

РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ ВОЗМОЖНОСТИ СНИЖЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ИОНОВ ЦИНКА В ОТХОДАХ ГАЛЬВАНИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА БИОЛОГИЧЕСКИМ СПОСОБОМ («МИКРОБИАЛЬНЫМ КОКТЕЙЛЕМ»)

Майоров Павел Сергеевич, аспирант кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Васильев Дмитрий Аркадьевич, доктор биологических наук, профессор кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА

432017, г. Ульяновск, б. Новый Венец, 1; тел.: 8(8422)55-95-47

e-mail: feokna@yandex.ru

Ключевые слова: бактерии, *Bacillus*, *Pseudomonas*, цинк, промышленные сточные воды, биологическая обработка загрязнителей.

В статье представлены результаты исследований по подбору штаммов бактерий с целью создания биопрепарата для снижения концентрации тяжелых металлов в отходах гальванического производства. Установлено, что бактерии рода *Bacillus*, *Pseudomonas alcaligenes* и сульфатредуцирующие бактерии (*Desulfovibrio desulfuricans*) способны к созданию симбиотического микробного сообщества. Эффективность эксперимента изучалась методом измерения массовой концентрации ионов цинка в пробах отходов гальваносток, содержащих «микробный коктейль», фотометрическим методом с сульфарсазеном. Фотометрический анализ показал, что оптическая плотность пробы с «микробным коктейлем» значительно ниже контрольной пробы с нативным образцом. Установлено, что концентрация ионов цинка в пробе, содержащей микроорганизмы-симбионты, снизилась в 22 раза, что свидетельствует об их способности эффективно адсорбировать ионы цинка в отходах гальванического производства.

Введение

Загрязнение окружающей природной среды – один из факторов, наиболее существенно влияющих на продолжительность жизни и здоровье людей. Загрязнение окружающей природной среды и ее техногенное преобразование приобретают глобальный характер. Одним из наиболее опасных источников загрязнения атмосферы и гидросферы является гальваническое производство. Гальваническое производство связано с образованием большого количества сточных вод и твердых отходов. Наибольшую опасность представляют отходы, образующиеся при реагентной очистке сточных вод. Поиск оптимальных путей выхода из сложившейся ситуации становится все более актуальным [1].

Биологический метод очистки, предполагающий использование симбионтов

микроорганизмов различных семейств, позволяет эффективно извлекать ионы тяжелых металлов и является наиболее перспективным в настоящее время. Он направлен на решение таких задач, как предотвращение вредного воздействия растворов шламов, полученных в результате гальванического производства по оцинковыванию металлоизделий, на окружающую среду, извлечение тяжелых металлов и превращение их во вторичное сырье и, в конечном итоге, снижение класса опасности отходов до 4-го и 5-го уровней. Отходы данных классов опасности являются относительно безвредными и безопасными для окружающей среды [2, 3].

Цель и задачи исследований

Целью наших исследований является изучение возможности снижения концентрации ионов цинка в отходах гальванического производства при помощи

бактерий родов *Bacillus*, *Pseudomonas alcaligenes* и сульфатредуцирующих бактерий *Desulfovibrio desulfuricans*.

Для достижения поставленной цели нами были сформулированы задачи:

- подбор микроорганизмов-симбионтов, способных осуществлять биохимические процессы при достаточно критических значениях pH (от 4 до 10) при средней температуре культивирования 20 ± 2 °C и адсорбировать при этом ионы цинка;

- построение градуировочного графика и определение оптической плотности проб;

- определение массовой концентрации ионов цинка в пробах.

Объекты и методы исследований

В работе использовали референс-штаммы бактерий рода *Bacillus*, вида *Pseudomonas alcaligenes*, сульфатредуцирующие бактерии *Desulfovibrio desulfuricans*, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО «Ульяновская ГСХА», которые хранились при температуре $+2-4^{\circ}\text{C}$ и культивировались на мясopептонном бульоне и коммерческой среде Постгейта при температуре $+33 \pm 3^{\circ}\text{C}$; полевые штаммы бактерий рода *Bacillus*, выделенные нами из проб торфосорбентов и почвы Приволжского Федерального округа (для идентификации бактерий применяли схему R.Gordon [4], R.A. Slepescu, H.T. Nemphill [5-6] и специфические бактериофаги рода *Bacillus* [7-11]). Параметры культивирования бактерий рода *Bacillus*, вида *Pseudomonas alcaligenes*, сульфатредуцирующие бактерии *Desulfovibrio desulfuricans* были подобраны эмпирическим методом [12-13].

Изучение физико-химических свойств микроорганизмов (рост при значениях pH от 4 до 10) и возможность совместного культивирования проводили на плотных питательных средах при стандартных условиях.

В исследованиях использовали спектрофотометр, позволяющий измерять оптическую плотность при $\lambda = 540$ нм; кюветы с толщиной поглощающего слоя 50 мм; мерную посуду; pH-метр и буферные растворы, питательные среды, микробиологическое

лабораторное оборудование.

При подготовке к выполнению измерений были приготовлены следующие вспомогательные и градуировочные растворы: раствор натрия тетраборнокислого с молярной концентрацией 0,05 моль/дм³; раствор сульфарсазена с массовой долей 0,05%; раствор сульфита натрия с массовой долей 20%; раствор тиомочевины с массовой долей 10%; раствор сульфосалициловой кислоты с массовой долей 10%; раствор серной кислоты (1:1); раствор аммиака (1:1); основной градуировочный раствор ионов цинка с массовой концентрацией 0,025 мг/см³; рабочий градуировочный раствор ионов цинка с массовой концентрацией 0,0005 мг/см³.

Исследование проводили на основе методики измерений массовой концентрации ионов цинка в природных и сточных водах фотометрическим методом с сульфарсазеном ПНДФ 14.1:2.195-2003 (ФР.1.31.2007.03804), рассмотренной и одобренной федеральным бюджетным учреждением «Федеральный центр анализа и оценки техногенного воздействия» (ФБУ «ФЦАО») [14].

Фотометрический метод определения массовой концентрации ионов цинка основан на взаимодействии ионов цинка в слабокислой среде с сульфарсазеном (плюмбоном) с образованием комплексного соединения красно-оранжевого цвета, интенсивность окраски которого измеряется при длине волны $\lambda = 540$ нм.

Результаты исследований

Первоначально нами было выделено из проб торфосорбентов и проб почвы с нефтяными загрязнениями 16 штаммов бактерий, которые были типированы по схемам дифференциации бактерий рода *Bacillus* (по методикам R.Gordon и R.A. Slepescu, H.T. Nemphill), включающие обширный набор биохимических тестов (табл. 1).

Подбор штаммов бактерий-симбионтов был основан на способности сохранять биохимическую активность при pH от 4 до 10 при средней температуре культивирования $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ при максимальной длительности культивирования 14 суток.

Для проведения исследования мы ис-



Рис. 1 - Образование бактериальной пленки

пользовали 7 колб одинакового размера, куда разливали по 200 мл отходов гальванического производства. При этом pH в колбах доводили до значений от 4 до 10, так как определение кислотности нативного образца дало значение pH=13. Затем добавили в каждую колбу по 0,1 мл суточной культуры каждого штамма бактерий рода *Bacillus* (20 штаммов), 0,1 мл – культуры *Pseudomonas alcaligenes*, 0,5 мл – сульфатредуцирующие бактерии *Desulfovibrio desulfuricans*. Далее определяли количество бактериальной массы методом последовательных разведений с последующим высевом на мясо-петонный агар.

Опытным путем нами было установлено, что бактерии рода *Bacillus*, используемые нами в эксперименте, вида *Pseudomonas alcaligenes*, сульфатредуцирующие бактерии *Desulfovibrio desulfuricans* являются штаммами, способными к созданию симбиотического микробного сообщества. Наиболее благоприятным показателем pH среды для развития вышеназванных микроорганизмов и активного наращивания бактериальной массы в течение 14 суток было значение, равное 6.

Ход основного эксперимента

Для проведения исследования использовались 4 колбы с 200 мл отходов гальванического производства, на основе которых были подготовлены 4 пробы для дальнейшего измерения оптической плотности:

1) отходы гальванического производ-

ства без добавления микроорганизмов (нативный образец) pH=13;

2) отходы гальванического производства со смещенным показателем pH, равным 6;

3) отходы гальванического производства со смещенным показателем pH, равным 6, куда были внесены суточные культуры бактерий рода *Bacillus* и вида *Pseudomonas alcaligenes* (21 штамм по 0,1 мл каждой суточной культуры);

4) гальванический материал со смещенным показателем pH, равным 6, куда были

внесены суточные культуры бактерий рода *Bacillus*, *Pseudomonas alcaligenes* (21 штамм по 0,1 мл суточной культуры) и сульфатредуцирующими бактериями *Desulfovibrio desulfuricans* (0,5 мл суточной культуры).

Посевы культивировались при температуре 20 ± 2 °C в течение 14 суток. Стоит отметить, что через 24 часа во второй, третьей и четвертой пробах наблюдали образование небольшого осадка, в третьей и четвертой пробах дополнительно наблюдали образование бактериальной пленки и небольшое осветление проб (рис. 1).

В день проведения измерений (15-е сутки культивирования) был построен градуировочный график на основе образцов для градуировки с массовой концентрацией ионов цинка от 0,02 до 0,5 мг/дм³. Состав и количество образцов для построения градуировочного графика приведены в табл. 2.

Анализ образцов для градуировки проводили в порядке возрастания их концентрации. Для построения градуировочного графика каждую искусственную смесь фотометрировали 3 раза с целью исключения случайных результатов и усреднения данных. По оси ординат откладывают значения оптической плотности, а по оси абсцисс - величину концентрации вещества в мг/дм³.

Далее проводили отбор проб и их измерение, для чего в мерную колбу вместимостью 50 см³ помещали 3 см³ пробы и доводили до объема 25 см³ добавлением

Таблица 2

Состав и количество образцов для градуировки

Номер образца	Объем рабочего градуировочного раствора ионов цинка с конц. 0,0005 мг/см ³ , см ³	Содержание ионов цинка в мерной колбе вместимостью 25 см ³ , мг	Массовая концентрация ионов цинка в градуировочных растворах, мг/дм ³
1	0	0	0
2	2,0	0,0010	0,04
3	5,0	0,0025	0,10
4	10,0	0,0050	0,20
5	15,0	0,0075	0,30
6	20,0	0,0100	0,40
7	25,0	0,0125	0,50

дистиллированной воды. Предварительно пробы фильтровали с помощью фильтровальной бумаги и, поскольку содержание ионов цинка в пробах предположительно превышало 0,5 мг/дм³, пробы разбавлялись дистиллированной водой в соотношении 1:500.

Градуировочный график представлен на рис. 2.

Далее к исследуемой пробе добавляли 1 см³ 20 % раствора сульфата натрия, 1 см³- 10% раствора сульфосалициловой кислоты, 1 см³- 10 % раствора тиомочевины и 2 см³- 0,05 % раствора сульфарсазена. После тщательного перемешивания раствор доводили до метки 0,05 моль/дм³ раствором натрия тетраборнокислого и вновь перемешивали.

Через 10 минут измеряли оптическую плотность полученного раствора при длине волны 540 нм в кювете с толщиной поглощающего слоя 50 мм и определяли концентрацию цинка в пробе по данным градуировочного графика.

Полученные результаты представлены в табл. 3.

Выводы

Проведенные исследования показали, что основное воздействие на адсорбцию цинка в пробах оказал «кислотный коктейль». Так, значение массовой концентрации ионов цинка снизилось во второй пробе по сравнению с первой на 34 пункта и составило 0,11 мг/дм³. Однако наблюдается снижение концентрации цинка и в двух по-

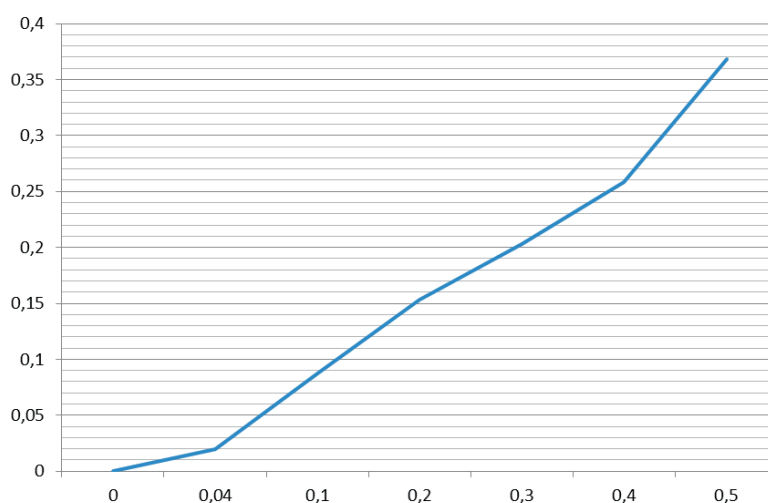


Рис. 2 - Градуировочный график

Таблица 3
Результаты фотометрии подготовленных проб

Номер пробы	Значение оптической плотности (D)	Массовая концентрация ионов цинка, мг/дм ³
1	0,306	0,45
2	0,097	0,11
3	0,07	0,08
4	0,018	0,02

следних пробах. Это свидетельствует о том, что подобранные нами штаммы микроорганизмов (бактерии рода *Bacillus*, вида *Pseudomonas alcaligenes*, сульфатредуцирующие бактерии *Desulfovibrio desulfuricans*) также способны адсорбировать ионы цинка. В соответствии с полученными данными в последний пробе, по сравнению со второй, концентрация ионов цинка снизилась более чем в 5 раз.

Концентрация ионов цинка в исходных пробах

Номер пробы	Концентрация ионов цинка подготовленных проб, мг/дм ³	Вторичное разбавление	Первичное разбавление	Концентрация ионов цинка в первоначальных пробах, мг/дм ³
1	0,45	3:25	1:500	1825
2	0,11	3:25	1:500	458,3
3	0,08	3:25	1:500	333,3
4	0,02	3:25	1:500	83,33

Поскольку перед проведением измерений пробы предварительно разбавляли дистиллированной водой, данные значения соответствуют лишь пробам, подготовленным специально для измерения оптической плотности. Концентрация ионов цинка в исходных образцах оказалась значительно выше. Данные представлены в таблице 4.

Таким образом, в пробах с «микробальным коктейлем» наблюдается снижение концентрации ионов цинка по сравнению с пробами без микроорганизмов. Данный факт позволяет сделать вывод, что бактерии рода *Bacillus*, вида *Pseudomonas alcaligenes* и сульфатредуцирующие бактерии *Desulfovibrio desulfuricans* способны адсорбировать ионы цинка. Особое внимание стоит обратить на четвертую пробу, в которой снижение концентрации ионов цинка, по сравнению с третьей, происходит при введении в «коктейль» сульфатредуцирующих бактерий. В целом снижение концентрации ионов цинка в четвертой пробе по сравнению с первой произошло в 22 раза. Но, несмотря на многократное снижение значений концентрации ионов цинка, они все же значительно выше предельно допустимой концентрации.

Научные исследования проводятся при финансовой поддержке государства в лице Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (программа «УМНИК»).

Библиографический список

1. Алясова, А.В. Влияние гальванического производства на окружающую среду / А.В. Алясова // *Advances in current natural sciences*. – 2011.- №7. - С.68-69.

2. Брындина, Л.В. Совместное использование микроорганизмов в биологической

очистке сточных вод / Л.В. Брындина, С.Н. Петров, О.С. Корнеева // *Экологические системы и приборы*. –2006.- №11. – С. 13-15.

3. Ксенофонтов, Б.С. Использование микроорганизмов активного ила в качестве флокулянта для очистки сточных вод // Б.С. Ксенофонтов, Е.Е. Гончаренко, Е.В. Сенник // *Естественные и технические науки*. - 2015. - №3(81). – С.221-226.

4. Феоктистова, Н.А. Результаты сравнительного анализа бактериологических методов исследований какао-порошка на наличие бацилл, вызывающих порчу продуктов питания (БВПП) / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии*. - 2015. - № 1 (29). - С. 69-77.

5. Тест-система ускоренной детекции бактерий рода *Bacillus* в пищевом сырье и продуктах питания / Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова, М.А. Лыдина, А.И. Калдыркаев, Н.А. Петрукова // *Каталог научных разработок и инновационных проектов*. - Ульяновск, 2015. - С.49.

6. Феоктистова, Н.А. Распространение *Bacillus cereus* и *Bacillus mycoides* в объектах санитарного надзора / Н.А. Феоктистова // *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии*. – 2014. - № 1 (25). – С. 68-75.

7. Биосенсорная детекция бактерий рода *Bacillus* в молоке и молочных продуктах для предупреждения их порчи / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова, А.В. Алешкин // *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии*. - 2013. - №4 (24). - С. 36-43.

8. Биоиндикация содержания бактерий *Bacillus megaterium* в молоке и молочных продуктах / Н.А. Петрукова, Н.А. Феок-

тистова, Д.А. Васильев //Экология родного края: проблемы и пути их решения. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Киров, 2014. - С. 375-377.

9. Золотухин, Сергей Николаевич. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: автореф. дис. ... д-ра биологических наук / С.Н. Золотухин. – Ульяновск, 2007. – 39 с.

10. Золотухин, С.Н. Новый метод определения качества молока и молочных продуктов, контаминированных бактериями рода *Bacillus* / С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова //Фундаментальные и прикладные проблемы повышения продуктивности животных и конкурентоспособности продукции животноводства в современных экономических условиях АПК РФ. Материалы Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2015. - С. 288-290.

11. Изучение видового разнообразия бактерий рода *Bacillus*, контаминирующих корне- и клубнеплоды / К.В. Кудряшова, Н.А. Феоктистова, М.А. Лыдина, Д.А. Васильев, Б.И. Шморгун // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт,

проблемы и пути их решения. Материалы VI Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2015. - С. 95-98.

12. Шокина, К.В. Определение параметров культивирования бактерий рода *Bacillus* в сточных водах гальванического производства / К.В. Шокина, П.С. Майоров, Н.А. Феоктистова // Новая наука: проблемы и перспективы. Международная научно-практическая конференция от 4 ноября 2015 года. – Sterlitaмак: РИЦ Ами, 2015. – С. 22-29.

13. Майоров, П.С. Определение параметров культивирования бактерий рода *Alcaligenes* в отходах гальванического производства / П.С. Майоров, К.В. Шокина, Н.А. Феоктистова // Новая наука: проблемы и перспективы. Международная научно-практическая конференция от 4 ноября 2015 года. – Sterlitaмак: РИЦ Ами, 2015. – С. 8-11.

14. ПНД Ф 14.1:2.195-2003 Количественный химический анализ вод. Методика измерений массовой концентрации ионов цинка в природных и сточных водах фотометрическим методом с сульфарсазеном – NORMASC– система нормативов - URL: <http://www.normacs.ru/Doclist/doc/V72U.html> - дата обращения 12.11.2015.