когда возникает необходимость съёма верхних слоёв почвы, необходимо провести расчёт количества ёмкостей, необходимых для перемещения снятой почвы, смеси воды и почвы к биореакторам специальной установки по биодеструкции загрязнителей. Провести перемещение почвы, смеси воды и почвы и осуществить биодеструкцию в реакторах.

Осуществить контроль над процессом ремедиации и очистки (17).

По окончании процесса выдаётся заключение об эффективности ремедиации почв и очистки вод и осуществляется передача очищенной территории в хозяйственное пользование (18).

Порядок действий при проведении биоремедиации почв и очистки вод, загрязнённых ФОВ, и продуктами их детоксикации, *in situ*

На основании разработанной схемы экологически безопасной санации почв и очистки вод в местах бывшего производства, хранения, уничтожения и исследования ФОВ предложен Порядок действий, который представлен на рисунке 4.

Порядок действий включает в себя 5 этапов: на первом этапе – принятия решения о проведении биоремедиации почв и очистки вод – проводится сбор исходных данных о рельефе местности, растительности, типе и особенностях почв, определяется рН, температура грунтовых вод и глубина их залегания, определяется качество и количество экотоксикантов, обнаруженных на загрязнённой территории, проводится бурение скважин, подбираются биокатализаторы, рассчитывается необходимое их количество;

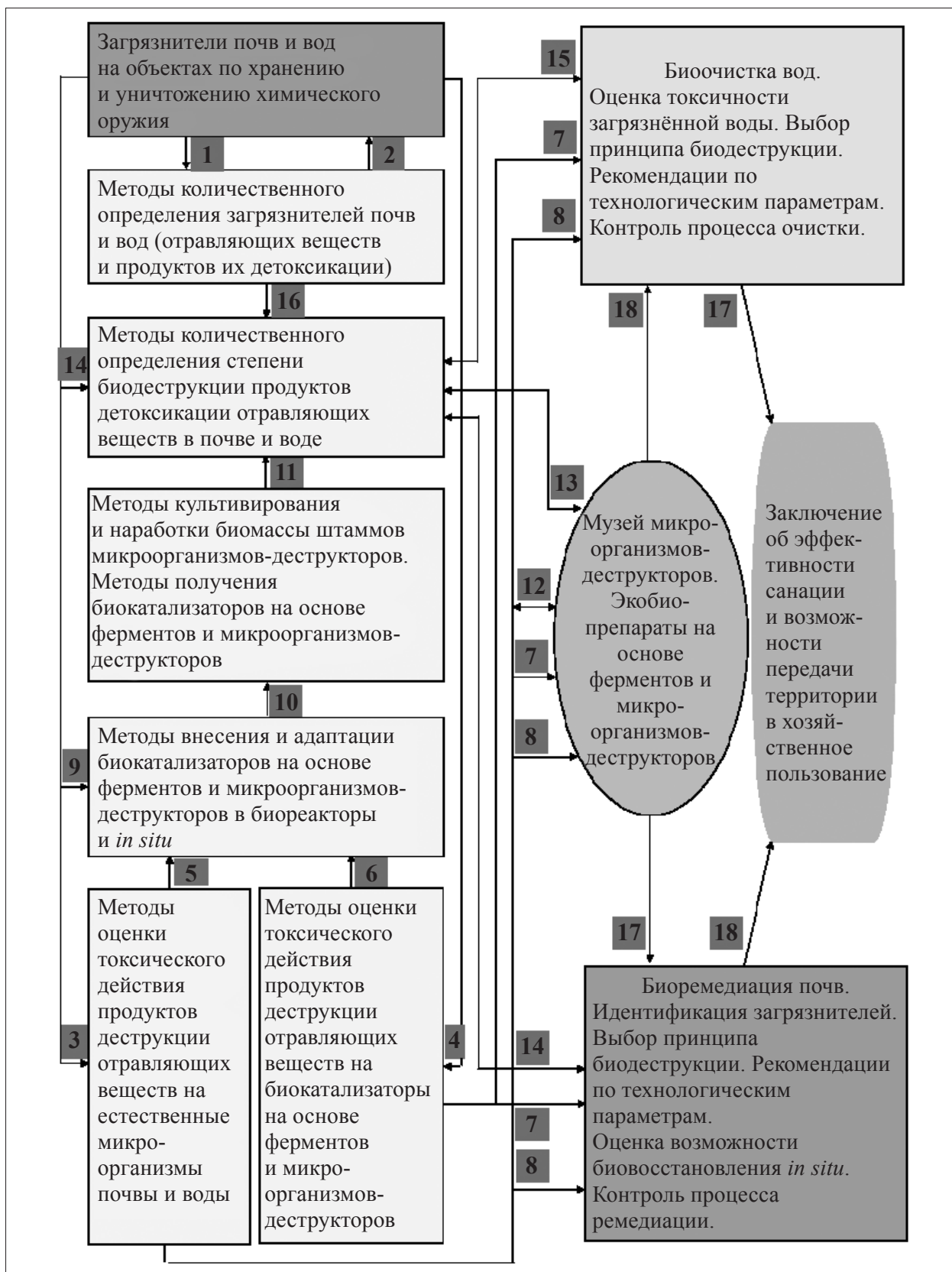


Рис. 3. Структурная схема экологически безопасной ремедиации почв и очистки вод.

на втором этапе – подготовки биокатализаторов – выбираются штаммы-деструкторы и ферменты для получения биокатализаторов,

проводится культивирование и наработка биомассы штаммов микроорганизмов деструкторов, производится необходимое количество

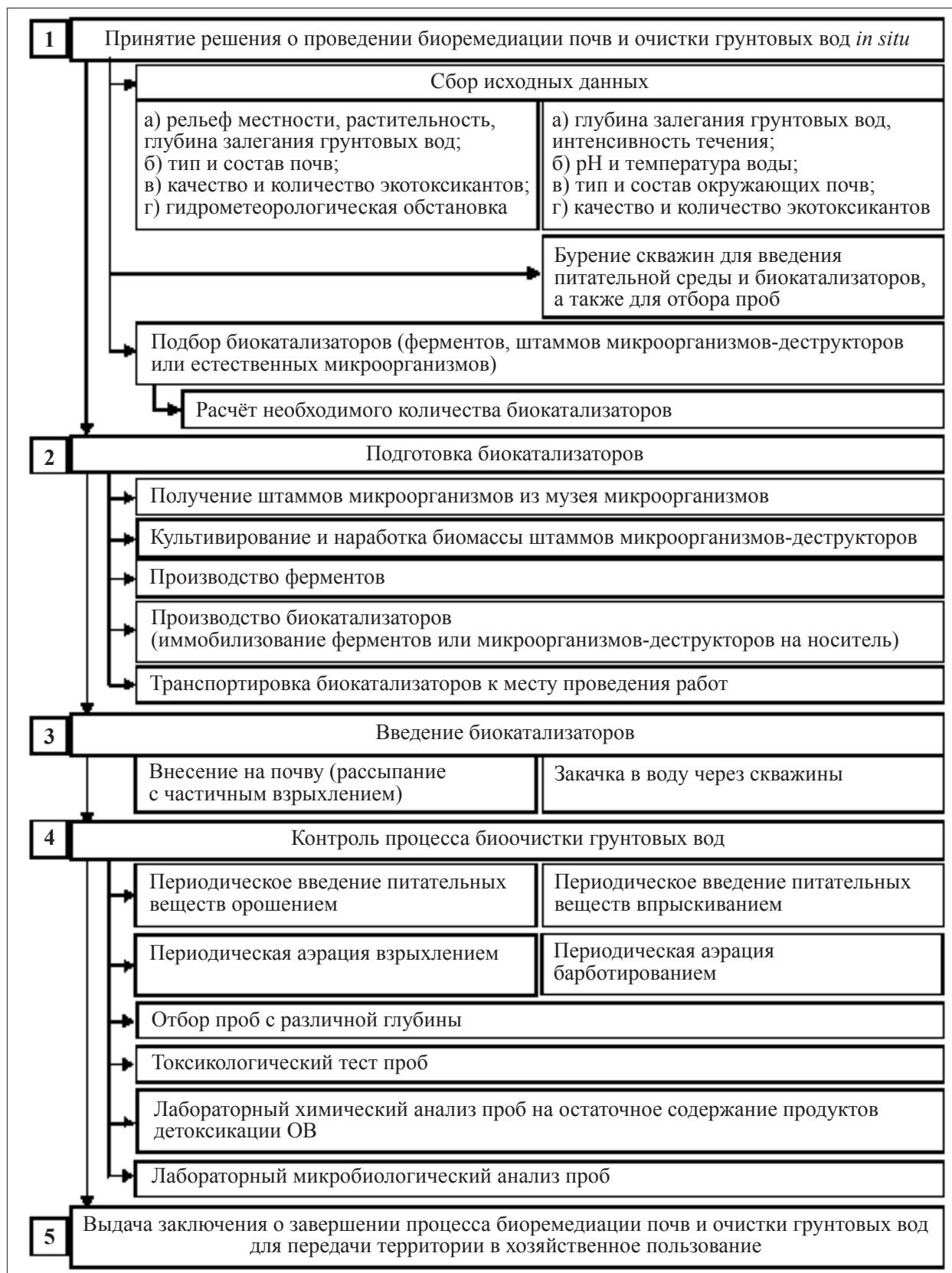


Рис. 4. Порядок действий при биоремедиации почв и грунтовых вод *in situ*.

фермента, производится рассчитанное количество биокатализаторов и проводится транспортировка к месту проведения работ;

на третьем этапе вносятся биокатализаторы на почву или вводятся биокатализаторы в воду через скважины;

на четвёртом этапе осуществляется контроль над процессом биоремедиации почвы и процессом биоочистки грунтовых вод, который включает в себя: периодическое введение питательных веществ; аэрацию взрыхлением или барботированием; отбор проб почвы и воды с различной глубины; токсикологические тесты проб почв и воды; лабораторные химические анализы проб почвы и воды на остаточное содержание продуктов детоксикации отравляющих веществ; лабораторные микробиологические анализы проб почвы и воды;

на пятом этапе составляется заключение об эффективности проведённой ремедиации почв и очистки вод для передачи очищенных территорий в хозяйственное пользование.

Заключение

Представленные в данной работе технологические операции, стадии биотехнологических методов проведения ремедиации почв и очистки вод с помощью экобиопрепаратов на основе ферментов и микроорганизмов-деструкторов, способных разрушать продукты детоксикации ФОВ, разработанная структурная схема экологически безопасной ремедиации почв и очистки вод в местах бывшего производства, хранения, уничтожения и исследования ФОВ, разработанный порядок действий при проведении биоремедиации почв и очистки вод *in situ* имеют универсальный характер, могут быть применены для обезвреживания любых продуктов детоксикации ФОВ, полученных при различных технологиях химической нейтрализации и свидетельствуют о возможности осуществления, на основе биокаталитических и микробиологических процессов, экологически безопасной биоремедиации почв и очистки вод.

Литература

1. Постановление Правительства Российской Федерации от 21.03.1996 г. № 305 об утверждении Федеральной целевой программы «Уничтожение запасов химического оружия в Российской Федерации» (в ред. Постановлений Правительства РФ от 24.10.2005 № 639, от 21.06.2007 № 392, от 29.12.2007 № 969, от 12.09.2008 № 679, от 09.12.2010 № 1005, от 29.11.2011 № 988, от 27.12.2012 № 1420).

2. Санитарные правила СП 2.2.1.2513-09. Гигиенические требования к размещению, проектированию, строительству, эксплуатации и перепрофилированию объектов по уничтожению химического оружия, реконструкции зданий и сооружений и выводу из эксплуатации объектов по хранению химического оружия.

3. Чупис В.Н., Емельянова Н.В., Полухина Н.В. и др. Генетический мониторинг загрязнения окружающей среды в районах объектов уничтожения химического оружия // Научно-методические и законодательные основы обеспечения генетической безопасности факторов и объектов окружающей и природной среды в целях сохранения здоровья человека: Материалы объединённого пленума Научных советов Минздравсоцразвития России и РАМН по экологии человека и гигиене окружающей среды и по медико-экологическим проблемам здоровья работающих / Под общ. ред. акад. РАМН Рахманина Ю.А. и Измерова Н.Ф. М.: 2010. С. 170–174. ГОСТ Р 53009-2008. Системы экологического контроля и мониторинга. Общие руководящие указания по созданию, внедрению и обеспечению функционирования на объектах по уничтожению химического оружия.

5. Ефременко Е.Н., Завьялова Н.В., Холстов В.И. и др. Имобилизованные гетерогенные биокатализаторы для разложения фосфорорганических отравляющих веществ // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. 2011. № 1. С. 61–66.

6. Ефременко Е.Н., Завьялова Н.В., Холстов В.И. и др. Имобилизованные биокатализаторы на основе органофосфатгидролазы в процессах разложения фосфорорганических отравляющих веществ // Теоретическая и прикладная экология. 2011. № 4. С. 26–31.

7. Гудков Д.А.: Автореф. дис. ... канд. хим. наук. М.: МГУ. 2009. 25 с.

8. Харечко А.Т., Мягких В.И., Завьялова Н.В. и др. Применение микроорганизмов для деструкции опасных веществ, загрязняющих окружающую среду // РХЖ. 1993. Т. XXXVII. № 3. С. 40–43.

9. Сироткина М.С. Имобилизованные биокатализаторы для деструкции фосфорорганических соединений и продуктов их разложения: Автореф. дис. ... канд. хим. наук. М.: МГУ. 2013. 25 с.

10. Ефременко Е.Н., Варфоломеев С.Д., Завьялова Н.В. и др. Отчёт о НИР, шифр «Богема». М.: МГУ, 2006. 198 с.

11. Бакулин Ю.С., Завьялова Н.В., Харечко А.Т., Холстов В.И. и др. Экспериментальная проверка био-деструкции реакционных масс химической детоксикации ФОВ фосфонат-разлагающими бактериями // Федеральные и региональные проблемы уничтожения химического оружия. М.: ВИНТИ, сборник выпуск № 2. 2000. С. 47–52.

12. ОСТ В-84-2398-88. Биотестирование отраслевых сточных вод. Основные положения.

13. ОСТ В-84-2399-88. Биотестирование отраслевых сточных вод. Методы анализа.

14. Авторское свидетельство 228210 СССР. Способ определения токсичности сточных вод, содержащих компоненты РТ. 1984.

15. Авторское свидетельство 258499 СССР. Определение токсичности веществ по интенсивности потребления растворённого кислорода микроорганизмами. 1985.