

**Герман Надежда Валерьевна**

**ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО БИОПРЕПАРАТА ДЛЯ  
ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД КОЖЕВЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА**

03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Волгоград - 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Волгоградский государственный технический университет»

**Научный руководитель:**

**Владимцева Ирина Владимировна**, доктор биологических наук, профессор.

**Официальные оппоненты:**

**Афанасьев Станислав Степанович**, заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, заместитель директора по биотехнологии;

**Маннапова Рамзия Тимергалеевна**, доктор биологических наук, профессор, Федеральное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», профессор кафедры микробиологии и иммунологии.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов» Российской академии наук

Защита состоится « 8 » апреля 2016 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека России по адресу:

142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, кор. № 1, конференц-зал.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, [www.obolensk.org](http://www.obolensk.org).

Автореферат разослан «     »                      2016 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета,

кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Биологические методы все более активно используются для решения проблем очистки загрязненных сред и восстановления нарушенных экосистем. Биологическая очистка сточных вод применяется на большинстве очистных сооружений и по объему перерабатываемых стоков является самой крупнотоннажной технологией (Жуков, 1977, Голубовская, 1978, Яковлев, 1980, Рандольф, 1987, Терентьев, 2003 и др.).

В последние годы в экологической биотехнологии все чаще применяют специально подобранные биопрепараты, ускоряющие процесс биологической очистки сточных вод. Биопрепараты состоят из бактериальных культур и осуществляют эффективную биodeградацию разнообразных органических и неорганических веществ (Перельгина, 2004, Пузырева, 2005, Будыкина, 2006, Кобызева, 2009, Нечаева, 2009, Плешакова, 2005, Шалбуев, 2010, Друзьянова, 2014). Благодаря селективной адаптации бактерии размножаются с высокой скоростью, используя загрязнители в качестве источников питания и энергии. Использование биопрепаратов не требует дополнительных энергозатрат, они работают интенсивно и абсолютно надежно, не нанося вреда и не допуская загрязнения окружающей среды, являются единственно доступным методом очистки озер, прудов, илохранилищ.

Сточные воды кожевенно-меховых производств являются сложными многокомпонентными системами и относятся к группе высококонцентрированных и токсичных (Захарова, 1984, Смирнов, 1994, Павлова, 1997, Александров, 2002, Артемов, 2004, Гуторова, 2011, Федоров, 2012). Поэтому поступление таких стоков в водные объекты может вызвать необратимые процессы, вплоть до полного разрушения сложившейся природной экосистемы (Душин, 1978, Артемов, 2004, Будыкина, 2006, Шалбуев, 2010, Гуторова, 2011, Друзьянова, 2014 и др.). Однако на многих предприятиях, занимающихся переработкой кожи и меха, очистные сооружения либо отсутствуют, либо несовершенны и не соответствуют установленным стандартам качества (Перельгина, 2004, Будыкина, 2006, Шалбуев, 2010). Работы по выявлению роли микроорганизмов, осуществляющих биodeструкцию токсикантов в сточных водах кожевенных предприятий, и их использованию для снижения экологической безопасности применяемых технологий крайне малочисленны. Для проведения ряда подготовительных процессов переработки овчинно-шубного сырья и снижения уровня токсического загрязнения сточных вод было предложено использовать отдельные виды прокариотических липидоокисляющих и кислототолерантных организмов (Перельгина, 2004, Пузырева, 2005, Шалбуев, 2010). Однако к настоящему времени нет эффективных бактериальных биопрепаратов для интенсификации биологической очистки сточных вод кожевенных производств.

**Цель и задачи исследования.** Целью диссертационной работы явилось получение микробного биопрепарата, осуществляющего деградацию загрязнений сточных вод кожевенных предприятий при биологической очистке.

Для достижения указанной цели решались следующие задачи:

- выделение из сточных вод кожевенного производства и характеристика бактериального штамма, осуществляющего биodeградацию органических загрязнений;
- получение высокопродуктивного клона выделенной культуры путем индуцированной селекции;
- изучение условий повышения продуктивности полученного биопрепарата;
- лабораторное моделирование очистки сточной воды при стационарном и глубинном аппаратном культивировании биопрепарата;

- математическое моделирование роста биопрепарата в изучаемых экспериментальных условиях;
- эколого-экономическая оценка эффективности использования полученного биопрепарата.

**Научная новизна.** Из сточных вод кожевенного производства проведено выделение и дана характеристика наиболее активного бактериального штамма-деструктора отходов переработки кожной мездры и жировых загрязнений.

Получен новый высокопродуктивный биопрепарат *Bacillus subtilis* ВГТУ5, осуществляющий осветление и нейтрализацию сточных вод кожевенных предприятий.

Разработаны новые методы повышения продуктивности биопрепарата: при его культивировании в иммобилизованном состоянии в присутствии электромагнитного поля напряженностью 12,24 А/м и при внесении в среду выращивания штамма 2,5% рапы озера Эльтон.

Впервые установлена возможность использования нового биопрепарата в условиях лабораторного моделирования для очистки сточной воды кожевенного производства, выражающейся в ее осветлении в 15 – 24 раза и снижении рН до нейтральной величины.

**Теоретическая и практическая значимость исследований.** Доказана и теоретически обоснована перспективность использования нового биопрепарата на основе бактериального штамма *B. subtilis* ВГТУ5 с повышенными ростовыми характеристиками для биологической очистки сточных вод кожевенного производства. В Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур ФБУН ГНЦ ПМБ («ГКПМ-Оболensk») депонирован авторский штамм *B. subtilis* ВГТУ5 (свидетельство № 96 от 11.11.2015, штамм № В-7837), который осветляет сточную воду кожевенного предприятия, снижает рН до нейтральной величины и может применяться для аэробной биологической очистки сточных вод кожевенных предприятий.

Раскрыты новые подходы к осуществлению технологии биоочистки за счет использования иммобилизованных в магнитные носители бактериальных клеток в условиях применения электромагнитного поля. Получен патент на полезную модель «Устройство для биологической очистки сточных вод» (№ 86945 от 27.01.2009 г.)

Материалы диссертации могут быть использованы при проектировании, строительстве и эксплуатации сооружений аэробной биологической очистки сточных вод.

**Методология и методы исследования.** Методологической базой послужили труды отечественных и зарубежных исследователей по вопросам получения и применения микробных препаратов в технологии биологической очистки сточных вод. При проведении исследования автором были применены общенаучные методы: теоретико-методологический анализ литературных источников, эмпирические методы исследования в форме наблюдения, эксперимента, описания, измерения и сравнительно-сопоставительного анализа.

**Положения диссертации, выносимые на защиту:**

- получен биопрепарат *B. subtilis* ВГТУ5 с повышенными ростовыми характеристиками, осуществляющий очистку сточной воды кожевенного производства;
- при культивировании свободных и иммобилизованных в альгинатные магнитные носители клеток *B. subtilis* ВГТУ5 в электромагнитном поле напряженностью 12,24 А/м происходит увеличение урожайности биопрепарата на 29%;
- внесение в среду выращивания *B. subtilis* ВГТУ5 2,5% рапы озера Эльтон повышает выход биомассы на 213%.

- выращивание биопрепарата в сточной воде кожевенного предприятия позволяет провести ее биологическую очистку в стационарных и глубинных условиях, выражающейся в ее осветлении в 15 – 24 раза и снижении pH до нейтральной величины.

**Степень достоверности и апробация исследования.** Высокая степень достоверности результатов проведенных исследований базируется на теоретических и экспериментальных данных, полученных в результате использования современных методов в области микробиологии, биотехнологии, математической обработке полученной информации и применении сертифицированного оборудования. Сопоставление полученных результатов показывает их хорошую согласованность с представлениям специалистов данного направления исследований. Материалы диссертационной работы были представлены на Международной научно-практической конференции, посвященной 65-летию Победы в Великой Отечественной войне «Новые направления в решении проблем АПК на основе современных ресурсосберегающих, инновационных технологий» (Волгоград, 2010 г.), международной научно-практической конференции «Современные проблемы и пути их решения в науке, транспорте, производстве и образовании» (Одесса, 2010 г.), международной научно-практической конференции «Экология. Риск. Безопасность» (Курган, 2010 г.), Всероссийской конференции «Экологические проблемы урбанизированных территорий» (Пермь, 2011), II Всероссийском научно-практическом форуме «Экология: синтез естественнонаучного, технического и гуманитарного знания» (Саратов, 2011 г.), Всероссийской молодежной научно-практической конференции с международным участием «Экологобезопасные и ресурсосберегающие технологии и материалы» (Улан-Удэ, 2011 г.), VIII межрегиональной научно-практической конференции «Взаимодействие предприятий и вузов по повышению эффективности производства, управления и инновационной деятельности» (Волжский, 2012 г.), VI Всероссийской конференции с международным участием «Формирование и реализация экологической политики на региональном уровне» (Ярославль, 2013 г.), 46, 47, 48, 49 и 50 научно-практических конференциях, проводимых в ВолГТУ (Волгоград, 2009-2013 гг.),

**Публикации результатов исследований.** По материалам диссертационной работы опубликовано 18 научных работ, которые включают 3 публикации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, патент на полезную модель и учебное пособие.

**Объем и структура работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, результатов собственных исследований, заключения, выводов и списка использованной литературы. Работа изложена на 132 страницах, содержит 23 таблицы, 27 рисунков, список литературы из 155 наименований, включающий 38 зарубежных источника.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Глава 1. Методы очистки сточных вод кожевенных производств (обзор литературы)**

Проведен анализ современных российских и зарубежных достижений в выбранном направлении исследований. Обсуждены данные литературы, посвященные изучению состава сточных вод кожевенных производств и методам их очистки.

### **Глава 2. Материалы и методы исследования**

Объектами исследования являлись сточная вода Волгоградского кожевенного завода ООО «Шеврет» и выделенные из нее бактериальные штаммы. Материал для исследования забирали из сборного (сточного) бассейна кожевенного завода. Кроме того, в работе использовали кожную мездру и почву, взятую с территории завода. Для выделения микроорганизмов применяли селективные питательные среды, содержащие в качестве единственного источника углерода

отходы переработки кожной мездры кожевенного производства, и минеральные соли. Методика выделения микроорганизмов заключалась в разведении проб и их высеве на селективные среды с дальнейшим визуальным анализом выросших колоний, которые отсеивали на скошенный агар для получения чистых культур. В экспериментах использовали питательный бульон и питательный агар (ООО «Биокомпасс», г. Углич), а также сухой ГРМ-агар и дифференциально-диагностическую среду (ЗАО "НПО Биоконт", п. Оболенск, Московская область). Все питательные среды стерилизовали автоклавированием при 0,5-1 атм в течение 15-30 минут.

Морфологические свойства выделенных микроорганизмов оценивали путем окраски по Граму и микроскопирования с использованием оптического микроскопа МЛ-1 (ЛОМО, г. Санкт-Петербург). Биохимические свойства бактериальных штаммов изучали с использованием индикаторных бумажных полосок (НИИ эпидемиологии и микробиологии, г. Нижний Новгород). Наличие спор обнаруживали методом окраски клеток по Ожешко. Диаметр бактерий определяли с помощью электронной микроскопии на сканирующем электронном микроскопе Versa 3D DualBeam (FEI, США). Идентификацию микроорганизмов проводили, используя определитель Берджи. Интенсивность роста и накопление биомассы микроорганизмов оценивали фотоколориметрическим методом на приборе КФК-2-УХЛ-4.2 и макрокультуральным методом. Хранение выделенных микроорганизмов проводили по модифицированному методу Леляка А.И. (1998).

Экспериментальные результаты подвергали статистической обработке с помощью компьютерной программы BIOSTAT и методом регрессионного анализа в процессе математического моделирования на ЭВМ (Бондарь, 1980, Голованчиков, 1994). Для проверки достоверности и воспроизводимости результатов использовали коэффициенты корреляции исследуемых зависимостей, рассчитанные методом наименьших квадратов, критерии Кохрена и Фишера.

### Глава 3. Собственные исследования

#### 3.1. Выделение микроорганизмов, осуществляющих очистку сточных вод кожевенного производства

Пробы сточной воды и почвенную вытяжку высевали на селективные плотные питательные среды. После инкубации посевов в течение 24 ч при 37° С и 48 ч при 18° С было выявлено семь видов колоний, отличающихся по культурным и морфологическим свойствам. Уровень накопления биомассы оценивали фотоколориметрическим методом после их выращивания в селективной жидкой питательной среде при температуре 37°С в течение 18 ч. Оптические плотности взвесей (D) трех наиболее активных штаммов приведены на рисунке 1.

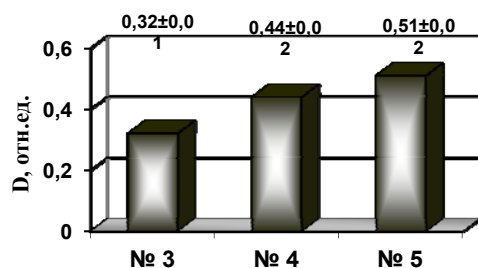


Рисунок 1 - Оптическая плотность взвесей биомассы трех штаммов, выделенных из сточной воды

Согласно полученным данным наибольший прирост биомассы наблюдали у штамма № 5.

Для более объективной оценки деструктивной активности штаммов была сконструирована питательная среда, в которой в качестве источников основных биогенных элементов (углерода и азота) был использован белковый гидролизат, выделенный из обрезки кожи [Греков, 2012]. В гидролизат добавляли источники минеральных компонентов. Соотношение органических и неорганических веществ подбирали экспериментально, варьируя их концентрации.

Результаты накопления биомассы тремя бактериальными штаммами на средах с различным содержанием белкового гидролизата, полученного из кожной обрезки, представлены на рисунке 2.

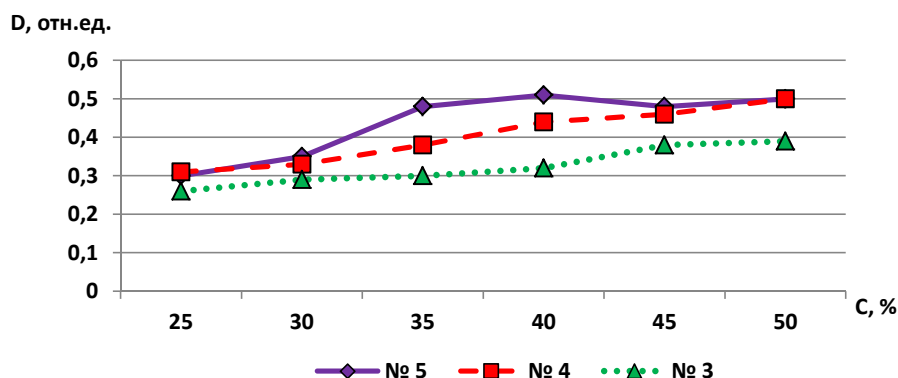


Рисунок 2 - Накопление биомассы бактериальными штаммами в средах с различным содержанием белкового гидролизата

Данные, приведенные на рисунке 2, свидетельствуют о том, что максимальный прирост биомассы у всех штаммов, выделенных из сточной воды, получен при соотношении источников биогенных элементов (белкового гидролизата) и минеральных компонентов 50:50. Наиболее высокой скоростью накопления биомассы отличался штамм №5, который достигал максимальной концентрации уже при 35-40% концентрации гидролизата в среде культивирования. Дальнейшие эксперименты осуществляли с этим, наиболее активным, штаммом, обладающим выраженной способностью утилизировать болки, содержащиеся в отходах кожевенного производства.

### 3.2. Исследование основных свойств и идентификация выделенного штамма

В работе были изучены основные морфологические, культуральные и биохимические свойства выделенного микроорганизма.

Изучение культуральных свойств бактерий проводили путем анализа колоний, выросших из отдельных клеток на пластинках плотной питательной среды и по характеру роста в жидкой питательной среде. Результаты анализа культуральных свойств показали, что при росте на плотной питательной среде культура формирует сухие, плоские колонии молочно-белого цвета с шероховатой поверхностью и неровным краем, размер которых варьирует от 2 до 7 мм. В жидкой питательной среде культура растет в виде гомогенной мути, на поверхности среды образует тонкую беловатую пленку.

Морфологические свойства штамма исследовали микроскопическим методом с использованием оптического микроскопа. Окраска бактериальных клеток по Граму показала, что выделенный из сточной воды кожевенного производства штамм является грамположительным. Окраска клеток по методу Ожешко позволила выявить наличие спор, расположенных, в основном, терминально.

Исследование биохимических свойств позволило установить, что микроорганизмы являются облигатными аэробами, оксидазаотрицательными, уреазотрицательными, гидролизуют крахмал, на желточно-солевой среде Чистовича растут без изменения питательной среды. На кровяном агаре наблюдали выраженную гемолизную активность. На цитратном агаре Симмонса бактерии давали положительную реакцию. Размер клеток, определенный электронно-микроскопическим методом, - менее 1 мкм. Исследуемый штамм давал рост в питательном бульоне с содержанием 6,5% хлорида натрия и не рос при 55°C.

Анализ морфологических, культуральных и биохимических свойств выделенных микроорганизмов позволил отнести их к семейству *Bacillaceae*, роду *Bacillus*, виду *subtilis*. Выделенный штамм был обозначен как *Bacillus subtilis* ВГТУ5 и был депонирован в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» (свидетельство № 96 от 11.11.2015, штамм № В-7837).

### 3.3. Исследование липидоокисляющей способности бактерий

Одним из основных загрязнителей сточных вод кожевенного производства является жировые вещества. В связи с этим в работе были определены липолитические свойства выделенной культуры. Липидоокисляющую активность *B.subtilis* ВГТУ5 оценивали по результатам роста в бульоне Штерна, в котором в качестве единственного источника углерода было введено оливковое масло (1%). Бактерии, обладающие липолитическими свойствами, при его ферментации извлекают альдегиды, подкисляя среду. Результаты опытов приведены на рисунке 3.

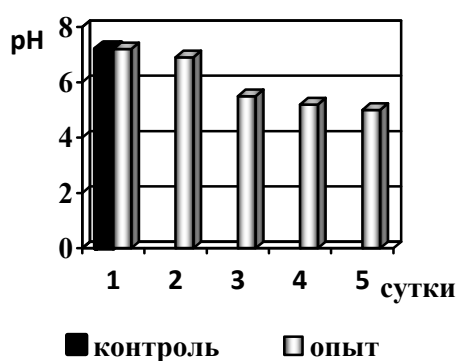


Рисунок 3 - Липидоокисляющая активность штамма *B.subtilis* ВГТУ5

Полученные данные показали, что в процессе культивирования штамма *B.subtilis* ВГТУ5 в бульоне Штерна в течение 5 суток происходит снижение pH с 7,2 до 5,0, что свидетельствует о выделении альдегидов, ферментирующих липиды.

Кроме того, липидоокисляющую способность культуры оценивали в питательной среде с животными жирами. Для подбора оптимальной концентрации жира использовали жидкие питательные среды, содержащие 0,5; 1,0; 1,5 и 2,0 % свиного жира и минеральные соли. Для получения мелкодисперсной жировой эмульсии, доступной для утилизации микробной клеткой, питательные среды подвергали ультразвуковому воздействию при частоте 44 кГц и силе тока 0,54 А. Концентрацию биомассы (С) определяли макрокультуральным методом.

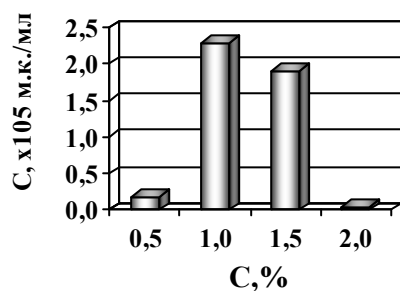


Рисунок 4 - Урожайность бактерий в средах с животным жиром

Результаты экспериментов представлены на рисунке 4.

Полученные данные свидетельствуют, что штамм *B.subtilis* ВГТУ5 обладает выраженной липидоокисляющей активностью, поскольку растет на питательной среде с животным жиром в качестве единственного источника углерода. Наиболее оптимальными условиями для накопления биомассы является содержание в среде 1% жира.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов было установлено, что выделенный бактериальный штамм обладает липидолитической активностью, в том числе способностью утилизировать животные жиры, которые в значительной степени загрязняют сточные воды кожевенных производств.

### 3.4. Повышение продуктивности биопрепарата *Bacillus subtilis* ВГТУ5 путем индуцированной селекции

Одним из перспективных направлений совершенствования биотехнологии очистки сточных вод является увеличение продуктивности бактерий-деструкторов путем проведения индуцированной селекции микроорганизмов. Метод позволяет отобрать бактериальные штаммы с



нужными свойствами, например, высокими скоростями роста и утилизации субстрата.

Для получения бактерий с повышенными ростовыми характеристиками проводили индуцирование мутаций в популяции биопрепарата. В качестве мутагенного фактора было выбрано воздействие ультрафиолетового (УФ) облучения с длиной волны 260 нм. Длительность облучения подбирали экспериментальным путем. Культуру обрабатывали мутагенным фактором, получали из отдельных клеток штамма изолированные колонии (клоны), отсеивали их на скошенный агар, выращивали в жидкой питательной среде и оценивали уровень накопления биомассы фотокolorиметрическим методом. В качестве контроля использовали культуру этого штамма, не подвергнутую воздействию УФ-облучения. Результаты одного из экспериментов с тремя клонами выделенного штамма представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Интенсивность роста культуры после ультрафиолетового облучения и селекции

Время облучения, мин	Номер клона	Оптическая плотность, отн.ед	Процент отклонения от контроля
8	1	0,203±0,04	+76,5
	2	<b>0,270±0,05</b>	<b>+134,8</b>
	3	0,240±0,02	+108,7
12	1	0,095±0,01	-17,4
	2	0,103±0,01	-25,4
	3	0,091±0,01	-99,2
Контроль		0,115±0,02	

Данные, приведенные в таблице 1, свидетельствуют, что УФ облучение в течение 8 мин приводило к увеличению концентрации клеток в суспензии по сравнению с контролем. Наибольшая интенсивность накопления биомассы обнаружена у клона № 2. Ультрафиолетовое облучение культуры в течение 12 мин способствовало снижению продуктивности бактерий по сравнению с исходной культурой. Высокопродуктивный клон № 2 штамма *B.subtilis* ВГТУ5 был выбран для дальнейших исследований.

### 3.5. Консервация и хранение биопрепарата

Необходимым условием успешной работы с различными микробными культурами является правильное поддержание их в рабочем состоянии, сохранение жизнеспособности и свойств, важных для исследователя. С целью консервации и хранения бактериального биопрепарата был использован метод высушивания спор на воздухе в присутствии крахмала и сахарозы (Лемяк, 1995). Иммобилизация спор бацилл на крахмале обеспечивает им механическую защиту, равномерное распределение в массе наполнителя, предотвращает их слипание. Сахароза является сорбентом-наполнителем и оказывает на споры стабилизирующий и консервирующий эффект, создает более мягкие условия для хранения. Споры бактерий, иммобилизованные на крахмале в присутствии сахарозы, хранили при температуре не выше 10°C. Ежемесячно проводили проверку жизнеспособности спор бактерий путем высева на пластинки питательного агара.

### 3.6. Иммобилизация бактериального штамма, выделенного из сточных вод кожевеного производства

Иммобилизация – процесс прикрепления биологических систем, к поверхности нерастворимых носителей различной природы. Иммобилизованные на различных носителях микроорганизмы все шире применяются для усовершенствования локальных методов биологической очистки сточных вод (Бухгалтер, 2003, Кобызева, 2009). Интересные перспективы открываются при использовании микробных деструкторов, иммобилизованных в магнитные носители (Потопова, 2006). Преимуществом этого способа является простота управления микробными клетками с помощью магнитного поля и быстрота их сепарации.

В диссертационной работе было проведено исследование возможности интенсификации роста полученного биопрепарата, иммобилизованного в магнитные альгинатные носители. Бактериальные клетки включали в структуру альгинатного геля, содержащего магнитный материал (оксид железа), что способствовало приданию иммобилизованной системе магнитоуправляемости и позволило значительно облегчить работу. В результате проведения в асептических условиях иммобилизации бактерий были получены магнитные альгинатные сорбенты, которые представляли собой гранулы темно-коричневого цвета размером 2-4 мм. Эксперименты показали, что иммобилизованные в магнитные альгинатные носители бактериальные клетки штамма *B.subtilis* ВГТУ5 сохраняли жизнеспособность в течение 5 циклов культивирования (длительность опыта) в жидкой питательной среде при стационарном выращивании.

Для реализации преимуществ использования магнитных носителей клеток необходимо проведение экспериментов по изучению влияния электромагнитного поля (ЭМП) на штаммы исследуемых микроорганизмов. Бактериальные клетки обладают высокой чувствительностью к магнитным полям, однако конечный биологический эффект их воздействия определяется особенностями биообъекта. Для экспериментов был разработан специальный прибор, создающий электромагнитное поле различной напряженности. Результаты изучения влияния ЭМП на свободные (не иммобилизованные) бактериальные клетки представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Воздействие ЭМП на биопрепарат *B.subtilis* ВГТУ5

Значение ЭМП, А/м	Концентрация биомассы, $\times 10^9$ м.к./мл
5,25	1,30 $\pm$ 0,15
8,74	1,38 $\pm$ 0,10
<b>12,24</b>	<b>1,78<math>\pm</math>0,09</b>
13,67	1,61 $\pm$ 0,08
19,71	1,30 $\pm$ 0,12
Контроль	1,38 $\pm$ 0,12

Полученные в эксперименте данные свидетельствуют, что оптимальным значением напряженности ЭМП для культивирования свободных клеток бактериального штамма *B.subtilis* ВГТУ5 являлось значение 12,24 А/м (прирост биомассы составил 29%).

Для исследования параметров накопления биомассы при культивировании иммобилизованных микроорганизмов осуществляли их выращивание в питательной среде, в которой создавали ЭМП найденной в экспериментах напряженности. Было установлено, что иммобилизация бактериальных клеток не приводила к снижению эффекта от воздействия ЭМП напряженностью 12,24 А/м, прирост биомассы по сравнению с контролем составил 29,3%. Иммобилизованные в магнитные альгинатные носители клетки *B.subtilis* ВГТУ5 сохраняли жизнеспособность не менее 5 циклов культивирования (условия опыта). Полученный экспериментальный материал перспективен для использования при совершенствовании промышленной технологии локальной биологической очистки сточных вод кожевенного производства.

Иммобилизованные в магнитные альгинатные носители клетки *B.subtilis* ВГТУ5 сохраняли жизнеспособность не менее 5 циклов культивирования (условия опыта). Полученный экспериментальный материал перспективен для использования при совершенствовании промышленной технологии локальной биологической очистки сточных вод кожевенного производства.

### 3.7. Влияние природных минеральных компонентов на бактериальный биопрепарат

Эффективность работы станций биологической очистки определяется свойствами микробных биоценозов очистных сооружений. В улучшении ростостимулирующей активности штамма, использующего органические загрязнения сточной воды, особое значение имеет добавление в среду минеральных компонентов. В связи с этим в работе было изучено влияние некоторых макро- и микроэлементов на жизнедеятельность штамма *B.subtilis* ВГТУ5.

Необходимость минеральных элементов для роста бактерий определяли на синтетических средах, исключая из их состава один из источников питания. В опытных образцах питательных сред отсутствовали источники фосфора (P), калия (K) или магния (Mg). Результаты эксперимента представлены на рисунке 5.

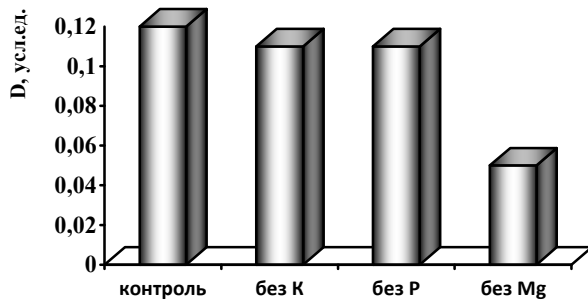


Рисунок 5 - Результаты изучения влияния источников минерального питания на рост бактериальных клеток

и соль Мертвого моря). В полусинтетическую питательную среду, содержащую источники углерода и азота, вводили один из указанных минеральных компонентов. Оптимальную концентрацию солей подбирали экспериментально. В полученных средах выращивали бактерии *B.subtilis* ВГТУ5. Сравнение максимальных уровней оптической плотности бактериальных суспензий, полученных при выращивании с различными минеральными добавками (рисунок 6), показало,

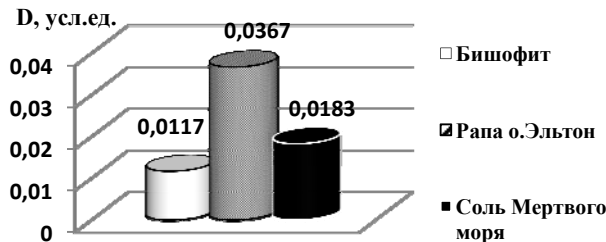


Рисунок 6 - Наибольшие значения оптической плотности биомассы бактерий на средах с минеральными добавками

что наибольшее накопление биомассы бактерий происходит в питательной среде с солевой рапой озера Эльтон (2,5%) (на 213% по сравнению с контролем). Для проверки достоверности и воспроизводимости полученных результатов (3 параллельных опыта по 5 измерений для каждого компонента) было проведено их математическое моделирование на ЭВМ методом регрессионного анализа. Найденные экспериментальные зависимости оптической плотности суспензии бактерий от концентрации минеральных добавок были описаны в виде уравнений регрессии. Рассчитали коэффициенты в уравнениях данных зависимостей, коэффициенты корреляции, нелинеаризованные относительные ошибки по методу наименьших квадратов (МНК), критерии Кохрена и Фишера. Результаты расчетов приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты регрессионного анализа зависимостей оптической плотности бактериальных суспензий от концентрации минеральных компонентов в среде

Наименование расчетных параметров	Значение параметров		
	Бишофит	Рапа озера Эльтон	Соль Мертвого моря
Коэффициент корреляции	0,874	0,960	0,987
Критерий Кохрена	0,570	0,530	0,650
Критерий Фишера	2,680	2,100	2,680

Представленные в таблице 3 коэффициенты корреляции свидетельствует, что найденные зависимости прямые и сильные. Максимальная нелинеаризованная относительная ошибка по МНК во всех экспериментах - до 10%, средняя - до 5%. Значения критерия Кохрена для всех опытов, рассчитанные в линеаризованном виде,  $Gr^{расч} \leq Gr^{таб}$ , т.е меньше табличного значения - (0,6838), что значит дисперсия опытов однородна и воспроизводимость хорошая. Значения кри-

Данные, приведенные на рисунке 5, свидетельствуют, что наиболее значимым для культуры *B.subtilis* ВГТУ5 минеральным элементом является магний. Его отсутствие уменьшает продуктивность культуры на 58 %.

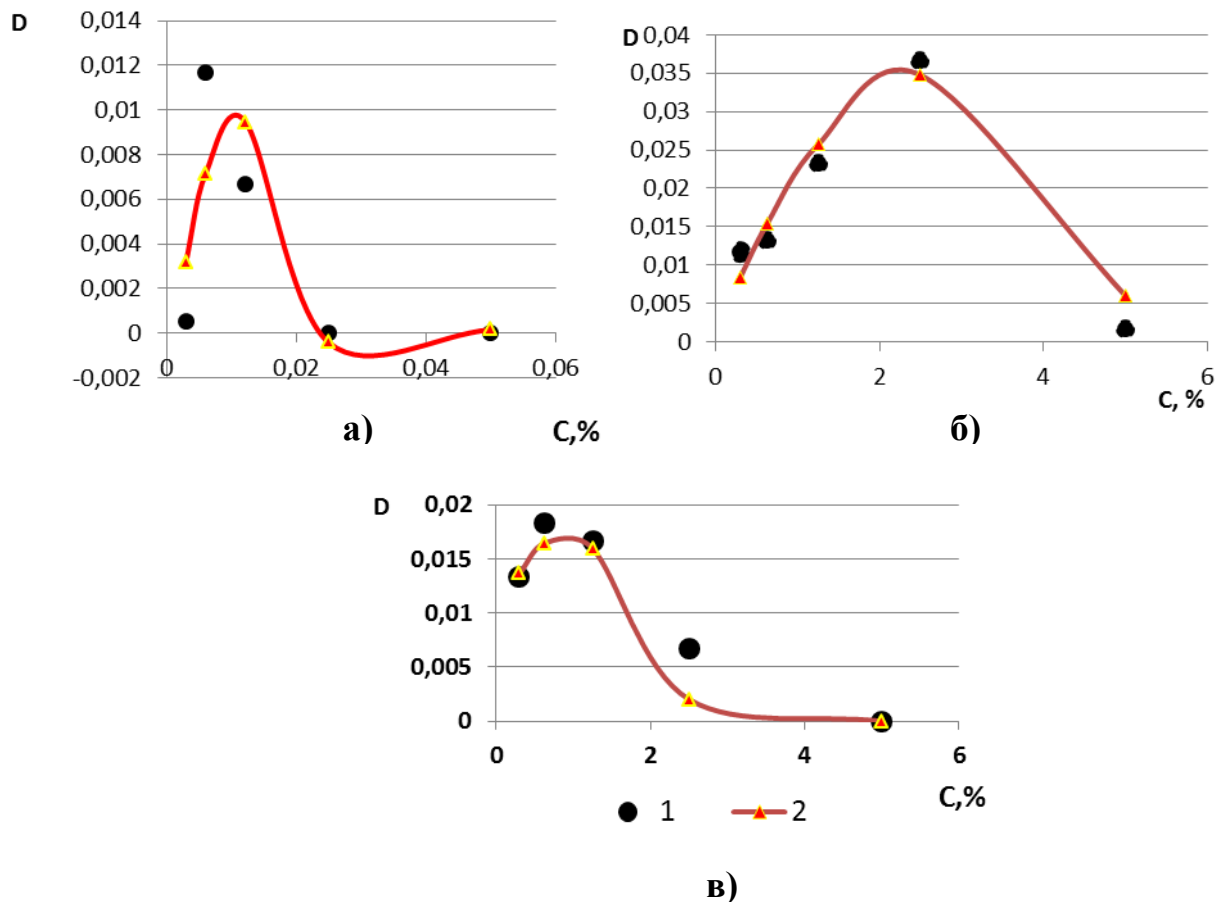
Полученные результаты позволили предположить возможность интенсификации роста штамма *B.subtilis* ВГТУ5 путем добавления в питательную среду богатых солями магния минеральных компонентов, находящихся в природных средах (бишофит, рапа озера Эльтон и

соль Мертвого моря).

Для проверки достоверности и воспроизводимости полученных результатов (3 параллельных опыта по 5 измерений для каждого компонента) было проведено их математическое моделирование на ЭВМ методом регрессионного анализа. Найденные экспериментальные зависи-

терия Фишера, полученные для всех трех серий экспериментов, рассчитанные по МНК  $F_{p}^{расч} < F_{p}^{таб}$  (табличное значение - 3,71), что свидетельствует, что модели адекватны.

Графики экспериментальных данных и теоретических зависимостей оптической плотности суспензий от концентрации трех минеральных добавок приведены на рисунке 7.



1-экспериментальные значения; 2- теоретический график

Рисунок 7 – Зависимости оптической плотности суспензии клеток от концентрации минеральных добавок: а) бишофит, б) рапа озера Эльтон, в) соли Мертвого моря.

Проведенный регрессионный анализ результатов экспериментов позволяет сделать вывод, что полученные в ходе экспериментальной работы результаты являются достоверными, воспроизводимыми, могут быть использованы для повышения продуктивности биопрепарата *B. subtilis* ВГТУ5 и перспективны для внедрения в технологический процесс биологической очистки сточных вод.

### 3.8. Лабораторное моделирование биологической очистки сточных вод кожевенного производства

С целью изучения возможности использования выделенного штамма для очистки сточных вод кожевенного производства проводили лабораторное моделирование процесса биологической очистки при стационарном и глубинном культивировании.

Для выращивания микроорганизма-деструктора брали пробу сточной воды из коллектора кожевенного предприятия, удаляли взвешенные частицы путем центрифугирования в течение 20 мин при 3500 об./мин с использованием центрифуги СМ-6 МТ (ELMI Латвия).

При стационарном выращивании пробу сточной воды засевали суточной культурой *B. subtilis* ВГТУ5 и инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Для более адекватной оценки чистоты

ты воды пробы освобождали от биомассы микроорганизмов путем центрифугирования. Степень очистки определяли, регистрируя уровень светопропускания проб на фотоколориметре. В качестве контрольного образца использовали сточную воду, не засеянную микроорганизмами. Кроме того, оценивали изменение рН проб до и после процесса лабораторной очистки с использованием рН-метра. Результаты проведенного эксперимента представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Результаты лабораторного моделирования бактериологической очистки сточной воды в стационарных условиях

Наименование пробы	Оптическая плотность, усл. ед	рН пробы
Неочищенная сточная вода	0,120±0,002	8,82±0,07
Очищенная сточная вода	0,008±0,0005	7,20±0,05

Данные, приведенные в таблице 4, позволяют заключить, что в результате стационарного выращивания культуры *B.subtilis* ВГТУ5 произошло осветление сточной воды в 15 раз. При этом наблюдали снижение рН среды от щелочного значения к нейтральному, что тоже является положительной стороной биологической очистки.

При проведении лабораторного моделирования биоочистки в условиях глубинного аппаратного культивирования определяли динамику роста штамма *B.subtilis* ВГТУ5 в биореакторе ВЮТЕС 1607 POLYFERM (фирма LKB, Швеция) с объемом культурального сосуда 500 мл в жидкой питательной среде. Скорость мешалки - 200 об./мин, подача кислорода 0,5 мл/мин (рисунок 8).

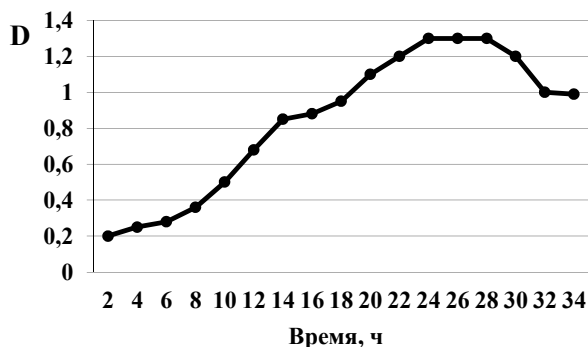


Рисунок 8 - Динамика роста биопрепарата при глубинном культивировании в питательной среде

в жидкой питательной среде. Время его культивирования не должно превышать 26-27 ч.

С целью изучения возможности очистки сточной воды кожевенного завода глубинным методом осуществляли культивирование биопрепарата в биореакторе, добавляя в среду выращивания 2,5% рапы озера Эльтон, поскольку внесение этой природной минеральной добавки позволяет повысить интенсивность его роста. Концентрацию биомассы высчитывали из данных оптической плотности культуральной среды, используя составленный ранее калибровочный график по известной концентрации клеток данного штамма. Результаты проведенного эксперимента представлены на рисунке 9. Наибольшее количество биомассы было получено к 27 - 31 часу с момента начала культивирования в сточной воде, в которой единственным источником питания культуры являлись присутствующие в ней загрязнения. Оптическая плотность неочищенной сточной воды до начала выращивания культуры составляла 0,12. В результате проведенного глубинного культивирования после отделения биомассы эта величина снизилась до 0,005.

Результаты эксперимента свидетельствуют, что после непродолжительной лаг-фазы (2 ч), культура начинала интенсивно размножаться, фаза логарифмического роста длилась до 23 ч с момента начала эксперимента. Максимальная концентрация биомассы достигла  $6 \cdot 10^9$  м.к./мл. После 27 ч выращивания наступила фаза гибели клеток. Таким образом, было установлено, что полученный нами бактериальный штамм, может интенсивно размножаться в условиях глубинного аппаратного культивирования в

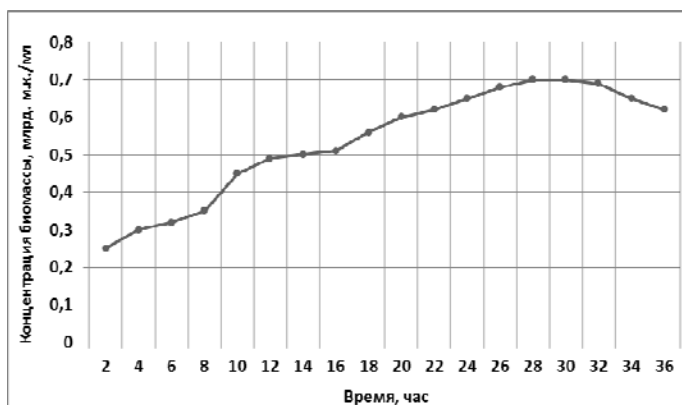


Рисунок 9 – Результаты выращивания биопрепарата в сточной воде при глубинном культивировании

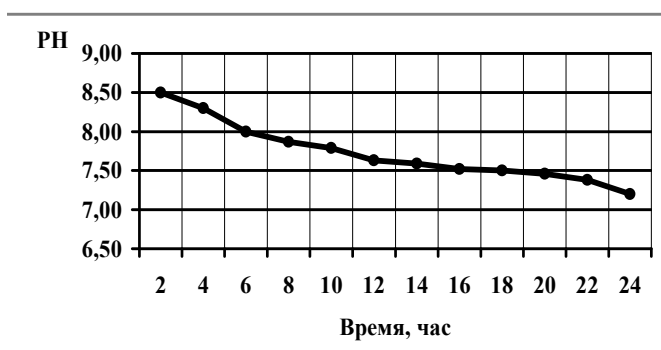


Рисунок 10 - Динамика pH при глубинном культивировании биопрепарата в сточной воде

Таким образом, увеличение прозрачности воды произошло в 24 раза. Осветление воды при глубинном культивировании биопрепарата *B.subtilis* ВГТУ5 на 37,5% выше соответствующей величины, полученной после его стационарного выращивания.

Наряду с контролем количества биомассы оценивали и динамику pH очищаемой воды, что является важной характеристикой биологической очистки. Полученные результаты (рисунок 10) свидетельствуют, что при выращивании культуры глубинным способом произошло снижение pH сточной воды от щелочного значения (8,5) до нейтрального (7,2).

Для оценки результатов, полученных в ходе лабораторного моделирования в условиях глубинного культивирования, проводили математическое моделирование найденных экспериментальных зависимостей на ЭВМ методом регрессионного анализа. Результаты математического моделирования экспериментальных зависимостей оптической плотности бактериальной суспензии (рисунок 8), концентрации биомас-

сы (рисунок 9) и pH (рисунок 10) от времени выращивания штамма приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Результаты регрессионного анализа данных лабораторного моделирования биологической очистки сточной воды глубинным методом

Наименование расчетных параметров	Значение расчетных параметров		
	Динамика роста культуры в питательной среде	Культивирование биопрепарата в сточной воде	Динамика pH
Коэффициент корреляции исследуемых зависимостей	- 0,936	- 0,979	0,971
Критерий Кохрена (расч./табл.)	0,3019/0,3020	0,325/0,330	0,367/0,392
Критерий Фишера (расч./табл.)	0,250/2,020	0,268/1,910	2,25/2,27

Приведенные в таблице 5 коэффициенты корреляции свидетельствует, что найденные зависимости для оптической плотности суспензии и концентрации клеток от времени выращивания обратные и сильные, зависимость pH среды от времени - прямая и сильная. Значения критерия Кохрена, рассчитанные в линеаризованном виде, меньше табличных значений ( $Gr^{расч} \leq Gr^{таб}$ ), что свидетельствует, что дисперсия опытов однородна и воспроизводимость хорошая. Значения критерия Фишера, рассчитанные по методу наименьших квадратов, меньше табличных данных ( $Fp^{расч} < Fp^{таб}$ ), что означает, что модели адекватны.

Таким образом, проведенный регрессионный анализ результатов экспериментов по лабо-

раторному моделированию биологической очистки сточной воды кожевенного предприятия с помощью биопрепарата *B. subtilis ВГТУ5* позволяет сделать вывод, что полученные экспериментальные данные являются достоверными и воспроизводимыми. Полученный бактериальный препарат *B. subtilis ВГТУ5* перспективен для использования в биологической очистке сточной воды кожевенных производств в промышленных условиях.

### 3.9. Эколого-экономическая оценка результатов работы

В диссертационной работе были проведены расчеты показателей эколого-экономического эффекта использования полученного биопрепарата для проведения биологической очистки сточных вод на примере Волгоградского кожевенного завода ООО «Шеврет» производительностью 375969 м<sup>3</sup> сточной воды в год. Эколого-экономическая эффективность результатов научной работы оценивалась на основе «Временной типовой методики определения экономической эффективности осуществления природоохранных мероприятий и оценки экономического ущерба, причиняемого народному хозяйству загрязнением окружающей среды». Затраты на проведение научно-исследовательской работы составили 52865 руб. Затраты на рапу озера Эльтон, необходимую для введения в сточную воду в течение года (с учетом доставки, хранения и пр.), составят 32776 руб. Годовой экономический эффект от внедрения биопрепарата с учетом использования рапы составит 786035 руб. Таким образом, результаты диссертационной работы экономически выгодны и имеют экологическую ценность для внедрения на очистных сооружениях кожевенных предприятий.

#### Выводы:

1. Из сточной воды кожевенного предприятия на селективной среде выделен бактериальный штамм-деструктор, определены его основные культуральные, морфологические, биохимические и липолитические свойства, на основании которых культура была идентифицирована как *Bacillus subtilis ВГТУ5*.
2. В результате УФ-облучения культуры *B. subtilis ВГТУ5* и селекции получен высокопродуктивный клон, позволяющий увеличить выход биомассы на 34%.
3. Установлено, что выращивание клеток *B. subtilis ВГТУ5* в электромагнитном поле напряженность 12,24 А/м способствует повышению урожайности культуры на 29%. Проведена иммобилизации бактериального штамма в магнитные альгинатные носители, которые были использованы для культивирования бактериальных клеток при найденных параметрах электромагнитного поля.
4. Обнаружена необходимость солей магния для роста биопрепарата *B. subtilis ВГТУ5*. Установлено повышение продуктивности культуры на 213% при внесении в среду выращивания природного источника магния - рапы озера Эльтон в концентрации 2,5%.
5. Определена динамика роста штамма *B. subtilis ВГТУ5* в жидкой питательной среде при аппаратном глубинном культивировании.
6. Проведено лабораторное моделирование биологической очистки сточных вод кожевенного производства с использованием полученного биопрепарата при стационарном и глубинном аппаратном культивировании. В результате выращивания культуры произошло осветление сточной воды при стационарном способе - в 15 раз, при глубинном культивировании - в 24 раза. В обоих случаях рН среды снизился от щелочного значения (8,5) до нейтральной величины (7,2).
7. Эколого-экономическая оценка результатов работы показала их экономическую це-

лесообразность, научную ценность и перспективность для внедрения на сооружениях биологической очистки кожевенных предприятий. Предполагаемый годовой экономический эффект от внедрения биопрепарата на очистных сооружениях Волгоградского кожевенного завода ООО «Шеврет» производительностью 375969 м<sup>3</sup> сточной воды в год составит 786035 руб.

### Перспективы дальнейшей разработки темы

Дальнейшая работа по данному направлению будет заключаться в тщательных аналитических исследованиях деструкционной способности биопрепарата по отношению к различным органическим и неорганическим соединениям и его практическому внедрению в работу локальных и промышленных очистных установок, используемых в кожевенной промышленности.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации:

#### *Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК*

1. Колотова, О.В. Использование природных неорганических веществ для интенсификации биотехнологических процессов / О.В. Колотова, И.В. Владимцева, **Н.В. Герман**, И.В. Соколова // Вестник Казанского технологического университета. - 2013. - Т. 16, № 23. - С. 132-135.
2. Орлова, **С.Н.** Выделение и изучение основных свойств липидоокисляющих микроорганизмов [Электронный ресурс] / С. Н. Орлова, **Н. В. Герман**, И. В. Владимцева, О. В. Колотова, И. С. Бойкова // Современные проблемы науки и образования: электрон. науч. журнал / РАЕ. - 2014. - № 3. - С. [1-5] Режим доступа: <http://www.science-education.ru/117-13111>.
3. **Герман, Н.В.** Глубинное культивирование микроорганизмов – деструкторов загрязнений сточных вод кожевенного производства / **Н. В. Герман**, И. В. Владимцева, И. В. Соколова, О.В. // Фундаментальные исследования, 2015, № 2, часть 1. - с.49-52.

#### *Публикации в других изданиях*

4. Пат. п.м. 86945 Российская Федерация, МПК7 С 02 F 3/02, С 02 F 1/46. Устройство для биологической очистки сточных вод [Текст] / Д. В. Филимонова, А. В. Владимцев, **Н.В. Герман**, И. В. Владимцева, А. Б. Голованчиков; заявитель и патентообладатель: Волгоградский государственный технический университет. - заявл. 27.01.09; опубл. 20.09.09.
5. **Герман, Н.В.** Лабораторное моделирование биологической очистки сточных вод кожевенного производства / **Н. В. Герман**, И. В. Владимцева, И. В. Соколова, С. Н. Орлова // Естественные и технические науки. - 2014. - № 4. - С. 32-35.
6. Владимцева, И.В. Segregation and intensification of the growth of microorganisms executing the destruction of environmental pollution [Электронный ресурс] / И.В. Владимцева, О.В. Колотова, И.В. Соколова, **Н.В. Герман** // Водоподготовка и очистка сточных вод населенных мест в XXI веке. Технологии. Проектные решения. Эксплуатация станций: сб. докл. конф. междунар. водной асс. (IWA), 2-4.06.2010 / Междунар. водная ассоциация, ЗАО «Фирма СИБИКО Интернэшнл». – М., 2010. – 1 CD-ROM. – С. [1-4].
7. Владимцева, И.В. Изоляция и исследование роста аборигенных штаммов микроорганизмов, осуществляющих деструкцию загрязнений окружающей среды. / И.В. Владимцева, О.В. Колотова, И.В. Соколова, **Н.В. Герман**, Р.Ф. Адельшин // Водоочистка. Водоподготовка. Водоснабжение. – М., 2010. - №9. – С. 16-20.
8. Соколова, Н.В. Исследование нефтеокисляющей активности микроорганизмов, выделенных из объектов окружающей среды Волгоградской области / И.В. Соколова, **Н.В. Герман** // Экология. Риск. Безопасность: матер. междунар. науч.-практ. конф., 20-21 окт. 2010 г. В 2 т. Т. 1 /Курганский гос. ун-т. – Курган, 2010. – С. 113.
9. **Герман, Н.В.** Выделение и изучение свойств бактериального штамма, осуществляю-



шего очистку сточных вод кожевенного производства / **Н.В. Герман**, И.В. Владимцева // Современные проблемы и пути их решения в науке, транспорте, производстве и образовании. 2010: сб. науч. тр. по матер. междунар. науч.-практ. конф. (20-27 дек. 2010 г.). Т. 33, Биология. Геология /Одес. нац. морской ун-т [и др.]. – Одесса, 2010. – С. 10-12.

10. **Герман, Н.В.** Конструирование искусственной питательной среды для выращивания штаммов, выделенных из сточной воды кожевенного производства / **Н.В. Герман**, И.В. Владимцева, Л.И. Греков, // Экологические проблемы промышленных городов: сб. науч. тр., Саратов. гос. техн. ун-т [и др.]. – Саратов, 2011. – Ч. 2. – С. 68-70.

11. Владимцева, И.В. Исследование бактериального штамма для очистки сточных вод кожевенного производства / И.В. Владимцева, **Н.В. Герман** // Экологические проблемы урбанизированных территорий: матер. Всерос. конф. (г. Пермь, 16-18 март 2011 г.) / ГОУ ВПО «Пермский гос. техн. ун-т». - Пермь, 2011. - 1 электрон (CD-ROM). - С. 40-44.

12. **Герман, Н.В.** Исследование бактериального штамма, выделенного из сточных вод кожевенного производства / **Н.В. Герман**, И.В. Владимцева С.Н. Гарбузова // Экология: синтез естественнонаучного, технического и гуманитарного знания: март. II всерос. науч-практ. форум, г. Саратов, 6-11 окт 2011 г. /Саратовский гос. тех ун-т. - Саратов, 2011. - 1 электрон опт диск (CD-ROM) - С 235-237.

13. Бусов, А.Н. Клонирование и селекция бактериального штамма, осуществляющего очистку сточных вод кожевенного производства / А.Н. Бусов, **Н.В. Герман**, И.В. Владимцева // Материалы Всероссийской молодежной научно-практической конференции с международным участием (г. Улан-Удэ, 12-14 мая 2011 г.) Улан-Удэ Издательство Бурятского госуниверситета 2011 г. – С. 83-85.

14. Владимцева, И.В. Практический курс экологической биотехнологии: учеб. пособие ВолгГТУ. / И.В. Владимцева, Т.В. Хохлова, **Н.В. Герман** // - Волгоград, 2011. - 48 с.

15. **Герман, Н.В.** Использование твёрдых отходов кожевенного производства для конструирования питательной среды при выращивании микроорганизмов / **Н.В. Герман**, И.В. Владимцева // Взаимодействие предприятий и вузов по повышению эффективности производства, управления и инновационной деятельности: сб. докл. VIII межрегион. науч.-практ. конф., г. Волжский, 17-18 апр. 2012 г. / ВПИ (филиал) ВолгГТУ [и др.]. - Волгоград, 2012. - 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). - С. 118-119.

16. Владимцева, И.В. Возможности индивидуальных штаммов [Электронный ресурс] / И.В. Владимцева, О.В. Колотова, И.В. Соколова, **Н.В. Герман** // Вода Magazine. - 2013. - № 4. - С. 44-46.

17. Колотова, О.В. Выделение и исследование свойств бактериальных штаммов-деструкторов органических загрязнений промышленных сточных вод / О.В. Колотова, **Н.В. Герман**, И.В. Владимцева, И.С. Бойкова, И.В. Соколова, С.Н. Орлова // Формирование и реализация экологической политики на региональном уровне: матер. VI всерос. с междунар. участием науч.-практ. конф., 24-25 окт. 2013 г. / Правительство Ярославской области, Гос. академия промышленного менеджмента им. Н.П. Пастухова. - Ярославль, 2013. - С. 283-286

18. Околелова, А.А. Фитотоксичность нефтезагрязнённых почв / А. А. Околелова, А. С. Мерзлякова, **Н. В. Герман** // Естественно-гуманитарные исследования. - 2014. - № 1. - С. 26-31.