

Министерство образование и науки Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования
«Волгоградский государственный технический университет»

На правах рукописи

Герман Надежда Валерьевна

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

03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор Владимцева И. В.

Волгоград - 2015

Содержание

Введение	4
Глава 1. Методы очистки сточных вод кожевенных производств (обзор литературы).....	9
1.1. Состав сточных вод кожевенного производства	9
1.2. Методы очистки сточных вод кожевенных предприятий	18
1.2.1. Механическая очистка	21
1.2.2. Физико-химическая очистка	23
1.2.3. Биологическая очистка	28
Глава 2. Материалы и методы	42
2.1. Объекты исследования	42
2.2. Питательные среды и реактивы	42
2.3. Методы исследования	44
2.4. Статистическая обработка результатов	46
Глава 3. Собственные исследования	47
3.1. Выделение микроорганизмов, осуществляющих очистку сточных вод кожевенного производства	47
3.2. Исследование основных свойств и идентификация выделенного штамма	50
3.3. Исследование липидоокисляющей способности биопрепарата.....	53
3.4. Повышение продуктивности биопрепарата <i>Bacillus subtilis</i> ВГТУ5 путем индуцированной селекции	55
3.5. Консервация и хранение биопрепарата.....	57
3.6. Иммобилизация бактериального штамма, выделенного из сточных вод кожевенного производства	59
3.7. Влияние природных минеральных компонентов на бактериальный биопрепарат.....	66
3.7.1 Экспериментальные исследования влияния природных минеральных компонентов на рост штамма <i>B. subtilis</i> ВГТУ5.....	67

3.7.2 Математическое моделирование результатов изучения влияния природных минеральных компонентов на биопрепарат.....	73
3.8. Лабораторное моделирование биологической очистки сточной воды кожевенного производства	78
3.8.1 Выращивание биопрепарата в стационарном режиме.....	78
3.8.2 Глубинное культивирование биопрепарата.....	79
3.8.3 Регрессионный анализ результатов лабораторного моделирования.....	82
3.9 Эколого-экономическая оценка результатов работы.....	87
3.9.1 Расчеты затрат на проведение НИР.....	87
3.9.2 Расчет эколого-экономического эффекта.....	98
Заключение и выводы по работе.....	107
Список сокращений	113
Список использованных источников	114
Список иллюстративного материала.....	129

Введение

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 [19, 54, 61, 73, 96, 102, 123, 136].

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 [7, 11, 30, 44, 64, 72, 77, 80, 111]. Благодаря селективной адаптации бактерии размножаются с высокой скоростью, используя загрязнители в качестве источников питания и энергии. Применение 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. Применение биологических препаратов позволяет снизить в 3-5 раз трудозатраты, на 50-100% энергопотребление, в 5-10 раз повышает функциональные качества очистных сооружений [126].

Являясь сложными многокомпонентными системами, сточные воды кожевенных производств относятся к группе токсичных и высококонцентрированных стоков [1, 3, 11, 27, 30, 40, 47, 68, 72, 80, 87, 103, 111]. Они образуются в технологических процессах переработки кожи при проведении основных жидкостных процессов: отмокания, зольения, пикелевания, обезжиривания, дубления, крашения и содержат химические реагенты, используемые при технологических процессах или образующиеся при переработке кожевенного сырья [27, 30]. Поэтому поступление стоков кожевенно-меховой промышленности в водные объекты может вызвать необратимые

процессы, вплоть до полного разрушения сложившейся природной экосистемы [11, 13, 27, 40, 72, 80]. Однако на многих предприятиях, занимающихся переработкой кожи и меха, очистные сооружения либо отсутствуют, либо несовершенны и не соответствуют установленным стандартам качества [11, 72, 110, 111]. Работы по выявлению роли микроорганизмов, осуществляющих биодеструкцию 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 (72,80,111). Однако к настоящему времени не предложено эффективных бактериальных биопрепаратов для интенсификации биологической очистки сточных вод кожевенных производств.

В связи с выше изложенным исследования, направленные на разработку биопрепаратов, интенсифицирующих биологическую очистку сточных вод кожевенных производств, являются весьма актуальными.

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

Доказана и теоретически обоснована перспективность использования нового биопрепарата на основе бактериального штамма *Bacillus 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-Оболенск») депонирован авторский штамм *Bacillus 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.

Положения диссертации, выносимые на защиту:

- получен биопрепарат *Bacillus 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 рН до нейтральной величины.

Апробация работы

Материалы диссертационной работы были представлены и обсуждены 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, 2010г.), международной научно-практической конференции

«Современные проблемы и пути их решения в науке, транспорте, производстве и образовании» (Одесса, 2010г.), международной научно-практической конференции «Экология. Риск. Безопасность» (Курган, 2010г.), Всероссийской конференции «Экологические проблемы урбанизированных территорий» (Пермь, 2011г.), II Всероссийском научно-практическом форуме «Экология: синтез естественнонаучного, технического и гуманитарного знания» (Саратов, 2011 г.), Всероссийской молодёжной научно-практической конференции с международным участием «Экологобезопасные и ресурсосберегающие технологии и материалы» (Улан-Удэ, 2011г.), VIII межрегиональной научно-практической конференции «Взаимодействие предприятий и вузов по повышению эффективности производства, управления и инновационной деятельности» (Волжский, 2012г.), VI Всероссийской конференции с международным участием «Формирование и реализация экологической политики на региональном уровне» (Ярославль, 2013г.), 46, 47, 48, 49 и 50 научно-практических конференциях, проводимых в ВолГТУ (Волгоград, 2009-2013 гг.).

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 18 научных работ, которые включают 4 публикации в изданиях из перечня ВАК, в том числе патент на полезную модель, и учебное пособие.

Объем и структура работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, результатов собственных исследований, заключения, выводов, списка сокращений, списка использованной литературы и списка иллюстративного материала. Работа изложена на 131 странице, содержит 23 таблицы, 27 рисунков, список литературы из 155 наименований, включающий 38 зарубежных источника.

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

1.1. Состав сточных вод кожевенных производств

Сточные воды - это воды, использованные на производственные или бытовые цели и получившие при этом дополнительные примеси, изменившие их первоначальные химические или физические свойства, а также воды, стекающие с территорий населенных пунктов, промышленных предприятий или сельскохозяйственных земель в результате выпадения атмосферных осадков [1, 7, 13].

Загрязнение - это негативное изменение окружающей среды коммунального, промышленного, сельскохозяйственного, либо технического происхождения, причиняющее постоянные неудобства, не находящееся в равновесии с существующими естественными циклами восстановления, подвергающее риску экосистему и наносящее вред одной или более формам биологической жизни.

Наиболее загрязнены сточные воды промышленных предприятий, которые по составу подразделяются на 3 группы:

- Производственные, образующиеся в процессе производства;
- хозяйственно-бытовые - стоки столовых, прачечных, душевых;
- атмосферные, образующиеся при выпадении атмосферных осадков и стекающие с территорий предприятия.

Производственные сточные воды делятся на две категории: загрязненные и не загрязненные.

Загрязненные производственные сточные воды могут содержать:

- минеральные примеси;
- органические примеси;
- минеральные и органические примеси.

Сточные воды в зависимости от содержания загрязняющих веществ подразделяются на четыре группы:

- 1 группа - 1-500 мг/дм³;
- 2 группа - 500-5000 мг/дм³;
- 3 группа - 5000-30000 мг/дм³;
- 4 группа - более 30000 мг/дм³.

В зависимости от агрессивности сточные воды разделяют на:

- сильнокислые (рН < 6);
- слабокислые (рН = 6-6,5);
- сильно щелочные (рН > 9);
- слабощелочные (рН = 8-9);
- не агрессивные – нейтральные (рН = 6,5 – 8,0).

Незагрязненные (условно чистые) производственные сточные воды образуются при охлаждении производственного оборудования или поступают от компрессорных, теплообменных или холодильных установок.

Сточные воды кожевенных заводов и меховых фабрик содержат значительное количество опасных загрязнителей и их относят к группе токсичных и высококонцентрированных [1, 3, 11, 27, 30, 40, 47, 68, 72, 80, 87, 103, 111]. Содержание загрязнителей в сточных водах кожевенно-меховой промышленности настолько велико, что при их поступлении в водные объекты могут произойти необратимые процессы, вплоть до полного разрушения сложившейся экосистемы [11, 13, 27, 40, 72, 80, 111].

Характер сточных вод кожевенных производств и их количество зависит от вида перерабатываемого сырья, используемой технологии его обработки, а также вида готовой продукции [13, 17, 21, 30]. Стоки кожевенных заводов, наряду с высокой концентрацией токсикантов, содержат большое количество различных ингредиентов: шерсть, сгустки крови, кусочки сырья, полуфабрикатов кожной мездры, синтетические поверхностно-активные вещества (СПАВ), консервирующие агенты, соли хрома, титана, алюминия, сульфиды, растворенные белки, жиры и др. Специфическими загрязнителями стоков меховых предприятий

являются трех- и шестивалентный хром, жировые и поверхностно-активные вещества (ПАВ), концентрация которых составляет соответственно 84, 25, 200 и 150 мг/дм³ [8, 13, 27].

В сточных водах, образующихся в процессе переработки мехового сырья, практически всегда присутствует опасный токсикант - шестивалентный хром, а также окислительные красители, которые придают высокую цветность стокам. Их концентрация зависит от перерабатываемого сырья и используемой технологии. Например, при производстве шубной овчины сточные воды содержат красители, но не содержат соединения хрома, а при выделке неокрашенного меха отсутствуют оба загрязнителя [30, 40].

На кожевенно-меховых предприятиях, кроме производственных, образуются бытовые и атмосферные сточные воды. Обычно их отводят с территории предприятий отдельными сетями. Производственные и дождевые стоки сбрасываются в городскую канализационную систему или водоем после предварительной очистки на локальных очистных сооружениях, бытовые сточные воды сбрасываются непосредственно в канализацию. В случае попадания загрязненных производственных стоков в водоем без предварительной очистки могут произойти серьезные нарушения его гидробиологического режима [44, 47, 59].

В состав производственных сточных водах кожевенных предприятий входят как минеральные, так и органические вещества. К минеральным веществам относятся различные неорганические соли - хлориды, сульфиды, сульфаты, соединения хрома, титана, к органическим - растительные и синтетические дубильные вещества, белки и продукты их распада, жиры, поверхностно-активные вещества [59, 64, 68].

Вода занимает важное место в обработке кожевенного сырья при выработке кожи. Расход воды на выработку кожи зависит от вида перерабатываемого кожевенного сырья и вида готовых кож и колеблется в широких пределах [70, 77]. Требования к качеству воды в кожевенном производстве зависят от процессов, в которых она используется.

По данным ОАО «Центральный научно-исследовательский институт кожевенно-обувной промышленности» (ЦНИИКП) качественные показатели воды для определенных технологических процессов должны быть следующие: общая жесткость воды для отмочки, обеззоливания, смягчения, промывки после зольения и обеззоливания, хромового и таннидно - синтанового дубления - не более 7 моль/л; для зольения жесткость воды не нормируется; для крашения, жирования, промывки после нейтрализации - не более 3,6 мг/л; содержание солей железа для процессов таннидно-синтанового дубления, промывки перед барабанным крашением, крашения и жирования - не более 0,3 мг/л; запах гнилостный, плесневый, сероводородный - не более 3 баллов; содержание взвешенных веществ - не более 500 мг/л. Для крашения кож установлены следующие показатели качества воды: цветность - не более 25 градусов, прозрачность по шрифту - не менее 25 см, общая жесткость - не более 3,6 моль/л, содержание оксидов железа - не более 0,3 мг/л. Для всех остальных процессов общая жесткость воды должна быть не более 6 моль/л. Для зольения и пикелевания жесткость не нормируется [87, 103, 118].

Для растворения или разбавления химических реагентов, которые используются, в основном, в виде растворов, суспензий и эмульсий, потребляется тоже значительные количества воды. Так, при выработке кожи применяют более 150 химических веществ [111, 122].

В отмочно-зольном цехе используют сульфит натрия, известь, синтетические поверхностно-активные вещества; кремнефторид натрия, хлорид кальция и другие реагенты.

Дубильные цехи потребляют натуральные и синтетические дубители, серную кислоту, сульфат аммония, сульфит натрия, хлорид натрия, кальцинированную соду, соединения хрома, алюминия, ПАВ. Для крашения и жирования применяют анилиновые красители, натуральные и синтетические жиры, ПАВ, наполнители и др.

Требования к качеству воды в кожевенном производстве зависят от процессов, в которых она используется. Для завода средней мощности суточный расход извести составляет около 5 т, сернистого натрия - 1,2 т, дубителей синтетических и

натуральных - 3,5 т, солей хрома - до 2 т, жиров - 1,5 т, серной кислоты - около 1 т, хлорида натрия - 3,3 т, красителей - 0,1-0,2 т [7, 13].

Загрязнение окружающей среды стоками кожевенных производств приводит и к загрязнению подземных вод, которые не могут быть в дальнейшем использованы в бытовых целях из-за присутствия нитратов, нитритов, металлов (особенно хрома), углеводов, дезинфицирующих средств. [2, 4, 5, 78, 79, 111, 142].

Окислительно-восстановительный потенциал (рН) сточных вод отдельных цехов кожевенного производства колеблется в широких пределах - от резко выраженной щелочной реакции (рН = 9-12) после процессов обезволаживания-золения до кислой (рН = 3,0-3,5) после проведения дубления и пикелевания. В сточных вод различных процессов мехового производства рН колеблется от 3,5 до 8,5, а общий сток представляет собой нейтральную среду (рН = 6,5).

По степени загрязнения и происхождению сточные воды кожевенных заводов можно разделить на следующие четыре группы [2, 3, 7]:

1) загрязненные, содержащие смесь отработанных жидкостей после технологических процессов, а также после мытья оборудования и полов. Содержание их в сточных водах составляет 75-85%;

2) условно-чистые воды, образующиеся от охлаждения оборудования, компрессорных и холодильных установок, вентиляционных устройств и прочих механизмов. Они составляют примерно 6-18% от общего количества;

3) хозяйственно-фекальные, поступающие из душевых, прачечных и туалетов. В сточных водах их содержится 5-6%;

4) ливневые, в которые входят воды от мытья территорий, автотранспорта, дождевые стоки. Их количество составляет 2-3%.

Состав последних трех групп вод не является определяющим в характеристике загрязненности сточных вод, поскольку эти воды, занимая в общем количестве малый удельный объем, имеют низкие концентрации загрязнений. В ряде случаев эти сточные воды не смешиваются с загрязненными, так как считаются слабо загрязненными и максимально используются на предприятиях в системах

оборотного и повторного водоснабжения. Сточные воды третьей и четвертой групп, как правило, имеют отдельные канализационные системы [4, 6, 9].

Сточные воды первой группы являются основной, наиболее опасной, частью стоков кожевенного завода. К ним относятся отработанные технологические жидкости, которые представляют собой высококонцентрированную полидисперсную систему, содержащую продукты распада кожевенного сырья, консерванты, шерсть, вещества, загрязняющие шкуру, жир, а также химические реагенты, применяемые при выработке кожи. Все эти вещества находятся в растворенном виде или в виде коллоидов, благодаря чему дисперсная система сточных вод довольно устойчива, несмотря на то, что составляющие ее непрерывно меняются, вступая друг с другом во взаимодействие [8, 13].

Санитарно-химический состав сточных вод кожевенных и меховых предприятий, а также предельно допустимые концентрации (ПДК) загрязнений в них представлены в таблице 1 [11].

Таблица 1 - Санитарно-химический состав сточных вод основных процессов кожевенного производства

Концентрация загрязняющего вещества, мг/л	Процессы			
	Хромовое дубление и красильно-дубильные	Красильно-дубильные	Хромовое дубление	Меховое производство
Взвешенные частицы	2730	2800	2870	3500
Сухой остаток	6000	6100	6400	7000
Азот аммонийный	120	140	90	50
Жировые вещества	330	270	550	1200
Хлориды	2200	2800	2500	5000
Оксид хрома	25	20	20	-
Сульфаты	930	1250	700	400
Сульфиды	140	1260	700	-

Продолжение таблицы 1

Фенолы	20	40	-	-
СПАВ	-	-	40	-
ХПК	2500	2700	3200	-
БПК _к	1350	1500	1450	2000
pH	9,3	10,4	8,5	8
Объем осадка (% от объема воды)	4,2	4,8	5,3	5

По концентрации загрязнений сточные воды кожевенных заводов можно разделить на две группы: первая группа - это сильно загрязненные воды, составляющие 37-62% сточных вод, вторая группа - менее загрязненные воды - 38-63% сточных вод. К сильно загрязненным относятся сточные воды после процессов отмоки, золена, промывки сырья, преддубильных процессов и дубления. Менее загрязненные сточные воды - это все промывные воды, воды после смягчения, крашения и нейтрализации. По реакции среды (pH), различают: щелочные сточные воды - от зольных процессов, кислые - от преддубильных и дубильных процессов и нейтральные - все остальные отработанные жидкости [17].

Сточные воды после промывки и отмоки, количество которых составляет 20-30% сточных вод, содержат большое количество загрязнений, вносимых вместе со шкурами. К ним относятся навал, грязь, консервирующие вещества, обрывки шкур, мездра, шерсть, щетина, кровь, легкорастворимые жиры, песок, продукты разложения шкуры, а также применяемые при отмоке антисептики и обострители, присутствующие в отработанных жидкостях в виде сульфидов, хлоридов и других веществ. Сточные воды после обработки свиного сырья содержат много жира [25, 27, 30].

Сточная вода после отмоки имеет грязно-серый цвет и гнилостный запах, запах сероводорода или аммиака. Активная реакция среды, pH, нейтральная или слабощелочная. Количество взвешенных веществ в этой воде достигает до 20 г/л после первой промывки и колеблется от 0,3 до 7 г/л при отмоке. В этих водах содержится большое количество растворенных веществ, достигающих 64 г/л. После

отмоки в промывных сточных водах содержится большое количество органических веществ белкового происхождения, которые способствуют загниванию этих жидкостей [36, 40, 44].

Отработанная сточная вода после зольения и промывные воды после него, составляющие до 23-25% общего количества сточных вод, содержат до 17 г/л взвешенных веществ. В этих водах взвешенные вещества состоят из извести, песка, мездры, шерсти и других компонентов. рН доходит до 14. Эти сточные воды являются источником высокого рН общего сброса сточных вод. Плотный остаток достигает 45 г/л. Содержание сульфидов (до 1,8 г/л), вносимых сернистым натрием или щелочами, увеличивает токсичность сточных вод. Они содержат также большое количество продуктов распада белков, выщелачиваемых из шкур в виде органического азота, количество которого доходит до 9 г/л. Сточные воды после зольения имеют мутно-белый или грязно-зеленый цвет и затхлый, специфически зольный запах.

Сточная вода после зольения свиных шкур содержит значительное количество жиров (до 1600 мг/л и более), а после обработки шкур крупного рогатого скота - большое количество шерсти. Промывные сточные воды после зольения содержат те же вещества, что и воды после зольения, однако в значительно меньших количествах. Реакция воды вначале щелочная, затем нейтральная; цвет ее серый.

Сточные воды после обеззоливания и смягчения содержат сульфиды в значительно меньших количествах, чем после зольения. Их активная реакция может колебаться от слабокислой до слабощелочной. Концентрация плотного остатка этих вод доходит до 16 г/л, общего и аммонийного азота содержится 1,2 - 1,4 г/л, сульфидов - до 1 г/л. Запах их резко аммиачный [13, 47, 59].

Самые концентрированные сточные воды в кожевенном производстве бывают после дубления - до 1% от всего количества сточных вод. Они имеют кислую реакцию, рН от 3 до 6,5 и являются основным источником закисления сточных вод. После хромового дубления сточные воды имеют сине-зеленый цвет, иногда с голубоватым оттенком, сильно мутные, содержат большое количество медленно оседающей взвеси. При длительном стоянии вследствие разложения белковых веществ они приобретают резкий аммиачный запах. Указанные сточные воды содержат

максимально (г/л): плотного остатка - 170, взвешенных веществ - 4,4, хлоридов - 28, аммонийного азота - 2,5, оксида хрома – 5, сульфатов – 22. После дубления свиных шкур сточные воды содержат, кроме перечисленных, еще и жировые вещества (до 2 г/л). После дубления таннидными и синтетическими дубителями сточные воды более концентрированные и имеют коричневый цвет, который полностью не исчезает даже после биохимической очистки. Таннидные и синтетические дубители, фенолы, соли алюминия и циркония - это те загрязнения, которые придают сточным водам золотистый цвет и запах таннидов. В таких сточных водах содержится максимально (г/л): взвешенных веществ - 24, плотного остатка - 164, сульфатов - 34, фенолов - 1,6, таннидных дубителей - 7,2, жиров - 0,5, синтанов - 21 [64, 67, 68, 71].

Сточные воды, образующиеся в результате процесса нейтрализации, загрязнены теми же веществами, что и после хромового дубления, только в значительно меньшем объеме. Кроме того, они содержат значительное количество хромовой стружки в виде взвесей и растворимых хромовых солей (до 600 г/л оксида хрома), а также карбонаты, бикарбонаты, сульфаты и соли аммония. Эти стоки содержат взвешенных веществ до 3 г/л, их плотный остаток достигает концентрации 13 г/л. Сточные воды зеленоватого цвета или бесцветны, рН - от слабокислой до слабощелочной [70, 77, 87].

Отработанные жидкости, образующиеся после обезжиривания свиных шкур, содержат значительные количества жира (3-5 г/л) и поверхностно-активных веществ.

К сильно загрязненным сточным водам относят воды после хромового додубливания, которые содержат значительное количество солей (в пересчете на оксид хрома - до 3 г/л).

Сточные воды после крашения и жирования содержат остатки красителей, взвешенные вещества - до 2 г/л, растворенные вещества - до 1,7 г/л. Реакция среды - до 8. Цвет сточных вод зависит от цвета красителей [89, 93, 95, 103].

В отдельную группу можно отнести сточные воды, полученные от промывки шкур при механических операциях, мытья машин и полов, которые содержат шерсть, остатки

химических веществ, остатки сульфидов, извести и азотсодержащие вещества. Эти воды молочно-белого цвета, рН 8-9.

Сточные воды кожевенно-меховых предприятий вследствие значительного количества органических примесей подвержены загниванию.

С экологической точки зрения наиболее рациональным способом отведения сточных вод кожевенных предприятий является разделение стоков отмочно-моечных и хромсодержащих и красильных цехов, что позволит провести их обезвреживание с наименьшими затратами, а также применить на предприятии оборотное водоснабжение с использованием очищенной сточной воды [1, 6, 7, 11].

1.2. Методы очистки сточных вод кожевенных предприятий

Для сохранения чистоты водных объектов в настоящее время применяется комплекс организационных и технических мер, которые включают классификацию водных источников, разработку стандартов качества воды, нормирование сброса сточных вод, контроль качества воды и ее использования, очистку сбрасываемых в водоемы сточных вод, разработку методов и технологий, препятствующих неконтролируемому сбросу сточных вод. Существует достаточное количество специфических методов, снижающих уровень антропогенного воздействия на водные источники и биосферу в целом. Эти методы можно разделить на защитные (пассивные) и активные (технические и технологические) [12, 14, 16, 20].

Защитные методы непосредственно не воздействуют на источник загрязнения и направлены на снижение влияния токсикантов, образующихся в процессе производства. К ним относятся: рациональное размещение источников загрязнения (комбинатов, цехов, предприятий), сосредоточение и очистка сточных вод перед их сбросом в водные объекты.

К активным методам относятся мероприятия по существенному снижению или ликвидации загрязнителей на месте их образования благодаря

совершенствованию существующего или внедрению нового оборудования, а также применению безотходных технологических процессов [110].

Наиболее опасными токсикантами являются соединения шестивалентного хрома, поэтому очистка производственных сточных вод от этих загрязнителей приобретает первостепенное значение [18, 20, 23]. В случае попадания хрома в водоем происходит ухудшение органолептических свойств воды, гибель многих представителей флоры и фауны, тормозятся процессы самоочищения водоема [27, 33, 36, 37]. Кроме того, очистка воды от хрома необходима потому, что он оказывает пагубное влияние на здоровье человека. Попадая в живой организм, соли хрома поражают они верхние дыхательные пути, легкие, глаза, вызывают раздражение кожи или слизистых оболочек, иногда с образованием язв [40, 41]. Соединения шестивалентного хрома в составе сточной воды тормозят процесс последующей ее биологической очистки и исключают получение вторичного продукта. Содержание хрома в воде строго регламентировано и составляет от 0,05 до 0,10 мг/л для Cr^{6+} и до 0,50 мг/л для Cr^{3+} [2].

Отсутствие надежных научно обоснованных методов очистки от токсичных органических и неорганических соединений приводит к тому, что построенные даже по новым проектам очистные сооружения на многих заводах кожевенной и меховой промышленности имеют низкую эффективность [65].

В настоящее время разработаны и внедрены в практику различные методы очистки сточной воды от соединений хрома: химические, или реагентные, физико-химические, электрохимические и биологические. Очистка хромсодержащих сточных вод с использованием биологического метода имеет следующие преимущества: возможность проведения непрерывного процесса, значительное сокращение количества образующегося осадка (по сравнению с реагентными способами), снижение эксплуатационных затрат (по сравнению с химическими и физико-химическими методами) [89].

Для очистки сточных вод кожевенных заводов чаще всего применяются три метода очистки: механический, физико-химический и биологический [6, 55, 89].

При механической очистке из сточных вод удаляется основная масса грубо дисперстных частиц (куски кожи, шерсть, мездра, обрезь и др.). Эти загрязнения задерживаются на локальных устройствах для механической очистки.

Из физико-химических методов применяют адсорбцию, флотацию, коагуляцию, экстракцию, ионный обмен, ультрафильтрацию, обратный осмос или электрофорез.

Наиболее распространенный - биологический метод - основан на использовании микроорганизмов для биодеструкции органических веществ. Очистку осуществляют на сооружениях, в которых условия обработки близки к естественным (поля орошения и фильтрации, биологические пруды), и на сооружениях, в которых очистка происходит в искусственно созданных условиях (биофильтры и аэротенки). В сооружениях искусственной биологической очистки процесс очистки воды от органического вещества под действием микроорганизмов протекает значительно интенсивнее [6, 12, 31].

Главным звеном биологической очистки являются микроорганизмы, которые используют в качестве питательных веществ и источников энергии растворенные органические и минеральные соединения, содержащиеся в сточных водах [114, 118]. Из остатков разрушенных молекул органических загрязнений микробы поглощают вещества, необходимые для их размножения и увеличения биомассы, активного ила и биопленки. Микробы разлагают органические вещества до углекислого газа и воды и создают в процессе минерализации соли азотистой, азотной кислот и другие соединения. Органические примеси сточных вод при их аэробной биологической очистке окисляются активным илом и биопленкой. Активный ил разрушает органические соединения в специальных сооружениях - аэротенках в условиях аэрации сточной жидкости и ила, находящегося под влиянием барботажа во взвешенном состоянии. Биопленка прикреплена к наполнителю биофильтров и постоянно соприкасается с воздухом и сточными водами [110, 111].

Сточные воды после очистки перед спуском в водоем обеззараживают - уничтожают в них болезнетворные бактерии и личинки гельминтов.

Обеззараживание производят в специальных установках [103]. В процессе биологической очистки сточных вод образуются большое количество осадка, который обрабатывают на специальных сооружениях (двухъярусные отстойники, отстойники-гнилоперегниватели или метантенки) [91].

1.2.1. Механическая очистка

Механическая очистка заключается в удалении из сточных вод нерастворенных грубодисперсных примесей, которые имеют минеральную и органическую природу. С этой целью используются следующие методы [18, 33, 39, 48]:

- процеживание - удаление наиболее крупных загрязнений на решетках или ситах;
- отстаивание - выделение взвешенных веществ под действием гравитационных сил в песколовках (удаление минеральных примесей), отстойниках (удаление мелких оседающих или всплывающих примесей), нефтеловушках, масло- и смолоуловителях. Разновидностью этого метода является центробежное отстаивание, которое реализуется в гидроциклонах или центрифугах [47];
- фильтрование - задерживание очень мелкой суспензии, которая находится во взвешенном состоянии, на сетчатых и зернистых фильтрах различной конструкции.

Перед подачей на очистные сооружения производственных сточных вод их обычно усредняют по расходу и концентрации в усреднителях различной конструкции.

Для очистки небольших количеств сточной воды метод отстаивания чаще всего применяют вместе со сбрасыванием осадков в различных комбинированных сооружениях - двухъярусных отстойниках, септиках и осветлителях – перегнивателях [86, 88].

Механическую очистку как самостоятельный метод применяют довольно редко, лишь в том случае, если при ее использовании обеспечивается сброс в водоем необходимого качества воды (повторный возврат в технологический процесс производственных сточных вод) [31, 32, 124].

Механическую очистку чаще всего используют в качестве доочистки или как предварительный этап биологической очистки. Так при механической очистке сточных вод кожевенных предприятий должны быть удалены грубые механические загрязнения, такие, как куски кожи, шерсть, мездра, обрезь, стружка. Этот этап очистки осуществляется на локальных устройствах (решетки, шерстеуловители и др.) с целью удаления грубых отходов. Для механической очистки могут быть использованы сита, на которых задерживаются грубые примеси (шерсть, мездра и т. п.) Образующиеся отбросы вывозятся в отвал [111].

Сточные воды усредняют в течение 3-4 ч в усреднителе, который одновременно является приемным резервуаром насосной станции, перекачивающей сточные воды на последующие сооружения. В усреднитель вводятся следующие реагенты: известковое молоко для корректировки величины рН в пределах 8-10; травильный раствор для ускорения процессов коагуляции; полиакриламид для улучшения коагуляции [107].

Из усреднителя сточные воды поступают во флотационный отстойник (жирошерстеуловитель), где происходит выделение грубых взвешенных веществ, шерсти, жира, поверхностно-активных веществ, хрома и других загрязнений [10, 14]. Шлам и осадок, образующиеся при очистке взвешенных веществ органического происхождения, а также минеральные загрязнения улавливаются в отстойниках, предпочтительнее горизонтальных. Продолжительность пребывания сточных вод в отстойниках 30 мин, скорость движения воды 10 мм/с [13].

В результате отстаивания окисляемость сточных вод снижается на 32%, БПК - на 35%. Отстаивание (осветление) сточной жидкости осуществляется в горизонтальных отстойниках, оборудованных конвейерами.

На рисунке 1 приведены отстойники горизонтального типа, широко применяемые в кожевенном производстве для предварительной очистки сточных вод.



Рисунок 1 - Отстойники горизонтального типа

В настоящее время отстаивание сточных вод начинают внедрять совместно с применением коагулянтов, интенсифицирующих этот процесс [17].

После механической очистки значительная доля растворимых веществ остается в сточных водах, поэтому необходима дальнейшая очистка – физико-химическая и биологическая.

1.2.2. Физико-химическая очистка

Физико-химические методы очистки сточных вод многообразны: коагуляция, флотация, адсорбционная очистка, ионный обмен, экстракция, обратный осмос и ультрафильтрация [20]. При физико-химическом методе обработки из сточных вод удаляются тонкодисперсные и растворенные неорганические примеси и разрушаются органические и плохо окисляемые вещества. Широкое применение находит также электролиз [27].

Ввиду того, что сырьем для производства различных видов кож служат шкуры домашних и диких животных, в процессе их обработки употребляют большое количество различных химических веществ. Это может быть известь, серная кислота, сульфат аммония, кальцинированная сода, поверхностно-

активные вещества, смачиватели (метилловые эфиры, керосин, патока, синтаны) и другие реагенты, которые попадают в сточные воды и сбрасываются в канализацию. Кроме того, в сточные воды переходят и химические компоненты самих шкур: белки, жиры и жироподобные вещества, некоторые минеральные вещества, содержащие натрий, калий, кальций и другие элементы.

При физико-химической очистке сточные воды нередко обрабатывают коагулянтами, способствующими образованию хлопьевидного осадка [70, 71]. На поверхности хлопьев адсорбируются взвешенные и растворимые вещества. Разновидностями физико-химического метода очистки являются электрокоагуляция и электрофлотокоагуляция. Электрокоагуляция основана на пропускании электрического тока через систему электродов, погруженных в очищаемую жидкость. При этом происходит перезарядка некоторой части коллоидных частиц, что приводит к их слипанию и образованию хлопьев, которые затем оседают или всплывают.

Метод электрофлотокоагуляции можно применять для очистки высокодисперсных загрязнений. Он состоит в коагуляции загрязнений, формировании и закреплении пузырьков электролитического газа на поверхности скоагулированных частиц, что обеспечивает их флотацию. При физико-химическом методе очистки применяются миксеры, отстойники, коагуляционные резервуары с оборудованием для дозировки химических реагентов, отстойники для выделения осажденных и скоагулированных загрязнений и другое оборудование [76].

В кожевенной промышленности, как и в других отраслях промышленности, за последнее время широкое распространение получил флотационный метод очистки сточных вод [78]. Флотация при очистке сточных вод кожевенных заводов может применяться с целью выделения из общего стока отдельных компонентов - шерсти, жира, ПАВ; осветления и очистки общего стока в сочетании с обработкой его коагулирующими реагентами; локальной очистки стоков отдельных операций, например, для очистки сбросных хромовых стоков, в том числе с применением реагентов (подщелачивание хромосодержащих стоков с последующей флотацией

гидроксида хрома) и для очистки стоков отмоки и золениа от шерсти и жира. Наиболее приемлемыми оказались напорная и безнапорная флотация, а также электрофлотация, особенно в сочетании с электрокоагуляцией. По отношению к очистке стоков от ПАВ данный метод пока остается единственно приемлемым.

Существенным преимуществом флотации перед отстаиванием сточных вод является получение флотационного шлама более низкой влажности (90-95%), чем влажность осадка, образующегося при отстаивании (95-99,8%), поэтому шлама получается в 2-10 раз меньше. При непродолжительном пребывании сточных вод во флотационных установках (20-40 мин) обеспечивается высокий эффект очистки (до 90-98%) от нерастворимых примесей и взвешенных веществ [81].

Очистка сточных вод флотацией сопровождается одновременно такими явлениями, как аэрация, снижение концентрации поверхностно-активных веществ, окисление ряда токсичных веществ или их отдувка, что способствует дальнейшей очистке сточных вод, улучшает их общее санитарное состояние [87].

Для сточных вод кожевенного производства чаще других применяются флотационные установки с механическим диспергированием воздуха (импеллерные и безнапорные аппараты), флотаторы с выделением воздуха из раствора (напорные и эрлифтные установки), электрофлотация.

Сточные воды подаются во флотационный шерстежироулавливатель насосом при давлении не более 0,1 МПа. Эффект работы шерстежироулавливателя составляет (%): по взвешенным веществам - 35-40, по жиру - 70-75, по шерсти - 90-95, по хрому - 20-25, по СПАВ - 25-30, по сульфидам - 10, по окисляемости - 20-25 [89].

Количество образующегося шлама с влажностью 94-95% составляет 0,7-0,8% от количества обработанной воды. Шлам такой влажности образуется через 30-60 мин. При длительном накоплении (6-8 ч) влажность шлама снижается до 85%, а его объем уменьшается до 0,3-0,35% от количества обработанной воды. В 1 м³ такого шлама содержится 10-20 кг шерсти и 40-50 кг жира, что позволяет его сжигать. На дно флотационной камеры (в бункера) выпадает осадок, объем которого при влажности 94-95% через 8 ч накопления составит 0,35% от

обработанной жидкости. Осадок содержит минеральные и органические вещества, в том числе 15-20% жира, что также делает возможным его сжигание после предварительного обезвоживания. Концентрация остальных загрязнений остается достаточно большой, что связано с содержанием в стоках сильно диспергированных, коллоидных и растворенных органических веществ, успешное удаление которых требует изменения их агрегатной структуры. Нарушение агрегатной устойчивости этих веществ, в том числе и белка, достигается реагентной или электрохимической (электрокоагуляция) обработкой сточных вод [93].

Одним из эффективных методов очистки является адсорбционный, который чаще всего применяют для извлечения из сточных вод металлов. В качестве сорбентов используют активированные угли, синтетические сорбенты, отходы производства (зола, шлаки, опилки) [102].

Используются и неорганические сорбенты - силикагели, глины, алюмосиликаты и гидроксиды металлов. Для адсорбции металлов и хрома эти адсорбенты используются редко, поскольку энергия взаимодействия их с молекулами воды нередко превышает энергию адсорбции. В настоящее время наиболее распространенными адсорбентами являются активированные угли, к которым предъявляются определенные требования [106]:

- высокое сродство к органическим веществам;
- крупнопористость;
- высокая адсорбционная емкость;
- малая удерживающая способность при регенерации;
- высокая смачиваемость;
- низкая стоимость.

Процесс адсорбции применяют при очистке сточных вод от красителей и ПАВ. Методика заключается в интенсивном перемешивании адсорбента с раствором и последующей фильтрации раствора через слой адсорбента. Нередко для этой цели используют установки с псевдоожиженным слоем периодического или непрерывного действия. На большинстве предприятий в

качестве адсорбента применяют активированный уголь в виде частиц диаметром 0,1 мм. Процесс адсорбции может осуществляться в одну или несколько ступеней [107, 109].

Для сохранения структуры кожи и предотвращения гниения её подвергают обработке дубильными веществами. Для этой цели широко используют трехвалентный хром, обычно в виде гидрата основного сульфата хрома. Учитывая токсичность хрома, стоки, содержащие соединения хрома (VI) и хрома (III), подлежат обязательной очистке перед их сбросом в поверхностные источники.

Для извлечения хрома из хромсодержащих сточных вод стоки по отдельной канализационной линии направляются на обезвреживание в контактные отстойники. Обычно применяют горизонтальные отстойники. Отстойники оборудованы установкой для перемешивания сточных вод воздухом. В качестве барботеров применяют перфорированные трубы с диаметрами отверстий 5 мм в нижней части. Трубы находятся на расстоянии 3-6 см друг от друга и укладываются горизонтально вдоль стенок отстойника на подставках высотой 6-10 см от дна. Расстояние барботеров до противоположной стены при одностороннем пристенном расположении барботеров 1-1,5 м. Диаметр барботеров - 50 мм (при интенсивности барботирования менее 8 м³ на 1 м) и 75 мм (при большей интенсивности). Для сгребания осадка отстойники снабжены скребковыми механизмами [110].

В качестве реагентов для выделения из сточных вод хрома используют известь или едкий натр, при этом на 1 часть металлического хрома берут 1,11 части 2% негашеной извести или 4 части 5% едкого натра. Продолжительность нахождения сточных вод в контактных отстойниках - 30 мин, время отстоя - 24 ч. Отстойники оборудованы устройствами для откачки осадка и слива осветленных обезвреженных от солей хрома сточных вод [111].

Рядом исследователей изучена адсорбция хрома на активированном угле как функция рН [101]. Установлено, что хром (VI) легко адсорбируется на активированном угле в виде анионов, таких как HCrO_4^- и CrO_4^{2-} .

Для осаждения солей хрома применяют раствор кальцинированной соды [93]. Установка состоит из двух отстойников периодического действия, дозаторов-

вытеснителей для дозировки содового раствора, промежуточного бака сбора осадка, двухромных фильтр-прессов с поверхностью фильтрации 16 м² каждый. Хромсодержащие сточные воды откачивают из технологической аппаратуры в распределительный лоток, где часть их отбирают в объемах, равных объему содового раствора, необходимого для проведения реакции. Затем сточные воды поступают в поплавков дозатора-вытеснителя, который, погружаясь, вытесняет из бака раствор соды, пропорциональный количеству поступающих на высадку сточных вод. Основная часть хромсодержащих сточных вод и раствор соды из дозаторов-вытеснителей поступают в ерш-смеситель, где начинается реакция образования гидроксида хрома. Далее сточные воды направляются в отстойник. Отстаивание длится 15 ч.

Однако при химико-физической обработке не могут быть получены показатели удаления загрязняющих элементов, которые достигаются при биологической обработке.

1.2.3. Биологическая очистка

Для очистки сточных вод кожевенных заводов биологический метод является наиболее эффективным и широко распространенным [72, 75, 110]. Он основан на использовании закономерностей биохимического и физиологического самоочищения рек и других водоемов [77]. Биологический способ обработки сточных вод естественен, с помощью технических средств в установках он просто ускоряет то, что происходит в природе, за несколько дней достигая результата, который природа достигла бы за несколько месяцев или лет.

Организмы, осуществляющие биodeградацию загрязнений в очистном сооружении, попадают в него со сточной водой, из воздуха, почвы, заносятся птицами, насекомыми и животными, обитающими вблизи очистных сооружений. Большая часть таких организмов может размножаться непосредственно в очистном сооружении, что имеет значение в процессах селекции микроорганизмов [75].

При рассмотрении биологических способов очистки воды необходимо упомянуть о наличии в ней патогенных микроорганизмов. Они присутствуют в сточной воде на любой стадии биологической очистки, поэтому на очистных сооружениях применяется обязательная дезинфицирующая обработка химическими или физическими стерилизующими агентами (хлором, озоном, ультрафиолетом) [106].

Организмы, обитающие в очистных сооружениях, относятся к различным таксономическим группам :

- бактерии;
- микроскопические грибы;
- простейшие;
- водоросли;
- многоклеточные организмы.

В биофильтрах и аэротенках - двух основных типах очистных сооружений, используемых для биологической очистки сточных вод, создаются различные условия для жизнедеятельности живых организмов, и это влияет на их качественный и количественный состав. Наибольшее количество видов живых организмов описано в биофильтрах. Это связано с тем, что условия среды в биофильтрах неодинаковы в связи с различием в их конструкции и операционных характеристиках, поэтому различные организмы адаптируются к специфическим условиям обитания в них. В аэротенках разнообразие видов меньше и живые организмы не так разнообразны по видовому составу [106].

В реакторах обоих типов наиболее многочисленной группой являются бактерии, однако в установках с активным илом (аэротенках) их значительно больше. Главная функция бактерий - трансформация и биodeградация растворенных органических веществ. Они также осуществляют ферментативное разложение органических веществ с помощью экстрацеллюлярных (внеклеточных) ферментов. Средняя концентрация бактерий в активном иле - 10^{10} - 10^{12} на литр [105].

Микроскопические грибы конкурируют с бактериальными видами за источники питания, однако преимущество чаще всего бывает на стороне бактерий,

поэтому в аэротенках плесневые грибы менее многочисленны. Они получают преимущества при низких значениях рН в реакторе. Эта группа микроорганизмов шире представлена в биофильтрах, чем в аэротенках. Высокая концентрация микроскопических грибов приводит к, так называемому, вспуханию активного ила и препятствует дальнейшему его осаждению во вторичных отстойниках [105].

Микроскопические водоросли встречаются на поверхности загрузки биофильтров, поскольку условия (свет и питательные вещества) благоприятны для их развития. Кроме того, водоросли обитают и в биопрудах, которые используются на конечных стадиях биологической очистки сточных вод [102].

Группа простейших (саркодовые, инфузории и др.) являются типичными представителями микрофауны биофильтров. В аэротенках их численность зависит от нагрузки: чем ниже концентрация загрязнений, тем больше простейших. Простейшие питаются бактериями, микроскопическими грибами, водорослями и взвешенными органическими веществами, выполняя важнейшую функцию осветления стоков и осаждения активного ила или биопленки в очистных сооружениях [96]. Ареал распространения микрофауны (многоклеточных организмов) тот же, что и у простейших, они обитают в биопленке биофильтров и активном иле аэротенков при низкой нагрузке сточных вод. В очистных сооружениях можно обнаружить ракообразных, коловраток, насекомых и их личинок [93].

Наиболее часто в установках биологической обработки сточных вод встречаются следующие организмы [91]:

Микроорганизмы, наиболее часто обнаруживаемые в биофильтрах и аэротенках:

- *Pseudomonas* – окисляют спирты, жирные кислоты, парафины, ароматические углеводороды, углеводы и другие соединения;
- *Bacillus* – осуществляют деградацию нефти (парафинов, фенолов, нафтенов, альдегидов и жирных кислот);
- *Alcaligenes* - бактерии с широким спектром утилизации загрязнений;

- *Achromobacter* – осуществляют биодegradацию углеводов, спиртов, жирных кислот и других соединений;
- *Flavobacterium* – утилизируют углеводы, аминокислоты, белки, жирные кислоты;
- *Micrococcus* – окисляют растворимые легко доступные органические соединения;
- *Acinetobacter* - осуществляют утилизацию фосфора;
- *Gordonia* - бактерии, вызывающие пенообразование в аэротенках;
- *Microtrix* - бактерии, приводящие к вспуханию активного ила;
- Nitrobacter* - бактерии, окисляющие нитрит до нитрата. Чаще обитают в установках с низкой нагрузкой;
- *Nitrosomonas* – нитрифицирующие бактерии, окисляющие аммоний до нитрита. Развиваются в реакторах с низкой нагрузкой;
- *Desulfovibrio* - бактерии, восстанавливающие сульфаты, выделяют сероводород;
- *Sphaerotilus* - нитчатые бактерии, часто препятствующие осаждению активного ила, вызывая его вспухание. Эти бактерии нередко встречаются в сильно загрязненных стоках;
- *Zoogloea* - бактерии, выделяющие слизь, которая приводит к флокуляции активного ила;
- *Geotrichum* - микроскопические грибы, нередко приводят к вспуханию активного ила в реакторах;
- ФАО – фосфат-аккумулирующие микроорганизмы;
- ГАО - гликоген-аккумулирующие микроорганизмы;
- Дафнии - ракообразные, обитающие в установках с активным илом при очень низкой нагрузке. Являются индикатором хорошей биологической очистки;
- Crustacea - ракообразные, обитающие в аэротенках при низкой нагрузке;
- Rotifera - коловратки, обнаруживаются в реакторах с активным илом при низкой нагрузке. Свидетельствуют о чистоте стоков;

- *Vorticella* - сувойки, являются индикатором высокой степени очистки. Если в воде они доминируют, это свидетельствует о чистоте воды;

- *Tubifex* - малощетинковые красные черви 3-4 см длиной. Чаще всего обитают в биофильтрах и в сильно загрязненных сточных водах;

- Красные черви - подвижные личинки красного цвета 1-2 см длиной. Встречаются в сильно загрязненных стоках как в аэротенках, так и в биофильтрах;

- *Chironomidae* - мотыль (личинки комаров);

- Фильтровые мошки - насекомые длиной 2-5 мм, нередко весьма многочисленны в биофильтрах. Они не играют роли в очистке стоков, но могут создавать довольно неприятный фон [105].

Таким образом, основу биологической очистки сточных вод составляет деятельность многочисленных групп микроорганизмов, которые утилизируют находящиеся в стоках растворенные и коллоидные органические загрязнения и используют их в качестве источника питания и энергии в процессах своей жизнедеятельности. Биодegradация загрязнений осуществляется сообществом микроорганизмов различных таксономических групп, содержащим бактерии, микроскопические грибы, простейшие, водоросли, которые связаны в единый комплекс (биоценоз) различными видами взаимоотношений, таких, как метабиоз, симбиоз и антагонизм.

Главную роль в биодegradации загрязнений в этом биоценозе играют бактерии, число которых варьирует от 10^6 до 10^{14} микробных клеток на 1 г сухой биомассы. В активном иле или биопленке насчитывается, в среднем, 5-10 родов бактерий, а число видов может достигать нескольких десятков и даже сотен [106].

Такое разнообразие видов бактерий связано с наличием в сточной воде большого разнообразия органических и неорганических веществ. В то же время в сточной воде возможно развитие монокультуры бактерий, если в ее составе присутствует лишь один или несколько близких по химическому строению источников питания, т. е. один или несколько гомологов данного органического соединения [89].

При очистке сточных вод кожевенных заводов используют как естественные (поля орошения и фильтрации, биологические пруды), так и искусственные сооружения (биофильтры, аэрофильтры, аэротенки).

Биологическая очистка в аэротенках и биофильтрах сводится к сорбции загрязняющих веществ на активном иле или биопленке, проникновении загрязняющих веществ внутрь клеток и дальнейшей полной их минерализации внутри бактерий. Начальная стадия - сорбция - физико-химический процесс, а переработка адсорбированных загрязнений в аэробных условиях - микробиологический процесс. Сорбция на клетках протекает 5-10 минут. Микробиологический процесс обработки загрязнений осуществляется часы, иногда сутки. Протекание процесса зависит от следующих условий: температуры воды в установке, рН среды, наличии кислорода и других [89]. Схема биофильтра приведена на рисунке 2.

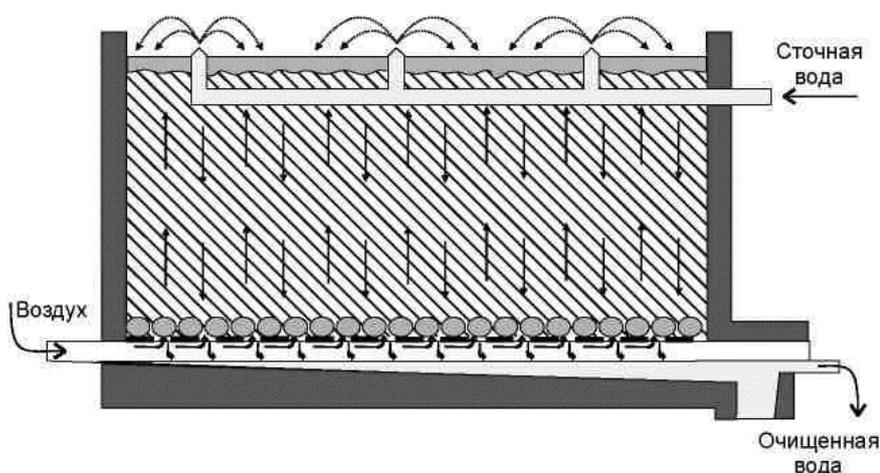


Рисунок 2 - Схема биофильтра

Типичный биофильтр включает в себя корпус, водораспределительное и воздухораспределительное устройство. Корпус заполнен загрузкой, в качестве которой используют щебень, галька, шлак, гравий, керамзит, полимерные гранулы и другие материалы с пористостью частиц 40-50% и плотностью 500-1500 кг/м³ [128]. Проходя через материал загрузки, сточная вода освобождается от загрязнителей - нерастворенных примесей, коллоидных и растворенных органических и неорганических веществ. Растворимые соединения адсорбируются на биопленке, покрывающей поверхность загрузки, проникают

через клеточную мембрану внутрь клетки и, являясь источниками питания и энергии, окисляются внутриклеточными ферментами. Таким образом, вещества, загрязняющие сточную воду, превращаются в биомассу активной биопленки, прикрепленной на частицах фильтра. Избыточное количество биопленки, представляющее из себя погибшие микроорганизмы, смывается протекающей через загрузку сточной водой и выносится из биофильтра.

Все существующие биофильтры по конструктивным особенностям загрузочного материала делят на два типа: с объемной и плоскостной загрузкой. Биофильтры с объемной загрузкой включают:

- капельные биофильтры с крупностью фракций загрузки 20-30 мм и высотой загрузки 1-2 м; высоконагруженные с крупностью гранул загрузки 40-60 мм и высотой загрузочного материала 2-4 м;

- башенные с крупностью фракции загрузки 60-80 мм и высоту слоя загрузки 8-16 м [36].

Капельные биофильтры используют при расходах сточных вод до 1000 м³/сут, а высоконагруженные и башенные рекомендуют применять при расходах 30-50 тыс. м³/сут и больше [37].

Биофильтры с плоскостной загрузкой классифицируют по типу загрузки:

- жесткая засыпная (полимерные кольца, обрезки труб, керамические, пластмассовые и металлические засыпные элементы), имеющие плотность от 100 до 500 кг/м³, пористость 70-90%, высоту слоя 1-6 м;

- жесткая блочная (решетки или блоки, собранные из чередующихся плоских и гофрированных листов, различные виды пластмасс (полиэтилен, полистирол, поливинилхлорид, полипропилен) с плотностью от 40 до 100 кг/м³, пористостью 90-97%, высотой слоя 2-16 м. В ряде случаев используются асбестоцементные листы с плотностью 200-250 кг/м³, пористостью 80-90%, высотой слоя 2-6 м;

- мягкая загрузка, состоящая из металлических сеток, синтетических тканей (капрон, нейлон) или пластмассовых пленок, закрепленных на специальных

каркасах или уложенных в виде рулонов. Они имеют плотность от 5 до 60 кг/м³, пористость 94-99%, высоту слоя 3-8 м [37].

Все применяемые для загрузки естественные и искусственные материалы должны удовлетворять следующим требованиям: при плотности до 1000 кг/м³ загруженный материал в естественном состоянии должен выдерживать не менее 10 циклов испытаний на морозостойкость, нагрузку - не менее 0,1 МПа, кипячение в 5% растворе соляной кислоты в течение 1 ч; материал не должен получать заметных механических повреждений или изменять массу загрузки не более чем на 10% первоначальной; загрузка должна быть одинаково распределена по высоте и по крупности частиц и только нижний слой биофильтра (высотой 0,2м) применяют более крупную загрузку с диаметром гранул 60-100 мм [40].

В капельном биофильтре загрязненная вода поступает в виде струй или капель. Воздух, необходимый для дыхания микроорганизмов, поступает через открытую поверхность биофильтра сверху или снизу, через дренажные отверстия в дне. Такие биофильтры могут использоваться только для очистки сточных вод с низкой нагрузкой по воде - 0,5 - 1 м³ воды на 1 м³ фильтра и чаще применяются для локальной биологической очистки.

Высоконагруженные биофильтры отличаются более высокой окислительной мощностью, поскольку они обладают лучшим воздухообменом и незаиляемостью. В таких фильтрах применяется более крупный загрузочный материал и повышенная гидравлическая нагрузка. Обычно они представляют круглые или прямоугольные сооружения со сплошными стенками и двойным дном, верхний имеет вид колосниковой решетки, а нижний - сплошной. Снизу, в междонное пространство, нагнетается воздух с помощью мощных вентиляторов. Поверхность загрузки биофильтра постоянно орошается сточной водой с возможно малыми перерывами. Такой тип биофильтров может обеспечить любую степень очистки загрязненных вод, поэтому он может использоваться для частичной или полной очистки [33].

В некоторых очистных установках встречаются конструкции закрытых биофильтров, в которых воздух подается только сверху аппарата.

Эксплуатационные преимущества закрытых биофильтров перед открытыми заключаются в том, что воздух, подающийся сверху вниз, способствует более интенсивному окислению органических загрязнений в верхней части фильтра, где, как правило, находится минимальное содержание кислорода в газовой фазе. Очистные сооружения, использующие закрытые биофильтры, имеют суточную производительность 170 - 2100 м³ [36].

При увеличении размера частиц загрузочного материала и их пористости пропускная способность фильтров увеличивается. Однако при увеличении крупности частиц загрузки уменьшается площадь поверхности, которая покрыта активной биопленкой. В этом случае рациональным способом повышения производительности установки будет увеличение пористости загрузочного материала биофильтра [47].

Применение биофильтров рентабельно при локальной биоочистке или для обработки сравнительно небольших количеств сточных вод, поскольку они менее энергоемки по сравнению с аэротенками.

Процесс биологической очистки загрязняющих веществ в аэротенках происходит при непосредственном контакте сточных вод с микроорганизмами активного ила в присутствии растворенного кислорода, с последующим отделением очищенной воды от активного ила во вторичных отстойниках. Активный ил - искусственно выращиваемый биоценоз при аэрации загрязненных вод, в состав которого входят бактерии гетеротрофы, хемотрофы, простейшие и многоклеточные животные, осуществляющие биodeградацию загрязняющих веществ. При этом происходит очистка сточной воды в результате биосорбции, биохимического окисления, поедания бактерий и простейших.

Обычно аэротенки - это прямоугольные резервуары, по которым протекают загрязненные сточные воды, смешанные с активным илом. Обработываемая вода постоянно перемешивается воздухом, вводимым с помощью механических или пневматических устройств, и насыщается кислородом, необходимым для жизнедеятельности бактерий, простейших и многоклеточных животных. На

рисунке 3 приведен типичный аэротенк, расположенный на острове Голодный Волгоградской области.



Рисунок 3 - Аэротенк для очистки промышленных и бытовых сточных вод на острове Голодный Волгоградской области

Конструкции применяемых аэротенков классифицируют в зависимости от способа подачи сточных вод и их потока на три группы: аэротенки-вытеснители с «поршневым» потоком сточных вод, аэротенки-смесители с рассредоточенной или центральной подачей и выпуском сточных вод и аэротенки промежуточного типа. К вытеснителям относятся одно-, двух- и т.д. коридорные аэротенки, в которых коридоры отделены друг от друга перегородками, не достигающими до одной из торцевых стен. На торцевых стенках расположены каналы для входа и отведения сточной воды. В зависимости от размеров в этих аэротенках наблюдается в той или иной степени полное вытеснение потока сточных вод. Особенностью процесса, протекающего в аэротенках-вытеснителях, является изменение концентрации загрязняющих веществ и скорости очистки по длине аэротенка. Скорость окисления загрязняющих веществ в аэротенках-вытеснителях происходит неравномерно. В начале сооружения - быстрее, а по мере

приближения к концу аэротенка, благодаря уменьшению количества субстрата, процесс замедляется. Аэротенки - вытеснители предпочтительны при очистке сточных вод сложного состава, содержащих значительную долю промышленных сбросов.

В аэротенках - смесителях обеспечивается полное и быстрое смешение сточных вод с массой активного ила, в установившемся режиме они работают с равномерными скоростями процесса очистки. Предпочтительнее использовать аэротенки - смесители при очистке высококонцентрированных промышленных сточных вод, сходных по составу с бытовыми, а также при неравномерном притоке и часто возникающих залповых перегрузках. Однако при использовании смесителей существует угроза развития вспухания активного ила, во всяком случае, они более подвержены этому, чем другие конструкции аэротенков по причине высоких нагрузок на активный ил по всему объему сооружений. Аэротенки-смесители состоят из двух отделений: в первом, собственно аэротенке, происходит сорбция и последующая минерализация легко окисляемых органических веществ; во втором – регенераторе, где происходит перемешивание активного ила в отсутствие субстрата, - протекает окисление восстановление его нормальной активности [61].

К аэротенкам промежуточного типа относятся, например, коридорные аэротенки с рассредоточенной по длине подачей сточных вод и с впуском активного ила в начало коридора.

Кроме указанной классификации аэротенки часто разделяют по виду применяемой аэрации: на аэротенки с механической или пневматической аэрацией (наиболее распространенной).

Окисление загрязняющих веществ активным илом происходит за счет жизнедеятельности аэробных бактерий, которые прикреплены к хлопьям активного ила. Органические вещества, находящиеся в сточных водах, окисляются внутри клетки до простых соединений - углекислого газа и воды, в результате чего обеспечивается прирост бактериальной массы активного ила.

Высокая концентрация активного ила в сточных водах, а также непрерывное поступление кислорода способствуют интенсивному биохимическому окислению органических веществ, в связи с чем аэротенки являются одним из наиболее эффективных сооружений биологической очистки. Аэротенки обычно проектируются в зависимости от необходимой степени снижения содержания органических загрязняющих веществ: на полную биологическую очистку (до БПК от 20 до 25 мг/дм³) или частичную очистку (БПК > 25 мг/дм³) [63].

На протяжении многих лет ведутся работы по проектированию, строительству и реконструкции очистных сооружений. При проектировании сооружений часто не учитывается перспектива роста производительности предприятий. Отсутствие надежных научно обоснованных методов очистки от токсичных органических и неорганических соединений приводит к тому, что построенные даже по новым проектам очистные сооружения на многих заводах имеют низкую эффективность, несмотря на высокие капитальные затраты [62].

В осуществлении биологической очистки сточных вод конкретного очистного сооружения могут принимать участие разнообразные группы живых организмов. Можно составить лишь очень приблизительный перечень видов микроорганизмов, входящих в состав биоценоза, так как он очень сильно зависит от состава сточной воды и внешних условий. Обычно в биоценозе очистных сооружений доминирующими являются виды бактерий, осуществляющие разложение основного загрязнителя сточной воды данного предприятия. Количество и качественный состав сточных вод во многом зависят от количества и качества применяемой в производстве воды, от используемых при этом сырья и химических материалов, а также технологических процессов. Перспективным является введение в сооружения биологической очистки микробных препаратов, интенсифицирующих процесс биодegradации преобладающих или наиболее опасных токсикантов.

В настоящее время предложено значительное количество микробных биопрепаратов отдельно, или в комбинации с различными реагентами, для очистки

сточных вод, загрязненных, в основном, нефтью и нефтепродуктами [7, 11, 30, 44, 64, 72, 77, 80, 111].

В литературе встречаются отдельные научные работы, посвященные использованию бактериальных культур для увеличения экологической безопасности технологии кожевенного производства. Так, Перелыгина Л.С. [72] предложила экобиотехнологический метод проведения подготовительных процессов переработки овчинно-шубного сырья и снижения уровня токсического загрязнения сточных вод, образующихся после проведения подготовительных процессов. Автором показана возможность использования прокариотических организмов со специфическими свойствами в процессе отмоки и обезжиривания меховой овчины. Перелыгиной Л.С. выделены микроорганизмы *Amphibacillus* sp, способные расщеплять жировые вещества в присутствии синтетического поверхностно-активного вещества (СПАВ) «Превоцелл W-OF-7».

Пузыревой С.Г. [80] из сточных вод мехового производства была выделена бактериальная культура *Erwinia* sp., которая применена в комплексе с анионоактивными и неионогенными СПАВ в процессе обезжиривания меховой овчины. Это позволило снизить уровень токсического воздействия на окружающую среду за счет уменьшения расхода детергента и исключения из технологии использование формальдегида.

Шалбуев Д.В. [111] разработал биотехнологический метод переработки овчинно-шубного и пушно-мехового сырья на основе использования прокариотических организмов, обладающих специфическими и/или заданными свойствами, и отходов молочной промышленности. Автором предложены методы обработки сырья и пикелевания с помощью липидоокисляющих и кислототолерантных микроорганизмов, позволяющие снизить уровень техногенного воздействия на окружающую среду, расход химматериалов, электроэнергии, водопотребления и водоотведения.

В связи с тем, что концентрация вредных веществ в сточных водах кожевенных и меховых предприятий значительно выше ПДК, установленных СНиП II-32-74 для этих вод при сбросе в городскую канализационную сеть, на

территории заводов часто размещают локальные очистные сооружения. Они предназначены для снижения концентрации вредных веществ, усреднения количественного и качественного состава стоков перед их подачей в городскую сеть с последующей биологической очисткой. В локальных очистных сооружениях желательно применять специфические микробные сообщества, утилизирующие основные загрязняющие вещества сточных вод данного производства.

Кроме того, перспективны исследования путей интенсификации биодegradации загрязнений микробными биопрепаратами с повышенными ростовыми характеристиками, что приводит к ускорению очистки стоков и повышению производительности работы установок. Особое значение придается разработке новых, высокопродуктивных микробных сообществ с целью их использования в локальных очистных сооружениях при очистке промышленных сточных вод от ксенобиотиков, не доступных для биодegradации обычными системами активного ила.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Объекты исследования

Основными 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, помещали в пластиковые пузырьки с плотно закрывающимися крышками. Кроме того, в работе использовали кожную мездру и почву, взятую с территории завода.

2.2. Питательные среды и реактивы

Для выращивания культур применяли плотные и жидкие питательные среды. Для выделения микроорганизмов использовали селективные питательные среды, содержащие в качестве единственного источника углерода отходы переработки кожной мездры кожевенного производства, и следующие минеральные соли (г/л):

- аммония хлорид – 0,625;
- кальция хлорид - 0,0025;
- марганца хлорид - 0,005;
- натрия хлорид - 1,25;
- магния (II) сульфат - 0,05;
- железа (II) сульфат - 0,0025;
- натрия фосфат однозамещенный - 2,5;
- калия фосфат двузамещенный - 0,25.

Плотная селективная питательная среда содержала, помимо кожной мездры и минеральных солей, агар-агар в концентрации 2%. Минеральные компоненты данных сред были произведены НПО «Реахим» [32].

Для изучения биохимических свойств микроорганизмов применяли дифференциально-диагностическую среду производства ЗАО "НПО Биоконт" (г. Оболенск, Московская область), имеющую следующий состав (г/л):

панкреатический гидролиз казеина - 15,0;
экстракт пекарных дрожжей - 3,0;
натрия хлорид - 3,0;
натрия сульфит - 1,0;
натрия фосфат двузамещенный - 1,0;
железа (II) сульфат - 0,01;
аммоний молибдат - 0,6;
агар - 17,0.

Кроме того, в экспериментах использовали питательный бульон и питательный агар производства ООО «Биокомпас» (г. Углич), а также сухой ГРМ-агар рН 7,3 производства ЗАО "НПО Биоконт" (г. Оболенск, Московская область) следующего состава (г/л):

панкреатический гидролизат рыбной муки - 24,0;
натрия хлорид – 4,0;
агар – 12,0.

Все питательные среды готовили на дистиллированной воде и стерилизовали автоклавированием при 0,5-1 атм в течение 15-30 минут.

С целью идентификации выделенной культуры использовали кровяной агар и желточно-солевой агар Чистовича.

Кровяной агар готовили следующим образом. В 200 мл расплавленной плотной питательной среды, охлажденной до 45⁰С, в асептических условиях добавляли 2 мл дефибринированной стерильно взятой крови кролика и разливали в чашки Петри.

Для приготовления желточно-солевого агара Чистовича в расплавленный и охлажденный питательный агар добавляли (20% по объему) стерильную желточную взвесь (1 желток куриного яйца на 200 мл стерильного 0,89% раствора хлорида натрия). Среду быстро перемешивали и разливали в

стерильные чашки Петри. При получении биопрепарата использовали метод консервирования и хранения спор с добавлением сахарозы и крахмала [70].

В работе применяли красители - фуксин Пфейффера, кристаллический фиолетовый, нейтральный красный и метиленовый синий (Леффлера). Среды и реактивы готовили по обычным методикам, изложенным в руководстве [51].

2.3. Методы исследования

Методика выделения микроорганизмов включала разведение проб сточной воды или почвенной вытяжки, их посев на селективные среды и дальнейший визуальный анализ выросших колоний, из которых получали чистые культуры, отсевая на скошенный агар.

Для приготовления почвенной вытяжки 1 г почвы заливали 10 мл физиологического раствора (0,89% раствора хлорида натрия), перемешивали, отстаивали в течение 1 мин. Надосадочную жидкость после отстаивания использовали в качестве почвенной вытяжки.

Пробы сточной воды и почвенную вытяжку 10-кратно разводили физиологическим раствором и производили посев по 0,1 мл на пластинки с селективной питательной средой. Посевы инкубировали в течение суток в термостате при температуре 34⁰С и сутки - при комнатной температуре (18⁰С), после чего проводили учет результатов (анализ роста изолированных колоний микроорганизмов). Определяли вид колонии, её окраску, размеры, характер края.

После выделения микроорганизмов из выросших на селективной питательной среде колоний определяли наиболее активный штамм и пересеивали его на пластинки питательного агара для культивирования микроорганизмов (ГРМ-агар).

Идентификацию микроорганизмов проводили, используя определитель Берджи [66].

Морфологические свойства выделенных культур оценивали путем окраски по Грамму и анализа клеток с помощью оптического микроскопа МЛ-1 (производства ЛОМО, г. Санкт-Петербург).

Биохимические свойства выделенных бактерий исследовали по методикам, описанным в руководствах [59, 85]. Способность к гидролизу крахмала (амилазную активность) определяли посевом на питательную среду, содержащую 0,2 % растворимого крахмала. После суточной инкубации среду заливали раствором Люголя и по наличию бесцветных участков вокруг изолированных колоний судили о наличии амилазы. Анализировали результаты реакций Фогеса-Проскауэра, оксидазную и уреазную активность. Гемолизную активность определяли на кровяном агаре, способность к утилизации цитрата - при культивировании на цитратном агаре Симмонса [51]. Изменение цвета среды с зеленого на синий свидетельствует о положительном результате теста.

Изучали способность выделенных микроорганизмов к росту на среде с 6,5% хлорида натрия и при 55°C. Кроме того, биохимические свойства были исследованы методом нанесения культуры на индикаторные бумажные полоски (г. Нижний Новгород, предприятие по производству бактериальных препаратов Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии). Диаметр клеток определяли с помощью электронной микроскопии на сканирующем электронном микроскопе Versa 3D DualBeam (FEI, США) при увеличении в 35000 раз. Наличие спор определяли методом окраски клеток по Ожешко.

Интенсивность роста и накопление биомассы бактериальных штаммов оценивали оптическим методом с помощью прибора КФК-2-УХЛ-4.2 в кюветах с длиной оптического пути 5,065 мм, при длине волны 670 нм.

РН питательных сред и культуральных жидкостей определяли с использованием рН-метра Hi2215 (HANNA Hi instruments Германия).

Хранение выделенных микроорганизмов проводили по модифицированному методу Леляка А.И. [69].

2.4. Математическая обработка результатов

Полученные в ходе экспериментов данные подвергали статистической обработке с помощью программы BIOSTAT. Результаты считали достоверными, если вероятность ошибки не превышала 0,05. Статистические методы включали определение среднего значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$) [75]. Математическое моделирование роста биопрепарата в изучаемых экспериментальных условиях осуществляли на ЭВМ методом регрессионного анализа [8, 21]. Для проверки достоверности, воспроизводимости результатов и адекватности моделей 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

В качестве микробиологической модели для исследования были использованы природные штаммы, выделенные из сточной воды и почвы, взятых на кожевнном заводе ООО «Шеврет» г. Волгограда. Пробы сточной воды и почвенную вытяжку, приготовленную, как описано в разделе 2.3 «Методы исследования», высевали на селективные плотные питательные среды, содержащие в качестве единственного источника углерода отходы переработки кожи - кожную мездру. После инкубации посевов в течение 24 ч при 37° С и 48 ч при 18° С, проводили визуальный анализ выросших колоний, который позволил выявить семь видов колоний, отличающихся по культурным и морфологическим свойствам. В таблице 2 приведены основные свойства выделенных культур.

Таблица 2 - Культурные и морфологические свойства выделенных бактериальных штаммов

Источник выделения	Культуральные свойства				Морфологические свойства
	цвет	край	поверхность	размер, мм	
сточная вода	бледно-розовый	ровный	влажная блестящая	4	грамм + кокки
	бледно-розовый	ровный	влажная блестящая	3	грамм - палочки
	бледно-розовый	ровный	влажная, блестящая	3	грамм - кокки
	желтый	ровный	влажная, блестящая	2	грамм + кокки
	молочно-белый	неровный	сухая, шероховатая	2-7	грамм + биполярные палочки
	насыщенно-розовый	ровный	влажная, блестящая	2	грамм - кокки
вытяжка из почвы	белый	неровный	сухая шероховатая	2-3	грамм + кокки

Результаты, представленные в таблице 2, свидетельствуют, что из сточной воды кожевенного предприятия и почвенной вытяжки было выделено семь штаммов, отличающихся между собой по культуральным и морфологическим свойствам.

На следующем этапе исследований определяли скорость роста выделенных культур в селективной жидкой питательной среде, содержащей в качестве единственного источника углерода отходы переработки кожной мездры и минеральные соли. Состав среды приведен в разделе 2.2 «Питательные среды и реактивы».

Высев штаммов проводили в объеме 0,1 мл в пробирки с 3 мл среды, концентрация бактерий - 10^9 м.к./мл. Посевы выдерживали при температуре 37°C в течение 18 ч. Интенсивность роста и накопления биомассы микроорганизмов оценивали оптическим методом с помощью фотокolorиметра. В результате экспериментов было установлено, что штаммы № 1, 2, 6 и 7 давали рост, практически не выявляемый с помощью фотокolorиметрического метода. Оптические плотности взвесей микроорганизмов штаммов № 3, 4 и 5 представлены на рисунке 4.

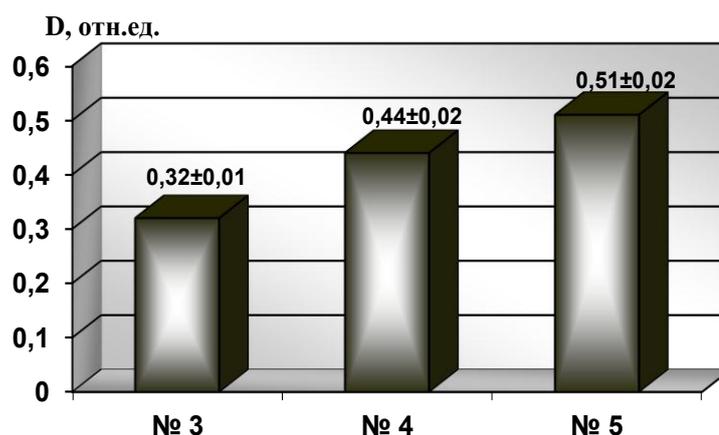


Рисунок 4 - Оптическая плотность взвесей биомассы трех штаммов выделенных микроорганизмов

Таким образом, в результате экспериментальной работы с выделенными бактериальными штаммами были отобраны три микробных культуры, дающие наибольшее количество биомассы на селективной питательной среде. Наибольший прирост биомассы наблюдали у штамма № 5.

Для более объективной оценки деструктирующей 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 [70]. В гидролизат добавляли раствор, содержащий источники минеральных компонентов (г/л): CaCl_2 – 0,0025; NH_4Cl – 0,625; NaCl – 1,25; MgSO_4 – 0,05; Na_2HPO_4 – 2,5; MnCl_2 – 0,005; KH_2PO_4 – 0,25; FeSO_4 – 0,0025. Соотношение органических и неорганических веществ подбирали экспериментально, варьируя их концентрации от 25 до 50%. Посев культур на среды (3 мл) производили в объеме 0,1 мл с концентрацией бактерий 10^9 м.к./мл. Посевы выдерживали при температуре 37°C в течение 18 ч. Интенсивность накопления биомассы микроорганизмов определяли оптическим методом на фотоэлектроколориметре.

Результаты накопления биомассы тремя бактериальными штаммами на средах с различным содержанием белкового гидролизата, полученного из кожной обрезки, представлены на рисунке 5.

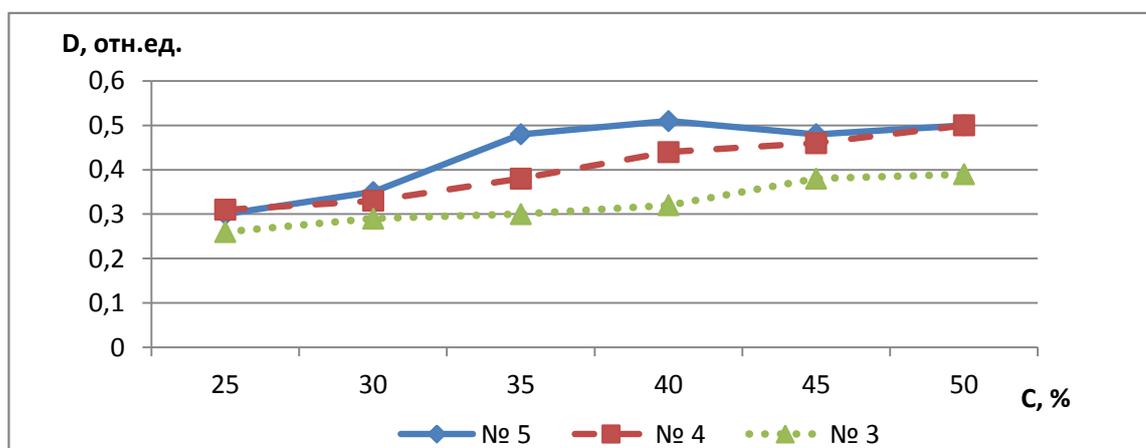


Рисунок 5 - Накопление биомассы бактериальными штаммами в средах с различным содержанием белкового гидролизата

Данные, приведенные на рисунке 5, свидетельствуют о том, что максимальный прирост биомассы у всех штаммов, выделенных из сточной воды, получен при соотношении источников биогенных элементов (из белкового гидролизата) и минеральных компонентов 50:50. Наиболее высокой скоростью накопления биомассы отличался штамм № 5, который достигал максимальной концентрации уже при 35-40% концентрации белкового 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.

Исследование культуральных свойств бактериального штамма проводили путем анализа колоний, выросших из отдельных клеток на пластинках плотной питательной среды в чашках Петри. Колонии, формируемые выделенным штаммом, представлены на рисунке 6.



Рисунок 6 - Колонии штамма на плотной питательной среде (x 120)

На рисунке 7 приведена микрофотография края колонии исследуемого бактериального штамма.

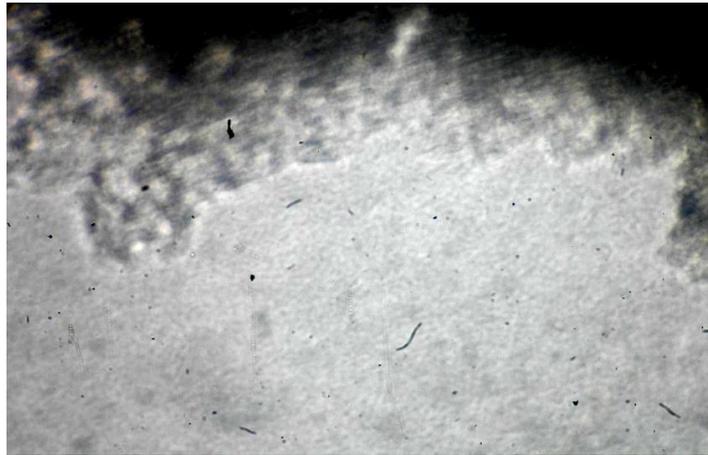


Рисунок 7 - Край колонии бактериального штамма (x 120)

Результаты анализа культуральных свойств показали, что при росте на плотной питательной среде культура формирует круглые, сухие, плоские колонии серовато-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. Микроорганизмы окрашивали дифференцированным методом по Грамму [51]. Результаты окрашивания представлены на рисунке 8.

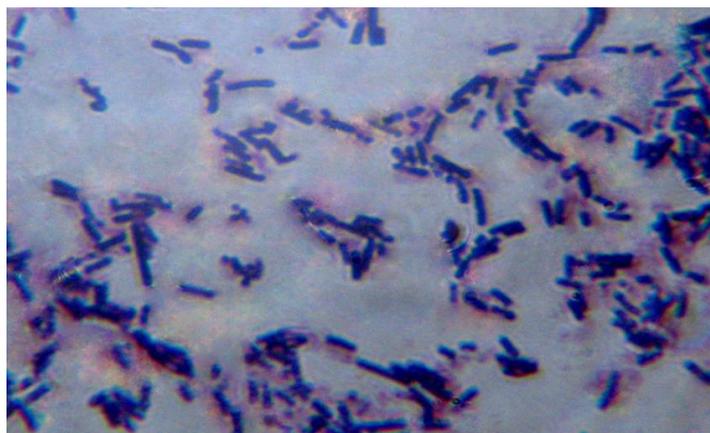


Рисунок 8 - Результаты окраски по Грамму выделенного бактериального штамма (x 1350)

Окраска бактериальных клеток по Грамму показала, что выделенный из сточной воды кожевенного производства штамм является грамположительным, так как микроорганизмы окрасились в темно – фиолетовый цвет.

Окраска клеток по методу Ожешко позволила выявить наличие спор, их вид и расположение. На рисунке 9 представлена микрофотография спор культуры.

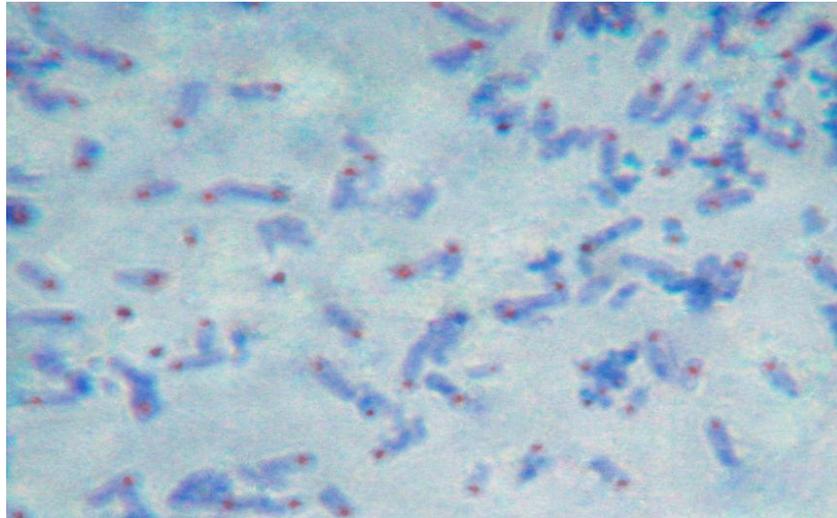


Рисунок 9 - Окраска спор по методу Ожешко (x 1350)

Споры микробных клеток имели вид круглых образований рубиново – красного цвета, находящихся в теле микробной клетки, их расположение, в основном, терминальное. Вегетативные тела микробных клеток были окрашены в синий цвет.

Исследование биохимических свойств показало, 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 и данных литературы [51, 60, 81, 91, 104] позволил

отнести их к семейству Bacillaceae, роду Bacillus, виду subtilis. Выделенный штамм был обозначен Bacillus subtilis ВГТУ5 и был депонирован в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» (свидетельство № 96 от 11.11.15, штамму присвоен № В-7837).

Штамм использовали в дальнейшей работе по конструированию биопрепарата для интенсификации процесса биологической очистки сточных вод кожевенных производств.

3.3. Исследование липидоокисляющей способности биопрепарата

Одним из основных загрязнителей сточных вод кожевенного производства являются жировые вещества [52]. Недостаточная очистка стоков от жировых загрязнений приводит к появлению неприятного запаха в результате гниения органики, образованию пробок в канализационных трубах и коммуникациях, нарушению технологических параметров работы очистных сооружений. Липиды могут легко утилизироваться многими видами микроорганизмов. В связи с этим в работе были определены липолитические свойства выделенного штамма *B. subtilis* ВГТУ5. Липидоокисляющие свойства бактерий определяли по характеру роста в бульоне Штерна, в котором использовали в качестве единственного источника углерода оливковое масло, добавляемое в концентрации 1 мл на 100 мл среды. Бактерии, проявляющие липолитическую активность, при ферментации оливкового масла извлекают из него альдегиды, подкисляя среду, при этом окраска бульона переходит из золотисто-желтой в розовую.

Методика эксперимента сводилась к следующему. Бульон Штерна стерилизовали, разливали по 10 мл в пробирки и засеивали по 0,1 мл исследуемой культуры в концентрации 10^9 м.к. в 1 мл. Засеянные пробы инкубировали в течение 120 ч при 27°C, после чего определяли в них pH. В качестве контрольного образца применяли бульон Штерна, не засеянный микроорганизмами. Интенсивность роста и концентрацию биомассы биомассы оценивали макрокультуральным методом путем подсчета колоний, выросших после высева

культуральной жидкости на в чашки Петри с плотными питательными средами. Результаты экспериментов приведены на рисунке 10.

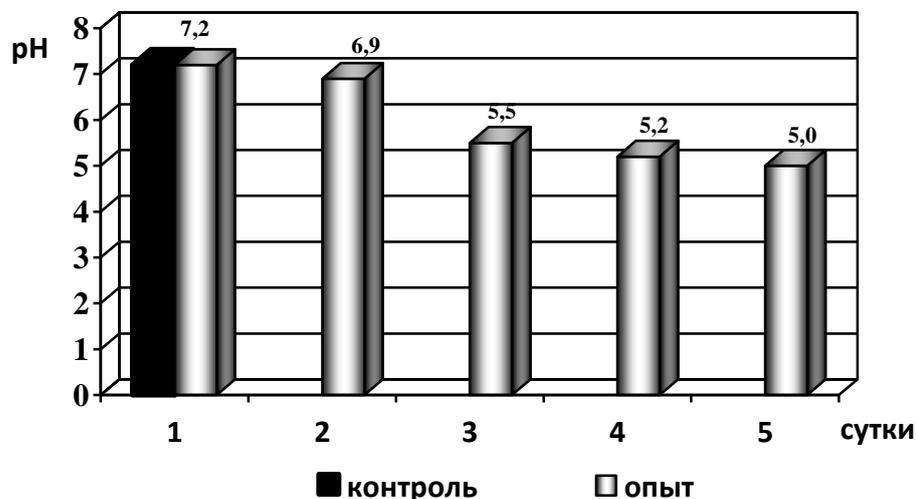


Рисунок 10 – Липидоокисляющая активность штамма *B.subtilis* ВГТУ5

Результаты, представленные на рисунке 10, позволяют сделать вывод, что в процессе культивирования штамма *B.subtilis* ВГТУ5 в бульоне Штерна в течение 5 суток происходит снижение рН среды с 7,2 до 5,0, что свидетельствует о выделении альдегидов, ферментирующих окисляющих липиды.

Кроме того, липидоокисляющую способность культуры оценивали в питательной среде с животными жирами. С целью подбора оптимальной концентрации жира были приготовлены жидкие питательные среды, содержащие в качестве единственного источника углерода свиной жир в различных концентрациях (от 0,5 до 2,0%) и минеральные компоненты. Среда стерилизовали автоклавированием в течение 15 мин при 120°C.

С целью получения мелкодисперсной жировой эмульсии в питательной среде, которая легче утилизируется бактериальной клеткой, питательные среды обрабатывали ультразвуком при силе тока 0,54А и частоте 44кГц. В приготовленные питательные среды вносили микроорганизмы и выращивали их при температуре 27°C в течение 24 ч. Концентрацию биомассы (С) оценивали по результатам высева микроорганизмов и подсчета выросших колоний на плотной питательной среде. Результаты экспериментов представлены на рисунке 11.

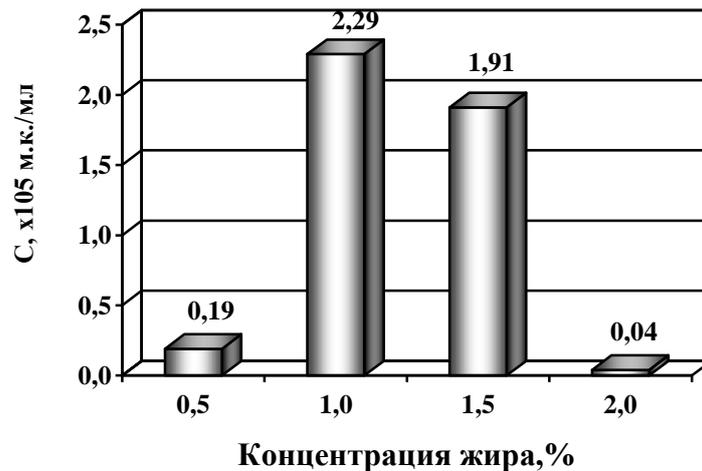


Рисунок 11 - Урожайность культуры *V.subtilis* ВГТУ5 в средах, содержащих животный жир

Данные, приведенные на рисунке 11, свидетельствуют, что штамм *V.subtilis* ВГТУ5 обладает 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 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 на популяцию клеток *V.subtilis* ВГТУ5 ультрафиолетового облучения с длиной волны 260 нм. Длительность облучения подбирали экспериментальным путем. Уровень накопления биомассы оценивали оптическим методом на фотоколориметре. Контрольной пробой служила бактериальная культура, не подвергнутая воздействию ультрафиолетового облучения.

Методика экспериментов сводилась к следующему. Суточную культуру в концентрации 10^9 м.к./мл, полученную по стандарту мутности 10 единиц, разводили физиологическим раствором до концентрации 10^3 м.к./мл, высевали на пластинки плотной питательной среды для получения изолированных колоний и подвергали мутагенезу, облучая ультрафиолетовым светом в течение 8 и 12 минут. После УФ-обработки бактерии инкубировали при 37°C в течение 18 ч. Полученные из отдельных клеток штамма колонии (клоны) отсеивали на скошенный агар, после чего высевали в жидкие питательные среды. Уровень накопления биомассы каждым клоном определяли фотоколориметрическим методом. Результаты одного из экспериментов с тремя клонами штамма *V.subtilis* ВГТУ5 приведены в таблице 3.

Таблица 3 - Оценка накопления биомассы тремя клонами культуры *V.subtilis* ВГТУ5 после обработки ультрафиолетовым облучением

Время облучения, мин	Номер клона	Оптическая плотность, отн. ед	% отклонения от контроля
8	1	0,203±0,04	+76,5
	2	0,270±0,05	+134,8
	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	

Результаты проведенного эксперимента свидетельствуют, что ультрафиолетовое облучение в течение 8 мин приводило к увеличению концентрации клеток в суспензии по сравнению с контролем. Наибольшая интенсивность накопления биомассы обнаружена у клона № 2 (превышение оптической плотности суспензии по сравнению с контрольным вариантом составило 134%). Ультрафиолетовое облучение бактерий с экспозицией 12 мин привело к снижению уровня накопления биомассы по сравнению с контролем. Высокопродуктивный клон № 2 был использован в дальнейших исследованиях в качестве бактериального биопрепарата *Bacillus subtilis* ВГТУ5.

3.5. Консервация и хранение биопрепарата

Необходимым условием успешной работы с различными микробными культурами является правильное поддержание их в рабочем состоянии, сохранение жизнеспособности клеток, а также морфологических, физиологических и других свойств, важных для исследователя.

Современные методы хранения и консервации достаточно эффективны при поддержании микробных культур и обеспечивают сохранение микроорганизмами жизнеспособности и генетической стабильности в течение весьма длительных сроков.

Наиболее распространен способ хранения микроорганизмов путем периодических пересевов на свежие питательные среды, сохранение культур под минеральным маслом, лиофильное высушивание, хранение при низких температурах и на адсорбентах в высушенном состоянии. Выбор того или иного метода чаще всего зависит от направления дальнейшего использования микроорганизмов и имеющегося оборудования.

Метод поддержания культур микроорганизмов регулярными пересевами прост, доступен и позволяет контролировать чистоту штаммов. Однако он имеет ряд существенных недостатков. Частые пересевы способствуют снижению биохимической активности микробных культур и повышают вероятность

контаминации ее посторонней микрофлорой. Кроме того, при частых пересевах в жидких питательных средах возникает опасность появления спонтанных мутантов. Данный метод использовался нами при повседневной работе с выделенными микроорганизмами.

Хранение под стерильным минеральным маслом широко применяется в микробиологической практике, он прост, удобен в обращении и экономически выгоден. Однако, как и при пересевах на свежую питательную среду, существует возможность через определенный промежуток времени (различный для каждого вида) утраты жизнеспособности и свойств, появление мутантных вариантов штамма. Для повседневной работы с микробными клетками он неудобен, так как возникает необходимость освобождения культуры от масла путем нескольких пересевов на свежую питательную среду.

Лиофилизация – высушивание под вакуумом замороженных клеток - позволяет сохранить их без изменения жизнеспособности и основных свойств в течение десятков лет. Это связано с тем, что клетки, лишаясь свободной воды в условиях криогенных температур, переходят в состояние анабиоза. Однако данный метод, также как хранение при низких температурах, требует наличия специальной аппаратуры, зачастую дорогостоящей.

Выделенный нами штамм относится к спорообразующему роду *Bacillus*, а, как известно, споры бактерий отличаются наиболее длительным сроком хранения при высушивании [69].

Для консервации и хранения культуры нами был выбран модифицированный нами метод высушивания спор на воздухе в присутствии крахмала и сахарозы, разработанный Леляком А.И. с соавт. [69].

Суточную культуру *B. subtilis* ВГТУ5 смывали 0,89% раствором NaCl и готовили взвесь клеток с концентрацией 10^7 м.к./мл. Полученную суспензию в объеме 0,2 мл высевали на плотный питательный агар в чашки Петри и инкубировали в течение суток при температуре 37°C. С целью перевода бактерий в спорную форму посеvy выдерживали 24 ч при 3 °C. Культуру смывали с агара заранее приготовленной смесью крахмала и сахарозы в соотношении 1:1,

переносили в колбу, в которую дополнительно вносили сахарозу. Иммобилизация спор бацилл на крахмале обеспечивает им механическую защиту, равномерное распределение в массе наполнителя, а также предотвращает их слипание. Сахароза является не только сорбентом-наполнителем, но и оказывает на споры стабилизирующий и консервирующий эффект, создает более мягкие условия для хранения [69].

Споры бактерий, иммобилизованные на крахмале в присутствии сахарозы, хранили при температуре не выше 10°C в колбе, закрытой ватно-марлевой пробкой. Ежемесячно проводили проверку жизнеспособности биопрепарата (спор бактерий) путем высева на пластинки питательного агара.

3.6. Иммобилизация бактериального штамма, выделенного из сточных вод кожевенного производства

Иммобилизация – это процесс прикрепления биологических систем, например, клеток или их метаболитов, к поверхности нерастворимых природных или синтетических носителей различной природы [94].

Иммобилизованные клетки имеют ряд преимуществ перед клетками обычной культуры [32]:

- 1) существенное упрощение операций разделения (по окончании процесса или одной из его стадий) используемого катализатора и сред, содержащих целевые продукты. Это позволяет перейти от периодических схем к более производительным непрерывным технологиям;

- 2) для непрерывных процессов появляется принципиальная возможность заметно более длительной эксплуатации биокаталитических свойств клеток в иммобилизованном состоянии в противовес, как правило, однократному использованию свободных культур;

- 3) повышения продуктивности превращения субстратов в конечные производные в результате увеличения концентрации биомассы в единице рабочего объема реактора;

4) снижение энергозатрат на процесс в целом, упрощение процедуры выделения и очистки конечных продуктов;

5) повышения устойчивости клеток к действию различных неблагоприятных инактивирующих внешних факторов (температура, кислотность, концентрация электролитов или токсических веществ и других).

Бактериальные клетки, участвующие в технологиях управляемой аэробной очистки промышленных и бытовых сточных вод, представляют собой иммобилизованные системы, поскольку находятся в прикрепленном состоянии на хлопьях активного ила в аэротенках или в биопленке на гранулах загрузки биофильтров. Иммобилизованные на нерастворимых носителях микроорганизмы все шире применяются для усовершенствования локальных методов биологической очистки сточных вод предприятий [13, 44].

Среди известных методов иммобилизации в применении к целым клеткам включение биологических объектов в полимерные структуры является наиболее перспективным [47]. Преимущества метода заключается в простоте применяемых методик, возможности создавать иммобилизованные препараты любой геометрической конфигурации (гранулы, волокна, плёнки и т.п.), также сохранении жизнеспособности клетки, ее каталитической активности, способности реализовать непрерывные, многостадийные, полиферментные процессы. Среди материалов для иммобилизации живых клеток часто используют альгинат, который является основным структурным полисахаридом бурых водорослей и состоит из регулярных последовательностей, связанных между собой в положениях 1 и 4 остатков α -D-маннопиранозилуроната и α -L-гулопиранозилуроната. В присутствии двухвалентных катионов, особенно кальция, полисахариды образуют гель. Поскольку гель формируется в мягких условиях, в нем можно иммобилизовать живые клетки [47].

В последние годы в биологической очистке сточных вод предлагается использовать микроорганизмы, иммобилизованные в магнитоуправляемые носители [76]. Они обладают многими преимуществами: простотой управления биообъектами с помощью магнитного поля, быстротой отделения

иммобилизованных клеток или их дериватов. В случае использования для иммобилизации микроорганизмов магнитных носителей возникает задача исследования воздействия магнитных полей на данные биологические объекты. В настоящее время в литературе накоплен обширный материал о положительном влиянии электромагнитных полей на рост и накопление биомассы многих групп микроорганизмов. Установлено, что под влиянием электромагнитного поля изменяются многие свойства, например, вирулентность, антибиотикорезистентность, химическая устойчивость, термотолерантность, а длительное воздействие может привести к изменению морфологических, тинкториальных, культуральных или биохимических свойств [94].

В работе было проведено исследование возможности интенсификации роста выделенного штамма, иммобилизованного в магнитные альгинатные носители. Поскольку альгинатный гель образуется в мягких условиях, в нем целесообразно иммобилизовать живые клетки. Применение магнитного материала (оксида железа) в качестве компонента носителя бактериальных клеток способствует приданию иммобилизованной системе магнитоуправляемости, что позволяет значительно облегчить работу с ней.

Методику иммобилизации клеток культуры *B.subtilis* ВГТУ5 осуществляли в асептических условиях. 0,08 г альгината натрия и 0,1 г оксида железа растворяли в 1,9 мл фосфатного буферного раствора рН 7,2. Для лучшего смешения реагенты перемешивали на магнитной мешалке в течение 15 мин. Полученную смесь стерилизовали кипячением на водяной бане в течение 20 мин. После охлаждения в пробу добавляли 0,1 мл взвеси клеток с концентрацией 10^9 м.к./мл. После перемешивания получали альгинатные гранулы путем продавливания взвеси через тонкую иглу шприца объемом 1 мл в 0,2 М раствор хлорида кальция. Осевшие на дно пробирки магнитные гранулы оставляли в растворе на 30 мин и тщательно отмывали стерильным физиологическим раствором. Декантацию проводили, удерживая сорбенты на дне пробирок с помощью постоянного магнита.

С целью изучения возможности культивирования бактериальных клеток в иммобилизованном состоянии к альгинатным магнитным сорбентам наливали 5 мл стерильной жидкой питательной среды и инкубировали в течение 24 ч при комнатной температуре. По истечении указанного времени в пробирках наблюдали рост биомассы, выражающийся в помутнении питательной среды. В качестве контроля использовали магнитные альгинатные гранулы, приготовленные без добавления клеток микроорганизмов. Контрольные пробы при визуальном анализе были прозрачны. Для более точной характеристики прироста биомассы определяли оптическую плотность опытных и контрольных проб.

Для перевода относительных единиц оптической плотности в единицы концентрации биомассы строили калибровочный график по известной концентрации бактериальных клеток *B.subtilis* ВГТУ5.

Концентрация микроорганизмов в опытной пробе составляла $5,1 \pm 0,2 \cdot 10^8$ м.к./мл, а контрольной – $4,6 \pm 0,03 \cdot 10^8$ м.к./мл, что свидетельствует о возможности роста иммобилизованного штамма в жидкой питательной среде.

В результате проведения в асептических условиях иммобилизации бактериального штамма были получены магнитные альгинатные сорбенты, представленные на рисунке 12.



Рисунок 12 - Альгинатные магнитные сорбенты

Полученные магнитные альгинатные сорбенты представляли гранулы темно-коричневого цвета размером 2-4 мм.

Для определения сохранения жизнеспособности иммобилизованных микроорганизмов было проведено несколько циклов их повторного выращивания

в жидкой питательной среде. Альгинатные магнитные гранулы после каждого цикла культивирования тщательно промывали физиологическим раствором, заливали 5 мл свежей питательной среды и повторно инкубировали в течение 24 часов. Полученные результаты приведены в таблице 4.

Таблица 4 - Результаты нескольких циклов выращивания иммобилизованных клеток *B.subtilis* ВГТУ5 в жидкой питательной среде

Циклы выращивания	Концентрация биомассы, м.к./мл $\times 10^8$
1	4,5 \pm 1,0
2	5,2 \pm 0,7
3	4,9 \pm 0,9
4	5,3 \pm 0,8
5	5,9 \pm 0,5

Результаты экспериментов, представленные в таблице 4, свидетельствуют, что иммобилизованные в магнитные альгинатные носители бактериальные клетки штамма *B.subtilis* ВГТУ5 сохраняли жизнеспособность в течение 5 циклов культивирования в жидкой питательной среде при стационарном культивировании.

Для реализации преимуществ использования иммобилизованных в магнитные носители клеток необходимо проведение экспериментов по изучению влияния электромагнитного поля (ЭМП) на штаммы исследуемых микроорганизмов. Известно, что бактериальные клетки обладают высокой чувствительностью к магнитным полям различной природы, однако конечный биологический эффект воздействия поля определяется особенностями биообъекта. В связи с этим в работе было изучено влияние электромагнитного поля на интактный и иммобилизованный в магнитоуправляемые носители бактериальный штамм, осуществляющий очистку сточных вод кожевенного производства. Для экспериментов был разработан специальный прибор,

создающий электромагнитное поле различной напряженности, представленный на рисунке 13.



Рисунок 13 - Установка для изучения влияния электромагнитного поля различной напряженности на микроорганизмы

Установка, обеспечивающая регулируемую напряженность, состояла из прибора, содержащего соленоид, милливольтметр ВЗ-38, стабилизатора напряжения "Лань", мультиметр Victor VC 97, мост Р33.

Методика эксперимента по изучению влияния электромагнитного поля на интактные бактериальные клетки заключалась в следующем: готовили бактериальную взвесь *B. subtilis* ВГТУ5 в концентрации 10^3 м.к./мл и засеивали ее в объеме 0,1 мл в пробирку с 3 мл питательного бульона. Пробирку помещали в гнездо прибора, создающего электромагнитное поле определенной напряженности, и инкубировали в течение 20 ч при 34°C. Контрольной пробой служила культура, не подвергнутая воздействию ЭМП. Урожайность биомассы определяли фотокolorиметрическим методом. Результаты эксперимента приведены в таблице 5.

Таблица 5 - Воздействие электромагнитного поля на клетки штамма *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
12,24	1,78 \pm 0,09
13,67	1,61 \pm 0,08
19,71	1,30 \pm 0,12
Контроль	1,38 \pm 0,12

Данные, приведенные в таблице 5, свидетельствуют, что наибольшая продуктивность клеток бактериального штамма *B.subtilis* ВГТУ5 была получена при их культивировании в условиях напряженности ЭМП 12,24 А/м, поскольку концентрация биомассы в этом случае превышала контрольный показатель на 29%. Эти параметры ЭМП в дальнейшем применяли для культивирования бактериальных клеток, иммобилизованных в магнитные носители.

Для исследования уровня накопления биомассы при культивировании иммобилизованных микроорганизмов в пробирку с альгинатными магнитными гранулами, полученными по описанной выше методике, наливали стерильную жидкую питательную среду и помещали ее в гнездо прибора, создающее ЭМП напряженностью 12,24 А/м.

В качестве контроля использовали пробу, выращенную без применения данного энергетического поля. Пробирки инкубировали в течение 20 ч при температуре 34°C. Урожайность культуры оценивали фотокolorиметрическим методом после удаления из культуральной среды альгинатного носителя с бактериальными клетками. Результаты экспериментов приведены в таблице 6.

Таблица 6 - Урожайность биомассы при культивировании иммобилизованной бактериальной культуры *B.subtilis* ВГТУ5 в ЭМП

Наименование варианта	Концентрация биомассы, $\times 10^9$ м.к./мл	Прирост биомассы, %
Опыт	1,72 \pm 0,15	29,3
Контроль	1,33 \pm 0,13	

Таким образом, выращивание бактериальных клеток в иммобилизованном состоянии не снизило эффект от воздействия электромагнитного поля и прирост биомассы штамма *B.subtilis* ВГТУ5, наблюдаемый при культивировании микроорганизмов в питательной среде в присутствии ЭМП напряженностью 12,24 А/м, был выше контроля на 29%. Полученный экспериментальный материал перспективен для использования при совершенствовании промышленной технологии 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 ростовых свойств штамма, использующего органические загрязнения сточной воды, особое значение имеет добавление в среду минеральных компонентов (макро- и микроэлементов). Так, например, калий играет существенную роль в углеводном обмене и синтезе клеточного вещества. Фосфор входит в состав нуклеиновых кислот, фосфолипидов, коферментов. Сера в виде сульфатов используется в качестве источников питания, а также входит в состав некоторых аминокислот, кофакторов ферментов и других биологически активных веществ. Магний и железо являются кофакторами многих ферментов [20]. В связи с этим в работе было изучено влияние некоторых макро- и микроэлементов на жизнедеятельность штамма *B.subtilis* ВГТУ5.

3.7.1. Экспериментальные исследования влияния природных минеральных компонентов на рост штамма *B. subtilis* ВГТУ5

Необходимость элементов для роста бактерий определяли на синтетических средах, исключая из их состава один из источников питания. В качестве контрольной (полноценной) среды использовали жидкую питательную среду следующего состава (г/л):

глюкоза – 80;

нитрат аммония – 2,4;

фосфат калия однозамещенный – 1,6;

сульфат магния (II) – 0,4;

сульфат железа (II) – 0,08.

В опытных образцах питательных сред отсутствовали источники наиболее важных минеральных элементов - фосфора (P), калия (K) или магния (Mg).

Питательные среды после стерилизации разливали по пробиркам в объеме 3 мл и засеивали культурой по 0,1 мл с концентрацией биомассы 10^9 м.к./мл. Посевы выдерживали при температуре 37°C в течение 24 ч. Урожайность бактерий оценивали фотокolorиметрическим методом. Результаты экспериментов приведены на рисунке 14.

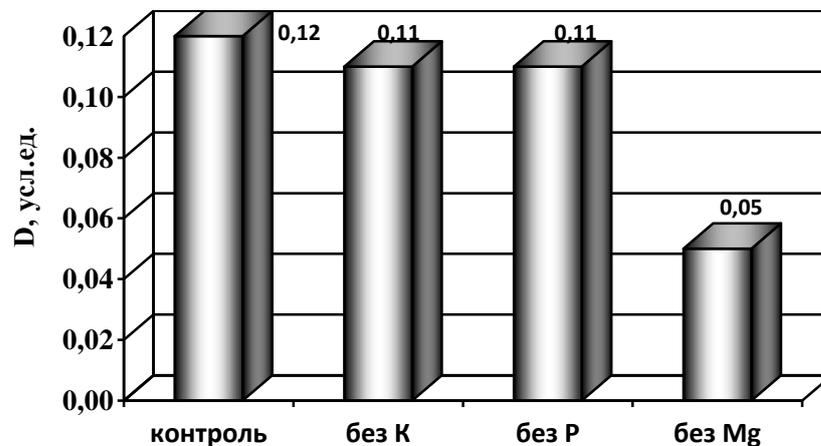


Рисунок 14 - Результаты изучения влияния источников минерального питания на рост бактериальных клеток

Данные, представленные на рисунке 14, 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. В качестве минеральных добавок использовали раствор бишофита Приволжской моноклинали, солевую рапу озера Эльтон и соль Мертвого моря.

Бишофит - природный магниевый полиминерал, состав которого приведен в таблице 7 [7, 74].

Таблица 7 - Состав бишофита Приволжской моноклинали

Наименование ингредиента	Концентрация, %
Хлорид магния	90,0 - 96,0
Бромид магния	0,4 - 0,9
Сульфат кальция	0,1 - 0,7
Хлорид натрия	0,1 - 0,4
Железо	0,003 - 0,03
Висмут	0,0005 - 0,001
Молибден	0,0005 - 0,001
Бор	0,002 - 0,08
Алюминий	0,001 - 0,02
Титан	0,0005 - 0,001
Медь	0,0001 - 0,0006
Кремний	0,02 - 0,2
Барий	0,0001 - 0,0006
Стронций	0,001 - 0,02
Кобальт	0,003 - 0,005
Рубидий	0,0001 - 0,002
Цезий	0,0001 - 0,001
Литий	0,0001 - 0,0003

Основное вещество бишофита - хлорид магния - выпадает из насыщенного раствора в виде кристаллогидрата $MgCl_2 \cdot 6H_2O$. Поскольку экспериментальным путем

было установлено, что магний необходим для роста выделенного нами бактериального штамма, бишофит может быть перспективен для интенсификации роста культуры.

Рапа - это насыщенный соляной раствор, вода лиманов и соленых озер. Рапой считается вода с соленостью более 50 промилле, что примерно в 1,5 раза выше, чем соленость воды мирового океана. Минерализация и солевой состав рапы озера Эльтон претерпевают существенные сезонные и многолетние циклические изменения. В обычные по водности годы минерализация меняется от 250-270 г/дм до 400-450 г/дм³ (осенью). В многоводные годы минерализация рапы весной может снижаться до 180-200 г/дм³, а в засушливые годы осенью достигать необычайно высокой величины - 525 г/дм³, при этом в менее концентрированных рассолах обычно преобладает галит, а в высококонцентрированных рассолах - бишофит. Реакция среды в исследуемой рапе нейтральная (рН 7,1). В таблице 8 приведен качественный и количественный состав солевой рапы озера Эльтон [20].

Таблица 8 - Состав солевой рапы озера Эльтон

Состав рапы			
Ионы		Соли	
Наименование	Количество, г/л	Наименование	Количество, г/л
НСО ₃ ⁻	0,03	Са (НСО ₃)	0,04
Сl ⁻	11,25	СаSO ₄	0,13
SO ₄ ²⁻	1,30	MgSO₄	1,51
Na ⁻	5,90	MgCl₂	2,89
Ca ²⁻	0,05	NaCl	15,00
Mg ²⁻	1,04		

Приведенные в таблице 8 результаты позволяют заключить, что среди солей рапы озера Эльтон хлориды магния и натрия занимают значительное место (4,4 г/л), в связи с чем этот природный компонент может быть использован для изучения возможности интенсификации роста штамма *B.subtilis* ВГТУ5.

Соли Мертвого моря имеют состав, приведенный в таблице 9 [20].

Таблица 9 - Компонентный состав соли Мертвого моря

Наименование	Количество, г/л
Хлориды	159-190
Соли аммония	0,034
Натрий	22-32
Магний	30-40
Калий	6-8
Кальций	10-15
Железо	0,5

Согласно приведенным в таблице 9 данным, хлориды магния является преобладающим ингредиентом соли Мертвого моря. Многие микроэлементы, которые входят в состав морской воды, имеют короткое время пребывания, поэтому их концентрация может значительно меняться. В воде Мертвого моря содержатся соли калия, натрия, магния, кальция, хлора и брома в таких концентрациях, которые не допускают жизни, о чем свидетельствует название этого водного объекта. Кроме того, воды Мертвого моря имеют высокое значение рН, равное 9 [20].

Для исследования влияния природных минеральных соединений на штамм *V.subtilis* ВГТУ5 были приготовлены полусинтетические питательные среды, в которые добавляли в качестве источника углерода - глюкозу (4%), источника азота - нитрат аммония (1%). В приготовленную среду вводили один из минеральных компонентов: бишофит, солевую рапу озера Эльтон и соли Мертвого моря.

С целью подбора оптимальной концентрации минеральных компонентов в пробирках с 3 мл питательной среды, содержащей источники углерода и азота, двукратно разводили растворы этих добавок, засеивали в них микроорганизмы и выращивали в течение 22 ч при 37°C. Оценку уровня накопления биомассы проводили, регистрируя оптическую плотность суспензий на фотоэлектроколориметре.

В качестве контроля использовали штамм, засеянный в питательную среду без природных минеральных компонентов. С каждой из минеральных добавок было проведено 3 параллельных опыта по 5 измерений. Результаты эксперимента представлены на рисунках 15, 16 и 17.

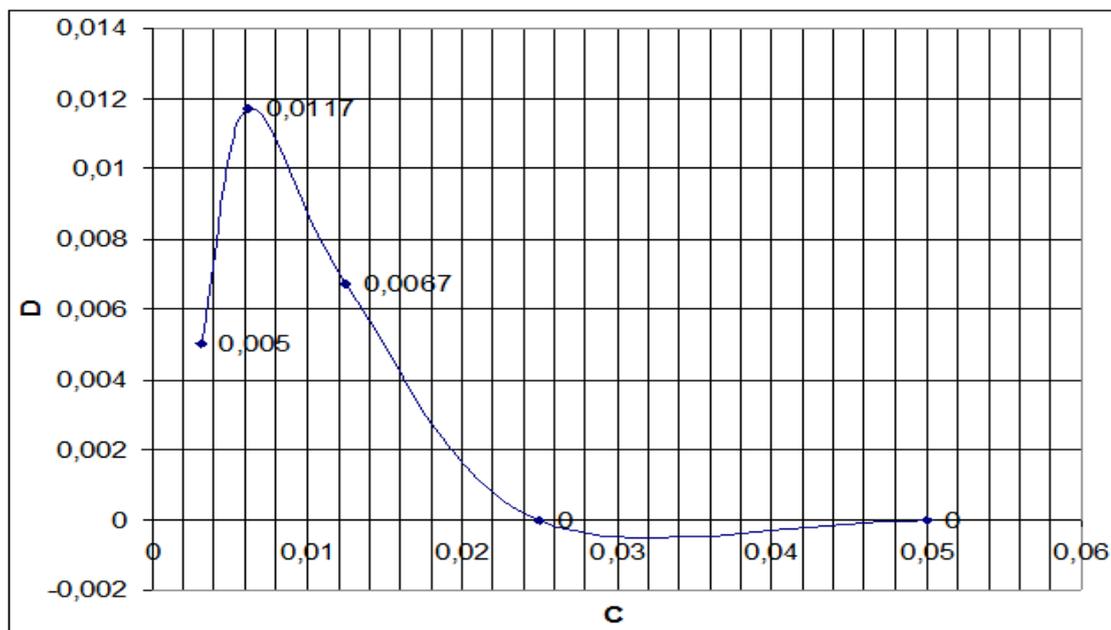


Рисунок 15 - Зависимость оптической плотности суспензии бактерий (D, усл. ед.) от концентрации бишофита (C,%)

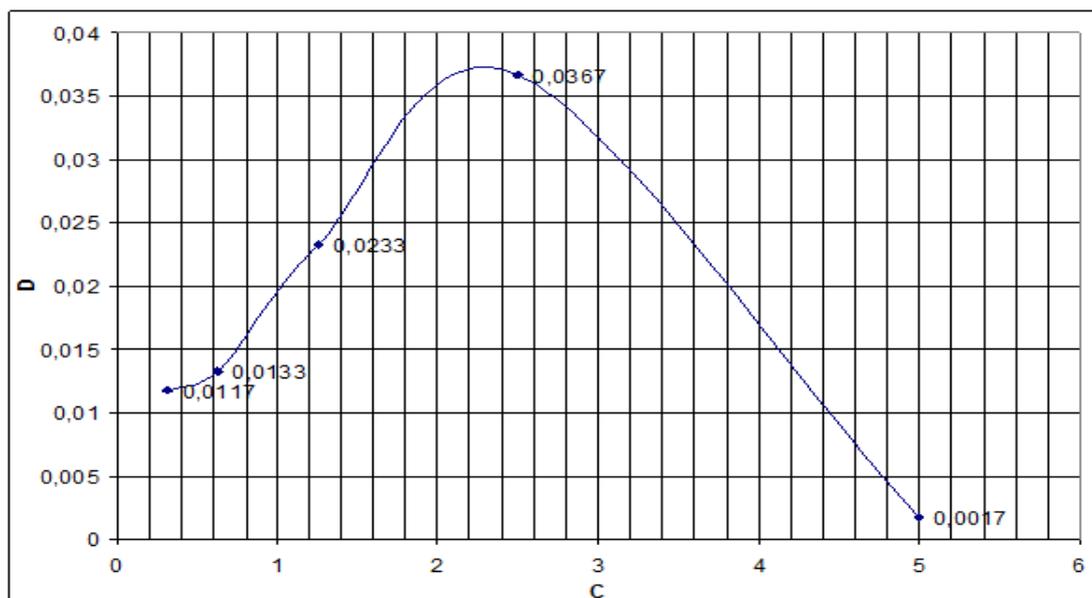


Рисунок 16 - Зависимость оптической плотности суспензии бактерий (D, усл. ед.) от концентрации солевой рапы озера Эльтон (C,%)

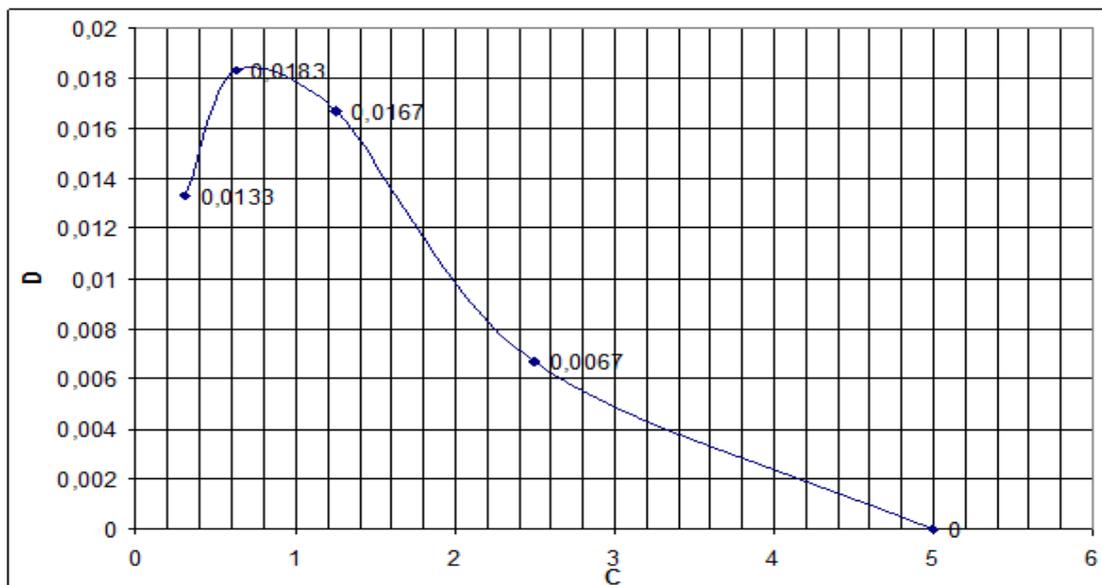


Рисунок 17 - Зависимость оптической плотности суспензии бактерий (D, усл. ед.) от концентрации соли Мертвого моря (C,%)

Данные, представленные на рисунках 15, 16 и 17, свидетельствуют, что добавление минеральных компонентов изменяет оптическую плотность суспензии бактерий, а, значит и уровень накопления их биомассы в жидкой питательной среде. Максимальное значение оптической плотности бактериальной суспензии наблюдали в питательной среде с 2,5% солевой рапы озера Эльтон. Это значение превышало контроль на 213%.

При добавлении солей Мертвого моря наибольшее накопление биомассы по сравнению с контрольным образцом было в присутствии в среде 0,62% данного минерального компонента. Превышение оптической плотности среды по сравнению с контролем составило 56%.

Наибольшее значение оптической плотности суспензии при культивировании бактерий в питательной среде с бишофитом наблюдали при очень низких концентрациях этого минерала (0,006%). Однако и в этом случае оно было ниже контрольного образца, что свидетельствует о подавляющем действии на данные микроорганизмы компонентов, входящих в состав бишофита.

Сравнение максимальных уровней оптической плотности бактериальных суспензий при выращивании клеток в присутствии природных минеральных добавок приведено на рисунке 18.

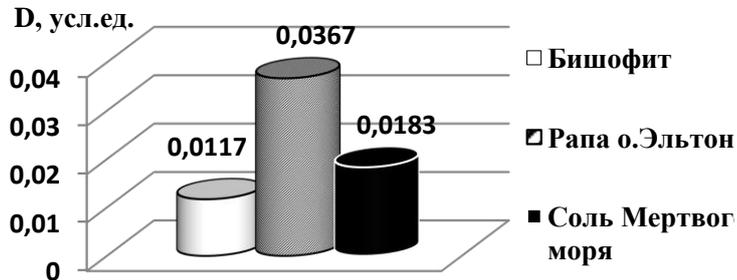


Рисунок 18. – Наибольшие значения оптической плотности биомассы бактерий *V.subtilis* ВГТУ5 на средах с минеральными добавками.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов было установлено, что добавление в жидкую питательную среду 2,5% солевой рапы озера Эльтон увеличивает оптическую плотность, а, значит, и накопление биомассы штамма *V. subtilis* ВГТУ5. Полученные в ходе проведенных исследований результаты перспективны для совершенствования технологии биологической очистки сточной воды кожевенных производств.

3.7.2. Математическое моделирование результатов изучения влияния природных минеральных компонентов на биопрепарат

Для проверки достоверности и воспроизводимости полученных экспериментальных данных было проведено их математическое моделирование на ЭВМ с использованием метода регрессионного анализа [8, 21].

Найденная экспериментальная зависимость оптической плотности суспензии бактерий (D) от концентрации бишофита (C), приведенная на рисунке 15, описывается уравнением регрессии:

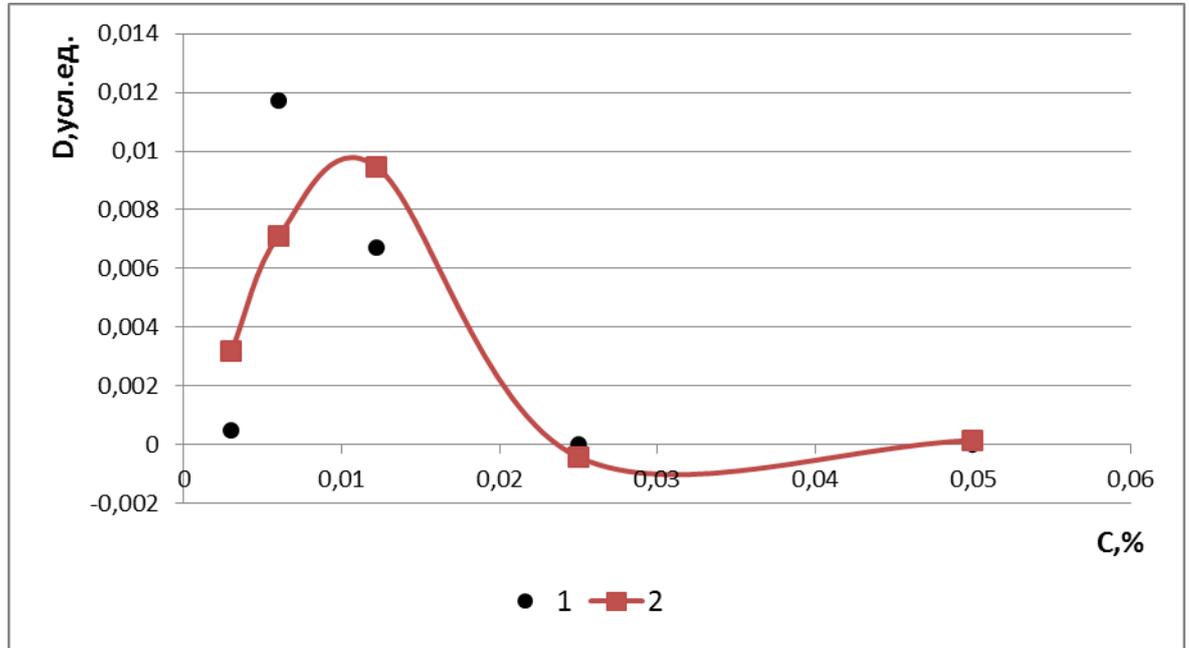
$$D = D_0 + a \cdot C + b \cdot C^2 + d \cdot C^3 \quad (1).$$

Для уравнения (1) по методу наименьших квадратов были рассчитаны коэффициенты $D_0 = -0,003$, $a = 2,463$, $b = -140,8$, $d = 1856$.

Тогда уравнение (1) принимает расчетный вид:

$$D = -0,003 + 2,463 \cdot C - 140,8 \cdot C^2 + 1856 \cdot C^3 \quad (2).$$

На рисунке 19 приведены графики экспериментальных данных и теоретической зависимости оптической плотности суспензии от концентрации бишофита.



1-экспериментальные данные; 2- теоретический график

Рисунок 19 – Зависимость оптической плотности суспензии клеток от концентрации бишофита.

По проведенному регрессионному анализу результатов изучения зависимости оптической плотности суспензии *V. subtilis* ВГТУ5 от концентрации бишофита (3 параллельных опыта по 5 измерений) можно сделать следующие выводы:

- коэффициент корреляции $r = 0,874$, это свидетельствует, что зависимость $y=y(x)$ прямая и сильная;
- нелинеаризованная относительная ошибка по методу наименьших квадратов (МНК): максимальная - до 10%, средняя - до 5%;
- критерий Кохрена, рассчитанный в линеаризованном виде $G_{\Gamma}^{\text{расч}}=0,57 \leq G_{\Gamma}^{\text{таб}}=0,6838$, что значит дисперсия опытов однородна и воспроизводимость хорошая;

- критерий Фишера, рассчитанный по МНК $Fp^{\text{расч}} = 2,68 < Fp^{\text{таб}} = 3,71$, что свидетельствует, что модель адекватна.

Регрессионный анализ зависимости оптической плотности клеточной суспензии *V. subtilis* ВГТУ5 от концентрации солевой рапы озера Эльтон проводили на основании экспериментальных данных, приведенных на рисунке 16. Применяя математическое моделирование данной зависимости, было получено уравнение регрессии:

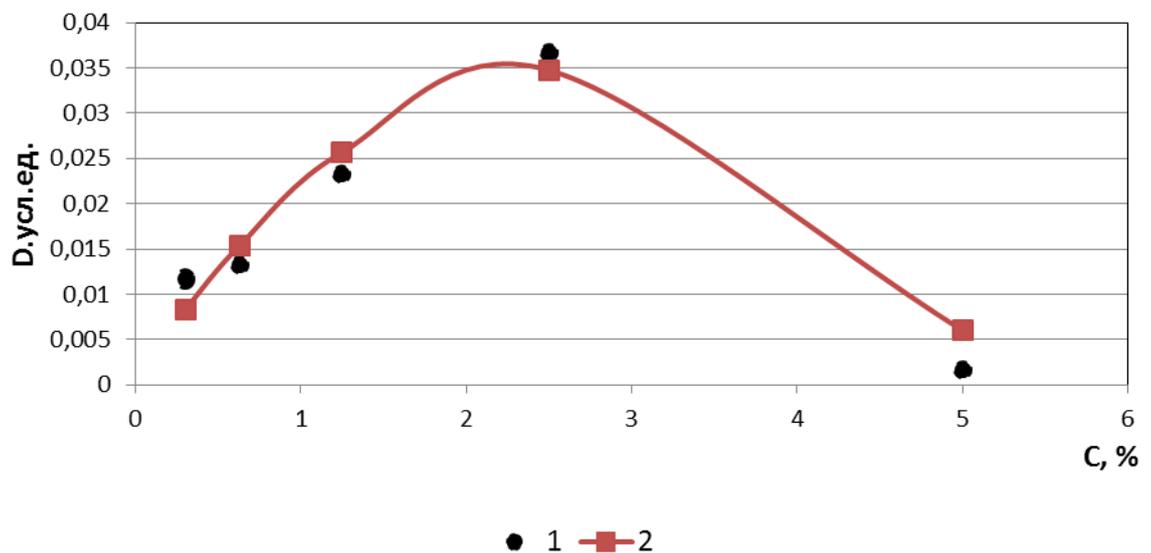
$$D = D_0 + a \cdot C + b \cdot C^2. \quad (3).$$

Для уравнения (3) по методу наименьших квадратов были рассчитаны коэффициенты $D_0 = 0,001$, $a = 0,026$, $b = -0,005$.

Тогда уравнение (3) принимает расчетный вид:

$$D = 0,001 + 0,026 \cdot C - 0,005 \cdot C^2 \quad (4).$$

Графики экспериментальных данных и теоретической зависимости оптической плотности суспензии клеток от концентрации солевой рапы озера Эльтон приведены на рисунке 20.



1-экспериментальные данные; 2 - теоретический график

Рисунок 20 – Зависимость оптической плотности суспензии клеток от концентрации солевой рапы озера Эльтон.

По проведенному регрессионному анализу результатов исследования зависимости оптической плотности суспензии клеток штамма *B. subtilis* ВГТУ5 от концентрации солевой рапы озера Эльтон можно сделать следующие выводы:

- коэффициент корреляции $r = 0,960$, это значит, что зависимость $y=y(x)$ прямая и сильная;
- нелинеаризованная относительная ошибка по МНК: максимальная - до 10%, средняя - до 5%;
- критерий Кохрена, рассчитанный в линеаризованном виде $G_{\text{р}}^{\text{расч}}=0,53 \leq G_{\text{р}}^{\text{таб}}=0,6838$, что значит, что дисперсия опытов однородна и воспроизводимость хорошая;
- критерий Фишера, рассчитанный по методу наименьших квадратов (МНК) $F_{\text{р}}^{\text{расч}}= 2,1 < F_{\text{р}}^{\text{таб}}=3,71$, что свидетельствует, что математическая модель адекватна.

Регрессионный анализ зависимости оптической плотности клеток штамма *B. subtilis* ВГТУ5 от концентрации соли Мертвого моря проводили на основании экспериментальных данных, приведенных на рисунке 17. При математическом моделировании данной зависимости, было найдено, что она описывается уравнением:

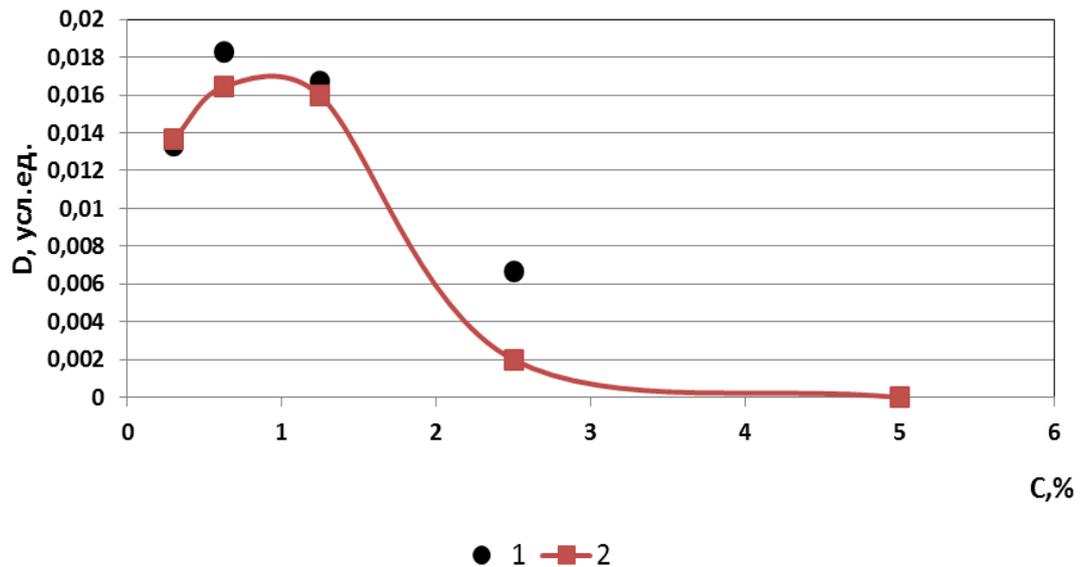
$$D=D_0+a\cdot C+b\cdot C^2+d\cdot C^3 \quad (5).$$

Для уравнения (5) по методу наименьших квадратов были рассчитаны коэффициенты $D_0=0,009$, $a=0,019$, $b=-0,012$, $d=0,001$.

Тогда уравнение (5) принимает расчетный вид:

$$D=0,009+0,019\cdot C-0,012\cdot C^2+0,001\cdot C^3 \quad (6).$$

На рисунке 21 приведены графики экспериментально полученных данных и теоретической зависимости оптической плотности суспензии клеток от концентрации солей Мертвого моря.



1-экспериментальные данные; 2 - теоретический график

Рисунок 21 - Зависимость оптической плотности суспензии клеток от концентрации солей Мертвого моря

По проведенному регрессионному анализу экспериментальной зависимости оптической плотности клеточной суспензии от концентрации солей Мертвого моря (3 параллельных опыта по 5 измерений) можно сделать следующие выводы:

- коэффициент корреляции $r = 0,987$, это значит, что зависимость $y=y(x)$ прямая и сильная;
- нелинеаризованная относительная ошибка по МНК: максимальная - до 10%, средняя - до 5%;
- критерий Кохрена, рассчитанный в линеаризованном виде $G_{r}^{расч} = 0,65 \leq G_{r}^{таб} = 0,683$, это значит, что дисперсия опытов однородна и воспроизводимость хорошая;
- критерий Фишера, рассчитанный по МНК $F_{p}^{расч} = 2,68 < F_{p}^{таб} = 3,71$, что значит, что модель адекватна.

Таким образом, проведенный регрессионный анализ результатов изучения влияния природных минеральных добавок на оптическую плотность бактериальной суспензии биопрепарата позволяет сделать вывод, что полученные результаты являются достоверными, воспроизводимыми, могут быть

использованы для ускорения роста бактериального штамма *B. subtilis* ВГТУ5 и перспективны для внедрения в технологический процесс биологической очистки сточных вод.

3.8. Лабораторное моделирование биологической очистки сточной воды кожевенного производства

С целью изучения возможности применения полученного биопрепарата для очистки сточной воды кожевенного производства осуществляли лабораторное моделирование процесса биологической очистки при стационарном и глубинном культивировании.

Для выращивания микроорганизмов-деструкторов брали пробу сточной воды из коллектора Волгоградского кожевенного завода ООО «Шеврет», удаляли из нее взвешенные частицы путем центрифугирования при 3500 об./мин в течение 20 мин.

3.8.1 Выращивание биопрепарата в стационарном режиме

При стационарном культивировании биопрепарата пробы сточной воды в объеме 3 мл помещали в пробирки и засеивали суточной культурой *B. subtilis* ВГТУ5. Посевы инкубировали при 37 °С в течение 24 часов. Степень очистки определяли, регистрируя уровень светопропускания проб на фотоколориметре. Контрольным образцом служили пробы сточной воды, не засеянные бактериями. Известно, что сточные воды, обладающие кислой или щелочной реакцией среды, могут нанести значительный вред природному водоему. В связи с этим, в экспериментах определяли и изменение рН культуральной жидкости до и после проведения культивирования бактерий в сточной воде при помощи лабораторного рН-метра. Полученные экспериментальные результаты приведены в таблице 10.

Таблица 10 - Результаты лабораторного моделирования очистки сточной воды в стационарных условиях с помощью биопрепарата *B. subtilis* ВГТУ5

Наименование пробы сточной воды	Оптическая плотность, усл. ед	pH пробы
До культивирования бактерий	0,120±0,002	8,82±0,07
После культивирования бактерий	0,008±0,0005	7,20±0,05

Результаты экспериментов, представленные в таблице 10, позволяют прийти к выводу, что после выращивания культуры *B. subtilis* ВГТУ5 в стационарных условиях происходит осветление сточной воды в 15 раз. Наряду с очисткой наблюдается снижение pH среды от щелочного значения к нейтральному. Этот результат тоже свидетельствует о положительной стороне биоочистки. Биологическая очистка сточных вод в промышленных условиях чаще всего основана на глубинном культивировании бактерий в аэротенках, в связи с чем более значимые результаты могут быть получены при проведении лабораторного моделирования при глубинном аппаратном выращивании биопрепарата.

3.8.2 Глубинное культивирование биопрепарата

На первом этапе лабораторного моделирования биоочистки в условиях глубинного культивирования определяли динамику роста штамма *B. subtilis* ВГТУ5 в ферментере (объем культурального сосуда 500 мл) в жидкой питательной среде. Скорость вращения мешалки составляла 200 оборотов в 1 мин, поступление кислорода - 0,5 мл в 1 мин, посевная доза - 10^8 м.к. суточной культуры *B. subtilis* ВГТУ5 на 1мл питательной среды. Результаты проведенного эксперимента представлены на рисунке 22.

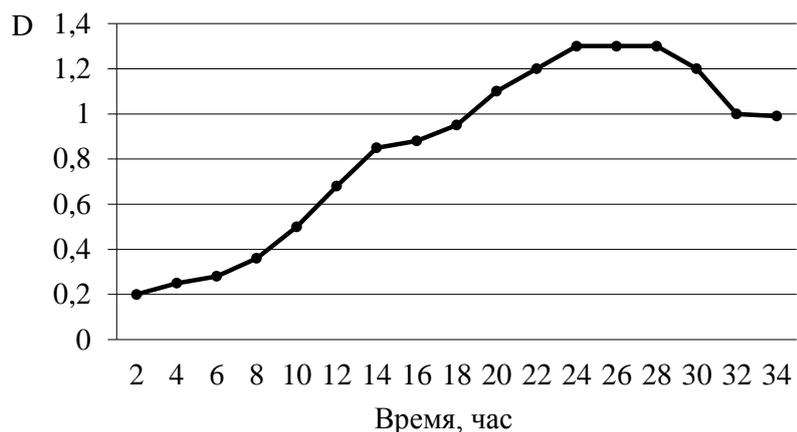


Рисунок 22 - Динамика роста биопрепарата *B. subtilis* ВГТУ5 при глубинном культивировании

Результаты эксперимента свидетельствуют, что после лаг-фазы, продолжающейся в течение 2 ч, бактерии начинали интенсивно размножаться, затем наступала фаза логарифмического роста, которая длилась до 21 ч. Максимальную концентрацию бактериальных клеток ($6 \cdot 10^9$ м.к./мл) наблюдали с 23 по 27 ч с момента начала культивирования. Затем наступила заключительная фаза - гибель клеток. Таким образом, полученный нами бактериальный биопрепарат интенсивно размножается в условиях глубинного культивирования, причем длительность его выращивания в жидкой питательной среде не должна превышать 26-27 ч.

Для изучения возможности роста изолированного из сточных вод кожевенных предприятий бактериального штамма-деструктора в глубинной культуре осуществляли культивирование бактерий в биореакторе в сточной воде кожевенного предприятия в присутствии 2,5% рапы озера Эльтон, так как полученные нами ранее результаты показали, что введение этой минеральной добавки способствует повышению интенсивности роста бактериального штамма *B. subtilis* ВГТУ5. Температура культивирования - 22°C, длительность - 36 часов. Каждые 2 часа культивирования отбирали пробу культуральной жидкости и определяли оптическую плотность культуральной среды. Концентрацию

бактериальной биомассы рассчитывали по калибровочному графику, составленному по известной концентрации бактерий. Полученные в экспериментах результаты приведены на рисунке 23.

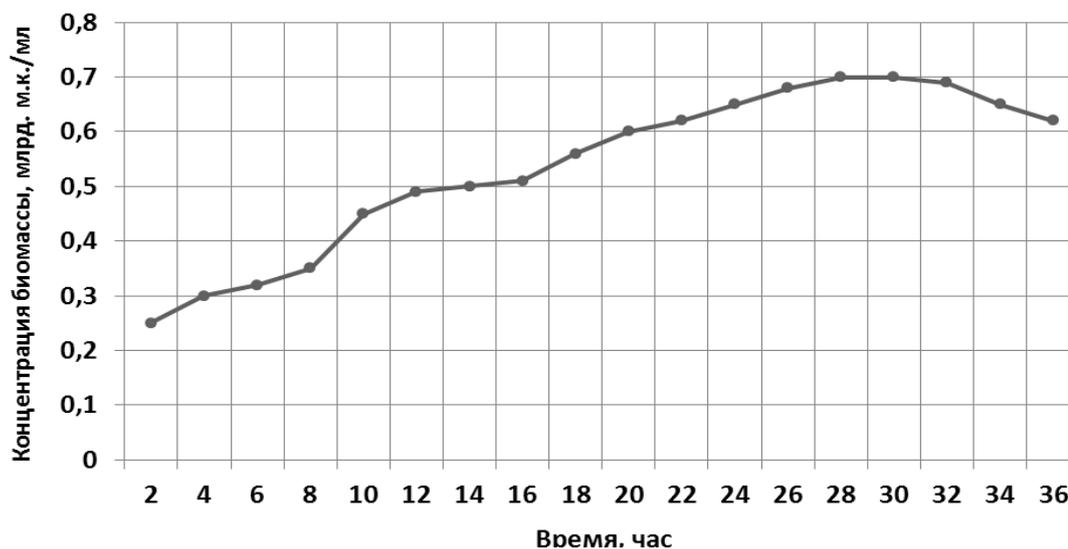


Рисунок 23 - Динамика роста бактериального биопрепарата в сточной воде при глубинном аппаратном культивировании

При анализе результатов, приведенных на рисунке 23, было установлено, что максимальную концентрацию микробной биомассы наблюдали к 27 - 31 часу от начала выращивания бактерий в сточной воде, где единственным источником питания микроорганизмов являлись присутствующие в ней загрязнения.

Уровень светопропускания неочищенной сточной воды в начале культивирования составлял $0,120 \pm 0,002$. После проведения глубинного культивирования биопрепарата эта величина снизилась до $0,005 \pm 0,000$. Таким образом, прозрачность сточной воды увеличилась в 24 раза. Осветление воды при глубинном выращивании бактериальной культуры *B. subtilis* ВГТУ5 на 37,5% выше соответствующей величины, полученной при очистке методом стационарного культивирования.

Наряду с контролем оптической плотности сточной воды оценивали и изменение ее pH при глубинном культивировании биопрепарата. Результаты

определения динамики рН при лабораторном моделировании очистки сточной воды в глубинной культуре приведены на рисунке 24.

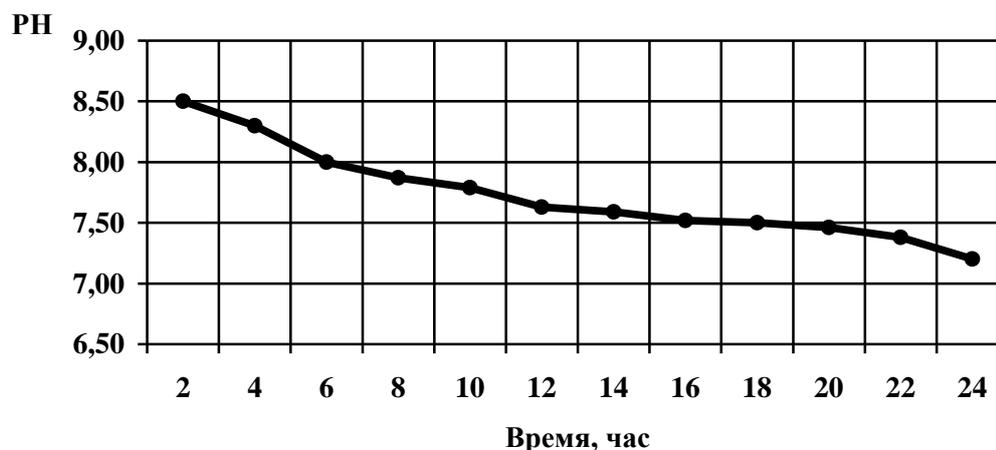


Рисунок 24 - Динамика рН при глубинном культивировании штамма *B. subtilis* ВГТУ5 в сточной воде.

Представленные на рисунке 24 результаты позволяют сделать вывод, что в процессе выращивания бактериального биопрепарата глубинным способом в биореакторе происходит снижение рН сточной воды от щелочного значения (8,5) до нейтрального (7,2), что является важным положительным критерием ее очистки.

3.8.3 Регрессионный анализ результатов лабораторного моделирования

Для оценки экспериментальных результатов, полученных при лабораторной очистке сточной воды с использованием биопрепарата *B. subtilis* ВГТУ5, проводили математическое моделирование.

Оценку результатов изучения динамики роста штамма *B. subtilis* ВГТУ5 в питательной среде осуществляли путем регрессионного анализа зависимости оптической плотности суспензии клеток (D) от времени выращивания (τ) (рисунок 22). Было установлено, что она описывается уравнением:

$$D = D_0 + a \cdot \tau + b \cdot \tau^2. \quad (7)$$

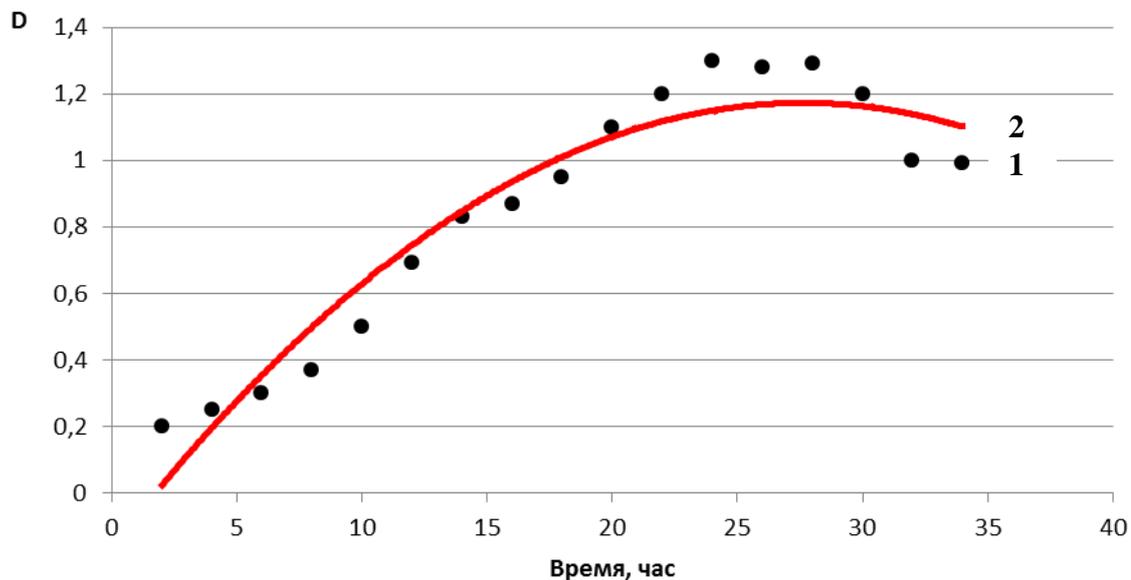
Для уравнения (7) по методу наименьших квадратов были рассчитаны коэффициенты корреляции:

$$D_0 = -0,163, a = 0,096, b = -0,001.$$

Тогда уравнение (7) принимает расчетный вид:

$$D = -0,163 + 0,096 \cdot \tau - 0,001 \cdot \tau^2 \quad (8)$$

Графики полученных экспериментальных значений зависимости оптической плотности суспензии клеток от времени культивирования и теоретический график исследуемой зависимости приведены на рисунке 25.



1 - экспериментальные значения;

2 - теоретический график

Рисунок 25 - Зависимость оптической плотности суспензии клеток от времени глубинного культивирования биопрепарата.

По проведенному регрессионному анализу результатов изучения динамики роста бактериальной суспензии при глубинном культивировании в жидкой питательной среде (3 параллельных опыта по 17 измерений) можно сделать следующие выводы:

- коэффициент корреляции $r = -0,936$, это значит, что зависимость $y = y(x)$ обратная и сильная;

- нелинеаризованная относительная ошибка по МНК: максимальная - до 1%, средняя - до 0,5%;

- критерий Кохрена, рассчитанный в линеаризованном виде $G_{\tau}^{\text{расч}} = 0,3019 \leq G_{\tau}^{\text{таб}} = 0,302$, что значит дисперсия опытов однородна и воспроизводимость хорошая;

- критерий Фишера, рассчитанный по МНК $Fp^{\text{расч}} = 0,25 < Fp^{\text{таб}} = 2,02$, что значит, что модель адекватна.

При лабораторном моделировании процесса биологической очистки сточной воды с использованием биопрепарата *B. subtilis* ВГТУ5 глубинным методом была получена интегральная кинетическая зависимость концентрации биомассы (C) от времени (τ) (рисунок 23).

Данная зависимость описывается уравнением:

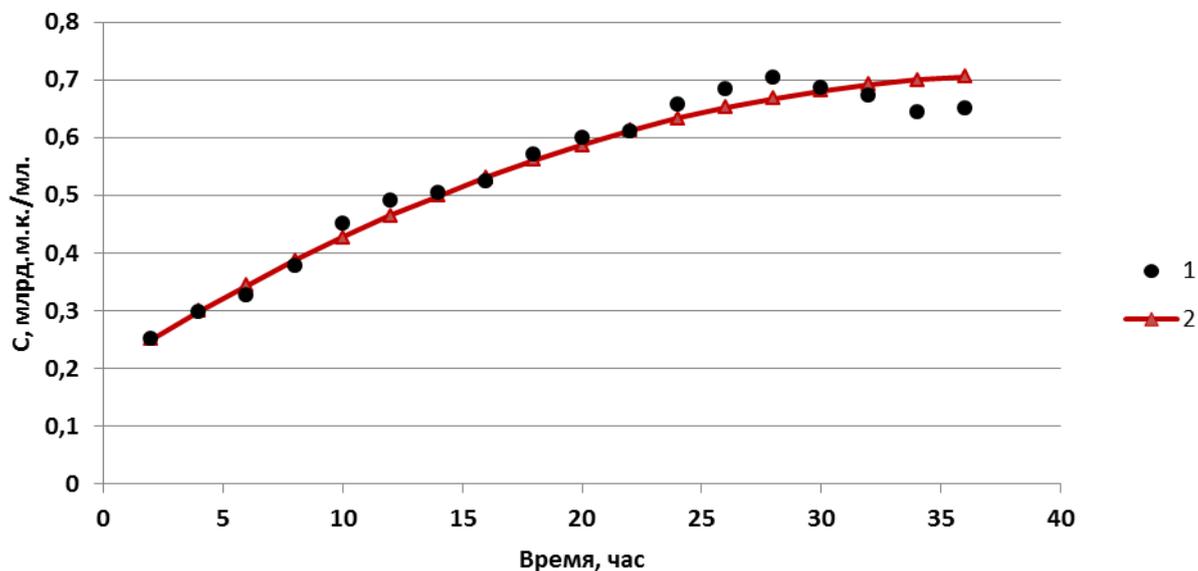
$$C = c_0 + a \cdot \tau + b \cdot \tau^2. \quad (9).$$

Для уравнения (9) по методу наименьших квадратов были рассчитаны коэффициенты корреляции: $c_0 = 0,2$, $a = 2,6 \cdot 10^{-2}$, $b = -3,34 \cdot 10^{-4}$.

Тогда уравнение (9) принимает расчетный вид:

$$C = 0,2 + 2,6 \cdot 10^{-2} \cdot \tau - 3,34 \cdot 10^{-4} \cdot \tau^2 \quad (10).$$

Графики экспериментальных значений и теоретической зависимости концентрации биомассы от времени глубинного аппаратного культивирования биопрепарата в сточной воде приведены на рисунке 26.



1-экспериментальные значения;

2- теоретический график.

Рисунок 26 - Зависимость концентрации клеток от времени глубинного культивирования биопрепарата.

По проведенному регрессионному анализу результатов лабораторного моделирования очистки сточной воды кожевенного производства с помощью биопрепарата (3 параллельных опыта по 18 измерений) можно сделать следующие выводы:

- коэффициент корреляции $r = -0,9798381$, это значит, что зависимость $y = y(x)$ обратная и сильная;
- нелинеаризованная относительная ошибка по МНК: максимальная - до 9%, средняя - до 5%;
- критерий Кохрена, рассчитанный в линеаризованном виде $Gr^{расч} = 0,325 \leq Gr^{таб} = 0,33$, это значит, что дисперсия опытов однородна и воспроизводимость хорошая;
- критерий Фишера, рассчитанный по МНК $Fp^{расч} = 0,268 < Fp^{таб} = 1,91$, что значит, что модель адекватна.

Регрессионную оценку результатов изменения рН сточной воды в зависимости от времени культивирования (τ) штамма *V. subtilis* ВГТУ5 проводили на основании данных, приведенных на рисунке 24.

Найденная экспериментальная зависимость описывается уравнением:

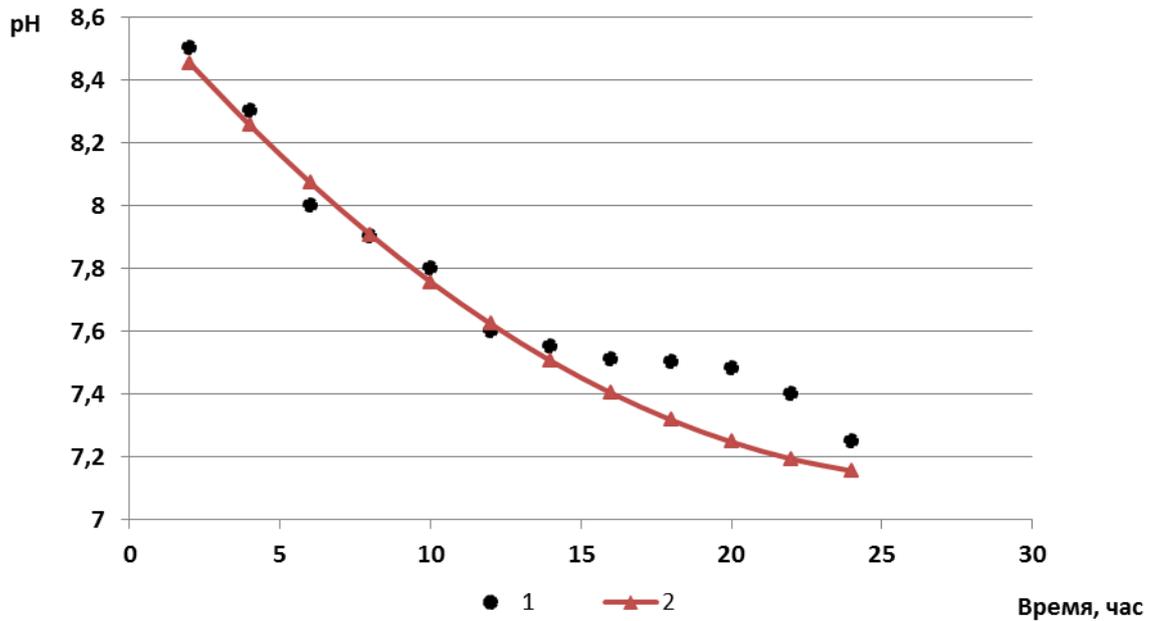
$$pH = pH_0 + a \cdot \tau + b \cdot \tau^2 \quad (11)$$

Для уравнения (11) по методу наименьших относительных квадратов были рассчитаны коэффициенты корреляции: $pH_0 = 8,667$, $a = -0,111$, $b = 0,002$

Тогда уравнение (11) принимает расчетный вид:

$$pH = 8,667 - 0,111 \cdot \tau + 0,002 \cdot \tau^2 \quad (12).$$

На рисунке 27 приведены графики экспериментальных значений и теоретической зависимости рН сточной воды от времени культивирования штамма *V. subtilis* ВГТУ5.



1-экспериментальные значения;

2- теоретический график.

Рисунок 27 – Зависимость pH сточной воды от времени культивирования биопрепарата.

По проведенному регрессионному анализу экспериментальной зависимости pH от времени культивирования штамма *B. subtilis* ВГТУ5 (3 параллельных опыта по 12 измерений) можно сделать следующие выводы:

- коэффициент корреляции $r = 0,971$, это значит, что зависимость $y=y(x)$ прямая и сильная;

- нелинеаризованная относительная ошибка по МНК: максимальная - до 9%, средняя - до 5%;

- критерий Кохрена, рассчитанный в линеаризованном виде $G_{r}^{расч} = 0,367 \leq G_{r}^{таб} = 0,3924$, что значит дисперсия опытов однородна и воспроизводимость хорошая;

- критерий Фишера, рассчитанный по МНОК $F_{r}^{расч} = 2,25 < F_{r}^{таб} = 2,27$, что значит, что модель адекватна.

Таким образом, проведенный регрессионный анализ результатов экспериментов по лабораторному моделированию биологической очистки сточной воды кожевенного предприятия с помощью биопрепарата *B. subtilis*

ВГТУ5 позволяет сделать вывод, что полученные экспериментальные данные являются достоверными и воспроизводимыми. Бактериальный препарат *B. subtilis* ВГТУ5 является перспективным 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 м³ сточной воды в год.

3.9.1 Расчеты затрат на проведение НИР

Для того, чтобы провести адекватную экономическую оценку результатов работы с учетом всех затрат (в том числе и на научную разработку) на первом этапе осуществили расчеты затрат на проведение НИР при проведении экспериментальных исследований.

Расчёт потребности в работниках НИР. Численность работников, необходимых для выполнения НИР в течение срока экспериментального исследования, рассчитывали отдельно для каждой категории работников по формуле:

$$r_i = (T_э \times K_d) / (F_{эф} \times K_b),$$

где r_i – количество исполнителей i -ой категории;

$T_э$ – трудоёмкость этапов НИР, ч;

K_d – коэффициент, учитывающий объём дополнительных работ, $K_d=1,15$;

$F_{эф}$ – фонд рабочего времени исполнителя за период экспериментальной работы, ч;

K_b – коэффициент выполнения норм, $K_b=1,15$.

Трудоёмкость общего цикла экспериментов $t_{ц}$, ч, определяли по формуле:

$$t_{ц} = n \times t_{н} + t_{пз} ,$$

где $t_{ц}$ – трудоёмкость общего цикла экспериментов, ч;

n – общее число опытов;

$t_{н}$ – время выполнения одного опыта, ч;

$t_{пз}$ – подготовительно-заключительное время проведения всей серии лабораторных исследований, ч.

Трудоёмкость одного опыта $t_{н}$, ч, определяли по формуле:

$$t_{н} = (t_{з} + t_{в}) \times (1 + (\alpha + \beta)/100) ,$$

где $t_{н}$ – трудоёмкость одного опыта, ч;

$t_{з}$ – время работы для получения и снятия измеряемых характеристик, ч;

$t_{в}$ – вспомогательное время (подготовка образца, установка режимов опыта), ч;

α – процент затрат времени на организационно-техническое обслуживание рабочего места, $\alpha = 10\%$;

β – процент времени на отдых, $\beta = 4\%$.

Трудоёмкость одного опыта $t_{н}$, ч:

$$t_{н} = (24 + 0,5) \times (1 + (10 + 4)/100) = 27,93$$

Был проведен цикл из 5 серий экспериментов, подготовительно-заключительное время проведения всей серии составило $t_{пз} = 7$ часов.

Таким образом трудоёмкость общего цикла экспериментов $t_{ц}$, ч, составила:

$$t_{ц} = 5 \times 27,93 + 7 = 146,65$$

Для расчёта численности работников – исполнителей НИР необходимо привести данные по трудоёмкости каждого этапа. Соотношение трудоёмкости этапов НИР приведены в таблице 11.

Для выполнения НИР необходимы научные работники и лаборанты. На основании соотношения трудоёмкости этапов НИР был составлен календарный

план-график выполнения научно-исследовательской работы с учётом совместной работы исполнителей. План-график представлен в таблице 12.

Таблица 11 - Соотношение трудоёмкости этапов НИР

Этапы НИР	Трудоёмкость, %	Трудоёмкость, ч
1. Разработка технического задания на НИР	7	36
2. Выбор направлений исследований	4,9	24
3. Теоретические и экспериментальные исследования	71,3	360
4. Обобщение и оценка результатов исследований	16,8	85
Итого:	100	505

Таблица 12 - План-график выполнения НИР

Этапы НИР	Категории исполнителей	Продолжительность, дни
1. Разработка технического задания на НИР	Научный работник	1,5
2. Выбор направлений исследований	Научный работник	1
3. Теоретические и экспериментальные исследования	Научный работник / лаборант	15
4. Обобщение и оценка результатов исследований	Научный работник	3,5

Учитывая соотношение трудоёмкости этапов НИР и календарного плана-графика, было составлено соотношение трудоёмкости этапов НИР для категорий исполнителей, представленное в таблице 13.

Таблица 13 - Соотношение трудоёмкости этапов НИР для категорий исполнителей

Этапы НИР	Суммарная трудоёмкость, ч	Трудоёмкость для категорий исполнителей, ч	
		Научные работники	Лаборант
1. Разработка технического задания на НИР	36	36	0
2. Выбор направлений исследований	24	18	0
3. Теоретические и экспериментальные исследования	360	95	313,5
4. Обобщение и оценка результатов исследований	85	42,5	0
Итого:	505	191,5	313,5

Фонд рабочего времени исполнителя за период соответствующих научных исследований составлял 40 рабочих дней по 8 ч/день; в итоге $F_{эф} = 320$ ч.

Численность научных работников r_1 , чел, необходимых для исследований:

$$r_1 = (191,5 \times 1,15) / (320 \times 1,15) = 0,6$$

Численность лаборантов r_2 чел, необходимых для исследований:

$$r_2 = (313,5 \times 1,15) / (320 \times 1,15) = 0,98$$

Полученные результаты округляли до целого числа. Для осуществления данного раздела научно-исследовательской работы необходим 1 научный работник и 1 лаборант.

Расчёт потребности в оборудовании по НИР. Для выполнения данного раздела научно-исследовательской работы специализированное оборудование и приборы не приобретали, использовали уже имеющиеся.

Таким образом, капитальные затраты будут равняться остаточной стоимости имеющегося оборудования.

Необходимые для расчёта данные приведены в таблице 14.

Таблица 14 - Остаточная стоимость оборудования

Оборудование	Количество, шт.	Начальная стоимость, руб.	Срок работы, год	Срок работы, год	Годовая норма амортизационных отчислений, %	Остаточная стоимость, руб.
Термостатическая камера	1	10200	10	8	10	2040
Автоклав	1	35700	10	9	10	3570
Электроплита	1	1500	10	5	10	750
Холодильник	1	7800	10	7	10	2340
Фотоколориметр	1	12000	8	2	6,25	9000
Центрифуга	1	6000	12	3	3,125	4500
Ферментер	1	6000	10	6	3,125	4500
Итого:	5	79200	-	-	-	26700

Остаточную стоимость оборудования $C_{ост}$, руб. рассчитывали по формуле:

$$C_{ост} = C_n - ((C_n \times T \times H_a)/100) ,$$

где $C_{ост}$ – остаточная стоимость оборудования, руб.;

C_n – начальная стоимость оборудования, руб.;

T – действительный срок службы, год;

H_a – годовая норма амортизационных отчислений, %.

Итого суммарные капитальные затраты составляют 26700 рублей.

Расчёт потребности в сырье и материалах для НИР. При проведении НИР в качестве основных материалов использовали хлорид кальция, альгинат натрия, оксид железа, в качестве вспомогательных – пептон, хлорид натрия, агар-агар.

Величину материальных затрат C_m , руб., рассчитывали по формуле:

$$C_m = \sum P_i \times C_i ,$$

где P_i – количество израсходованного i -го материала, кг;

C_i – цена одного 1 кг i -го материала, руб.;

$i = 1, 2, \dots, n$ – виды материалов.

В таблице 15 приведены данные для определения общей суммы затрат на сырье и материалы.

Таблица 15 - Затраты на сырье и материалы

Наименование материала	Количество израсходованного материала, кг	Стоимость материала, руб./кг	Величина затрат, руб.
Хлорид кальция	0,00222	140	0,31
Хлорид натрия	0,00628	32	0,2
Альгинат натрия	0,00016	900	0,15
Оксид железа	0,0002	9500	1,9
Агар-агар	0,008	1500	12
Пептон	0,009	1200	10,8
Итого:	-	13272	25,36

Расчёт затрат на потраченную электроэнергию $C_{эН}$, руб. осуществляли по формуле:

$$C_{эН} = \sum p_i \times C = \sum M_i \times K \times T_i \times C ,$$

где p_i – расход электроэнергии на i -ом виде оборудования, кВт·ч;

C – стоимость 1 кВт·ч, руб;

M_i – паспортная мощность оборудования, кВт;

K – коэффициент использования мощности, $K > 0,8$;

T_i – время работы i -го вида оборудования, ч.

Данные для расчёта и результаты представлены в таблице 16.

Таблица 16 - Затраты на электроэнергию

Наименование оборудования	Число единиц оборудования	Номинальная потребляемая мощность, кВт	Суммарная потребляемая мощность, кВт	Время работы электрооборудования, ч	Цена 1 кВт·ч, руб.	Суммарные затраты, руб.
Термостат	1	0,4	0,4	24	2,94	22,6
Электроплита	1	3,2	3,2	4,5	2,94	16,935
Холодильник	1	0,135	0,135	48	2,94	15,24
Фотоколориметр	1	0,175	0,175	2	2,94	0,35
Центрифуга	1	3,2	3,2	1	2,94	8,4675
Ферментер	1	0,4	0,4	24	2,94	8,4675
Итого:	-	-	-	-	-	72,06

При выполнении НИР была использована холодная водопроводная вода для мытья посуды. Затраты на использованную воду C_B , руб. определили по формуле:

$$C_B = V_B \times C_B,$$

где C_B – затраты на использованную холодную воду, руб.;

V_B – объём использованной воды, м³;

C_B – цена 1 м³ холодной воды, руб.

В ходе проведения работы было использовано приблизительно 300 л воды, т.е. $V_B = 0,3 \text{ м}^3$.

Цена 1 м³ холодной водопроводной воды составляет $C_B = 9,14$ рублей.

Таким образом затраты на использованную воду C_B , руб., равны:

$$C_B = 0,3 \times 9,14 = 2,74$$

В ходе эксперимента была использована различная лабораторная посуда.

Затраты на лабораторную посуду представлены в таблице 17.

Таблица 17 - Стоимость посуды

Наименование посуды	Количество, шт.	Цена единицы, руб.	Сумма, руб.
Воронка стеклянная	2	18	36
Пробирка стеклянная	25	3	75
Груша резиновая	1	14	14
Колба мерная на 100 мл	1	76	76
Палочка стеклянная	2	5	10
Петля микробиологическая	1	35	35
Чашка Петри	3	12	36
Стакан стеклянный на 50 мл	2	14	28
Цилиндр мерный на 100 мл	1	55	55
Пипетка мерная на 1 мл	2	29	58
Пипетка мерная на 2 мл	7	29	203
Пипетка мерная на 5 мл	2	29	58
Бактериальный стандарт мутности на 10 ед.	1	1350	1350
Флакон лабораторный на 250 мл	3	187	561
Флакон лабораторный на 500 мл	1	232	232
Итого:	-	-	2827

Расчёт затрат на оплату труда исполнителей НИР. Заработная плата исполнителей НИР складывается из заработной платы научного работника и лаборанта.

Суммарные затраты на зарплату $C_{зп}$, руб., равные сумме основной и дополнительной зарплат, рассчитывали по формуле:

$$C_{зп} = Z_{п}^o + Z_{п}^д,$$

где $Z_{п}^o$ - основная зарплата, руб.;

Z_{Π}^{Δ} - дополнительная зарплата, руб.

Основная заработная плата Z_{Π}° , руб., составляет:

$$Z_{\Pi}^{\circ} = Z_{\text{ПНР}} + Z_{\text{л}},$$

где $Z_{\text{ПНР}}$ – заработная плата научного работника, руб.;

$Z_{\text{л}}$ – заработная плата лаборанта, руб.

Дополнительная заработная плата Z_{Π}^{Δ} , руб., составляет:

$$Z_{\Pi}^{\Delta} = 0,2 \times Z_{\Pi}^{\circ}$$

Зарботная плата научного работника за 1 месяц составляет $Z_{\text{ПНР1}} = 4792$ рубль, а оплата труда лаборанта $Z_{\text{л1}} = 2396$ рублей.

Зарботная плата научного работника $Z_{\text{ПНР}}$ (руб.), за 2 месяца выполнения НИР составляет:

$$Z_{\text{ПНР}} = Z_{\text{ПНР1}} \times 2 = 4792 \times 2 = 9584$$

Оплата труда лаборанта $Z_{\text{л}}$ (руб.), за 2 месяца выполнения НИР составила:

$$Z_{\text{л}} = Z_{\text{л1}} \times 2 = 2396 \times 2 = 4792$$

Затраты на основную зарплату Z_{Π}° , руб. составили:

$$Z_{\Pi}^{\circ} = 9584 + 4792 = 14376$$

Затраты на дополнительную заработную плату Z_{Π}^{Δ} , руб. составили:

$$Z_{\Pi}^{\Delta} = 0,2 \times 14376 = 2875$$

Суммарные затраты на зарплату $C_{\text{ЗП}}$, руб. составили:

$$C_{\text{ЗП}} = 14376 + 2875 = 17251$$

Отчисления на социальные нужды $O_{\text{т}}$, руб., в среднем, составляют 30,4 % от заработной платы (при минимальном уровне травматизма):

$$O_{\text{т}} = 0,304 \times 17251 = 5244,30$$

Итого общие затраты фонда оплаты труда на НИР составили 22495 руб.

Расчёт накладных расходов по НИР. Накладные расходы включают амортизацию оборудования, эксплуатируемого при проведении НИР, и расходы, связанные с использованием помещения для осуществления экспериментов.

Сумма амортизационных отчислений определяли, исходя из стоимости используемого для выполнения НИР оборудования и приборов, годовых норм их амортизации и времени их использования (в месяцах):

$$C_{AM} = (\sum \Phi_i \times H_a \times T_i) / (100 \times 12),$$

где Φ_i – стоимость используемого оборудования, руб.;

H_a – годовая норма амортизационных отчислений, %;

T_i – время работы оборудования в течение срока выполнения НИР, мес.

В таблице 18 сведены данные для расчёта суммы амортизационных отчислений и результаты (в расчете на 2 месяца эксплуатации оборудования).

Таблица 18 - Амортизационные отчисления оборудования

Наименование оборудования	Количество, шт.	Стоимость единицы оборудования, руб.	Срок использования, мес.	Годовая норма амортизации, %	Сумма амортизационных отчислений (за 2 мес. эксплуатации), руб.
Термостат	1	2040	2	10	34
Автоклав	1	3570	2	10	59,5
Электроплита	1	750	2	10	12,5
Холодильник	1	2340	2	10	39
Фотоколориметр	1	9000	2	12,5	187,5
Центрифуга	1	4500	2	10	93,75
Ферментер	1	4500	2	10	93,75
Итого:	-	26700	-	-	520

Общая сумма накладных расходов НР, руб., рассчитывается, исходя из того, что удельный вес амортизационных отчислений составляет в них 70%:

$$НР = (520 \times 100) / 70 = 742,9$$

Величина прочих накладных расходов $НР_1$, руб., рассчитывается по формуле:

$$НР_1 = НР - C_{AM} = 742,9 - 520 = 222,9$$

Расчёт сметы расходов по НИР. Текущие затраты $Z_{НИР}$ на проведение НИР состоят из прямых затрат (ПЗ) и накладных расходов (НР):

$$Z_{НИР} = ПЗ + НР$$

Прямые затраты включают расходы на используемое для проведения исследований сырьё, материалы, реактивы (C_M); электроэнергию ($C_{ЭН}$); используемые средства ЭВМ ($C_{ВТ}$); заработную плату работников НИР ($C_{ЗП}$); отчисления на социальное страхование (От).

Расчёт сметы расходов по научно-исследовательской работе приведён в таблице 19.

Таблица 19 - Смета расходов по НИР

Наименование статьи расхода	Сумма затрат, руб.	Удельный вес, %
Капитальные затраты	26700	50,51
Текущие затраты (ПЗ + НР)	26165,36	49,49
Прямые затраты, в том числе:		
- на материалы	25,36	0,05
- на электроэнергию	72,06	0,14
- на водоснабжение	2,74	0,01
- на посуду	2827	5,35
Заработная плата	17251	32,63
Отчисления на социальное страхование	5244,30	9,92
Накладные расходы, в том числе:		
- амортизационные отчисления	520	0,98
- прочие накладные расходы	222,9	0,42
Итого:	52865,36	100

Таким образом, для реализации НИР потребуется сумма 52865,36 руб.

3.9.2 Расчет эколого-экономического эффекта

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» [20].

В соответствии с этой методикой эколого-экономический эффект ($\mathcal{E}_{\text{э}}$) определяли по формуле:

$$\mathcal{E}_{\text{э}} = P - Z,$$

где P – экономический результат средозащитных мероприятий, руб. Для рассматриваемого решения:

$$P = \Delta\Pi + \Delta D,$$

где $\Delta\Pi$ – сумма предотвращенных платежей за негативное воздействие на окружающую среду:

$$\Delta\Pi = \Pi_1 - \Pi_2,$$

где Π_1 , Π_2 – платежи за сбросы загрязняющих веществ в окружающую среду до и после осуществления технического решения с использованием бактериального препарата, тыс. руб.;

Z – величина приведенных затрат на осуществление природоохранного мероприятия:

$$Z = C + K \cdot E_n + \Pi,$$

где C – эксплуатационные расходы на содержание очистного оборудования, в т.ч. с использованием препарата биологической очистки;

K – единовременные капитальные затраты на реализацию природоохранного мероприятия;

E_n – коэффициент эффективности капитальных вложений ($E_n = 0,15$).

Расчет платежей за сброс загрязняющих веществ в воду (Π) проводили по

формуле:

$$П = K_{и} \cdot П^I_i \cdot m \cdot K^B_{э},$$

где $K_{и}$ – коэффициент индексации платы (принимается при расчете ущерба водным объектам для Волгоградской области $K_{и} = 1,41$; на 2014 год).

где $П^I_i$ – норматив платы за сброс 1 т загрязняющих веществ в пределах допустимых нормативов

$m_{ф}$ – фактические массы сброшенных веществ, т/год

$m_{д}$ – допустимые массы веществ для сброса, т/год

$K^B_{э}$ – коэффициент экологической ситуации и экологической значимости состояния водных объектов по бассейнам основных рек территорий в составе экономических районов России (принимается при расчете ущерба водным объектам для Волгоградской области $K^B_{э} = 1,33$).

$$m_{ф} = V_{общ.} \cdot C_{прев.}$$

$$m_{д} = V_{общ.} \cdot C_{д}$$

$$V_{общ.} = 607080 \text{ м}^3/\text{год}$$

$$m_{ф} = 1,132 \text{ т/год}$$

$$m_{д} = 0,372 \text{ т/год}$$

Плата за загрязнение водных объектов сбросами при превышении НДС:

$$П_{ф} = K_{и} \cdot K^B_{э} \cdot [П^B_{норм} \cdot m_{д} + 25 \cdot П^B_{норм} (m_{ф} - m_{д})], \text{ руб/год}$$

$$П_{ф} = 100426,59 \text{ руб/год.}$$

Плата за сброс сточных вод в пределах НДС:

$$П_{д.} = K_{и} \cdot K^B_{э} \cdot (П^B_{норм} \cdot m_{д}), \text{ руб/год}$$

$$П_{д.} = 1662,19 \text{ руб/год.}$$

Сумму предотвращенных платежей за сбросы загрязняющих веществ в окружающую среду ($\Delta П_{зв}$) рассчитывали по формуле:

$$\Delta П_{зв} = П_{зв1} - П_{зв2},$$

где: $П_{зв1}$, $П_{зв2}$ – платежи за сбросы загрязняющих веществ до и после осуществления технического решения с использованием бактериального препарата, руб/год

$$П_{зв1} = 100426,59 \text{ руб/год (сумма текущих платежей без установки)}$$

очистного оборудования с биопрепаратом)

$\text{Пзв2} = 1662,19$ руб/год (сумма платежей после установки очистного оборудования с используемой технологией биоочистки).

$$\Delta\text{Пзв} = 100426,59 - 1662,19 = 98764,40 \text{ руб/год.}$$

Расчет показателей экономического эффекта. Годовой прирост дохода от внедрения системы очистки сточных вод кожевенного производства с использованием нового биопрепарата предусматривается, поскольку при этом происходит до 20% возврата очищенной воды.

Для процесса крашения вода забирается из реки Волга и после очистки сбрасывается туда же (хотя и достигается необходимая степень очистки, часть загрязнения остается).

Годовой прирост дохода:

$$\Delta\text{Д} = \Delta\text{Д}_1 + \Delta\text{Д}_2,$$

где $\Delta\text{Д}_1$ – годовой прирост дохода при получении побочных продуктов из утилизированных веществ, руб.;

$\Delta\text{Д}_2$ - годовой прирост дохода от ресурсосбережения, руб.

Годовой прирост дохода при получении побочных продуктов, в данном случае – возмещаемая в производство вода (экономия на водопотреблении).

Величина $\Delta\text{Д}_1$ учтена ниже при расчете $\Delta\text{Д}_2$, т. е. $\Delta\text{Д}_1 = \Delta\text{Д}_2(\Delta\text{Д}_1)$

Годовой прирост дохода от ресурсосбережения (воды):

$$\Delta\text{Д}_2 = \text{Ц}_в \cdot q_в,$$

где $q_в$ – количество возвращаемой воды, м³/год (80% от ранее сбрасываемого объема), 375969 м³/год.

$$q_в = 375969 - 0,80 \cdot 375969 = 75193,80 \text{ м}^3$$

$$\text{Ц}_в - \text{цена } 1 \text{ м}^3 \text{ воды, } \text{Ц}_в = 9,14 \text{ руб/ м}^3$$

$$\Delta\text{Д}_2 = 9,14 \cdot 75193,80 = 687271,33 \text{ руб. / год}$$

Таким образом, экономический эффект внедряемых природоохранных мероприятий (Р), т.е. очищение сточной воды с использованием разработанного нами биопрепарата, равен:

$$P = 687271,33 + 98764,40 = 786035,73 \text{ руб. / год}$$

Расчет затрат на внедрение системы очистки с использованием нового биопрепарата. В настоящей работе рассматривается система очистки сточных вод от загрязнений, которая не предусматривает перестройку или перепланировку существующего очистного сооружения, поэтому капиталовложений в строительство здания не предусматриваются. Нет необходимости и в монтаже нового специализированного оборудования.

В таблицах 20 и 21 приведены расчеты эксплуатационных издержек, вызванных использованием рекомендуемой технологии биоочистки сточных вод.

Таблица 20 - Энергетические расходы

	Наименование оборудования			
	1. Учетное силовое оборудование		Итого:	2. Неучтенное силовое оборудование (10% от п.1)
	Биореактор	Насос		
Номинальная мощность	5,85	2,2	8,05	-
Количество единиц оборудования	1	1	2	-
Коэффициент спроса	0,64	0,64	-	-
Заявленная мощность, кВт	3,93	1,48	5,41	-
Годовой фонд рабочего времени, ч	4032	4032	4032	-
Годовой расход энергии, кВт·ч.	15845,76	5967,36	21813,12	2181,31
Всего (п.1 + п.2)	23994,43			

Таблица 21 - Расходы на энергоресурсы

Наименование	Единица измерения	Тариф за единицу, руб.	Расход в натуральном выражении	Сумма, тыс. руб.
Электроэнергия	кВт	2,94	23994,43	70543,62

Величина заявленной мощности:

$$N_3 = k_{\text{спр}} \cdot k_n \cdot N,$$

где N – номинальная мощность установленного оборудования, кВт;

$k_{\text{спр}}$ – коэффициент спроса; для периодического производства $k_{\text{спр}} = 0,64$;

k_n – коэффициент, учитывающий потери электроэнергии, $k_n = 0,95$

$$N_{3. \text{эк}} = 0,64 \cdot 1,05 \cdot 5,85 = 3,93 \text{ кВт};$$

$$N_{3. \text{нас}} = 2,2 \cdot 0,64 \cdot 1,05 = 1,48 \text{ кВт}.$$

Затраты на электроэнергию за год определяли по формуле:

$$Z_{\text{эл}} = N \cdot T \cdot Ц,$$

где T – годовой фонд рабочего времени, час; $T = 16 \cdot 252 = 4032$ ч. (2 смены, 252 рабочих дня в году);

$Ц$ – цена за 1 кВт заявленной мощности, равная 2,94 руб.

Затраты на оплату труда работников, обслуживающих очистное оборудование, определяли исходя из штата персонала очистного сооружения, устанавливаемого по нормам обслуживания. В данном случае для обслуживания действующей установки с использованием разработанного нами биопрепарата достаточно одного рабочего - оператора.

$$\text{ФОТ} = Z/\text{пл}_{\text{мес}} \cdot 12 \cdot 1,302 \cdot Ч_{\text{сп}},$$

где $Z/\text{пл}_{\text{мес}}$ - среднемесячная заработная плата оператора, равная 8500 руб.;

1,304 – коэффициент, учитывающий законодательно установленную ставку отчисления от заработной платы на социальные нужды. Данный коэффициент может меняться в соответствии с законодательством.

$Ч_{\text{сп}}$ – списочное число работников, обслуживающих очистное оборудование.

Для эксплуатации оборудования не требуется дополнительного персонала; эту функцию (включать электропитание, следить за расходом воды, добавлять реагенты и биоматериалы) может выполнять сменный мастер, получая надбавку в 10% от основного оклада, то есть $0,10 \cdot 8500 = 850$ руб./мес.

Учитывая, что предприятие работает в 2 смены ежемесячная надбавка составит $850 \cdot 2 = 1700$ руб.

$$\text{ФОТ} = 1770 * 12 * 1,302 = 27654,48 \text{ руб.}$$

Расходы на текущий ремонт принимаются в размере 5% от стоимости оборудования имеющегося очистного оборудования.

$$0,05 \cdot 1510000 = 75500 \text{ руб.}$$

Расходы на содержание основных средств принимали в размере 0,85% от стоимости основных средств:

$$0,0085 \cdot 1510000 = 12835 \text{ руб.}$$

Амортизационные отчисления принимали в размере 15% от стоимости оборудования:

$$0,15 \cdot 1510000 = 226500 \text{ руб.}$$

Расчет эксплуатационных расходов оборудования с учетом использования биопрепарата приведен в таблице 22.

Таблица 22 - Расчет эксплуатационных расходов оборудования с учетом использования биопрепарата

Статьи расхода	Сумма, руб.
1. Энергетические расходы:	
а) электроэнергия	70543,62
б) вода, катализатор, сопутствующие биоматериалы	
2. Расходы на оплату труда с отчислениями на социальные нужды	27654,48
3. Расходы на текущий ремонт	75500
4. Расходы на содержание основных средств	12835
5. Амортизационные отчисления	226500
Итого: $\sum(\text{п.1-5})$	413033,1
6. Прочие расходы по цеху (затраты на охрану труда обслуживающего персонала) (32% от $\sum(\text{п.1-5})$ + 20% от п. 2)	137701,49
Итого по цеху: $\sum(\text{п.1-6})$	550734,59
7. Общезаводские расходы (15% от $\sum(\text{п.1-6})$)	82610,19
Всего:	633344,78

Для очистки 375969 м³ в год требуется рапа озера Эльтон по цене 0,62 руб. на 1 м³ (с учетом доставки, хранения и пр.)

Расчет ожидаемого эколого-экономического эффекта от предлагаемого решения осуществляли в соответствии с методикой, изложенной ранее.

$$\mathcal{E}_{\text{ээ}} = P - Z$$

где P – экономический результат средозащитных мероприятий, руб.

Z – величина приведенных затрат на осуществление природоохранного мероприятия:

$$Z = C + K \cdot E_n + П,$$

где C – эксплуатационные расходы на содержание очистного оборудования; 633344,78 руб.

K – единовременные капитальные затраты на реализацию природоохранного мероприятия с учетом НИР, 285966,14 руб.

E_n – коэффициент эффективности капитальных вложений ($E_n = 0,15$).

П – платежи за сброс воды, 100426,59 руб.

$$K = 0,62 \cdot 375969 + 52865,36 = 285966,14 \text{ руб.}$$

$$Z = 633344,78 + 285966,14 \cdot 0,15 + 100426,59 = 776666,29 \text{ руб.}$$

Расчет ожидаемого эколого-экономического эффекта равен:

$$P = 786035,73 \text{ руб.}$$

Срок окупаемости очистного оборудования рассчитывали по формуле:

$$T_{\text{ок}} = K_i / ((\Delta Д + \Delta П) - C),$$

где K_i – единовременные капитальные затраты на реализацию природоохранного мероприятия, 285966,14 руб.

C – эксплуатационные расходы на содержание очистного оборудования, 633344,78 руб.

$\Delta Д$ – годовой прирост дохода от проектируемого природоохранного мероприятия с учетом НИР, 687271,33 руб.

$\Delta П$ – предотвращенные платежи, 98764,40 руб.

$$T_{\text{ок}} = 285966,14 / ((687271,33 + 98764,40) - 633344,78) = 1,873 \text{ года}$$

(т.е. 1 год и 10,5 мес.).

Прирост рентабельности по приведенным затратам равен:

$$786035,73 / 776666,29 = 1,01206 \text{ или } 1,21 \%$$

Научную ценность результатов НИР определяли по формуле:

$$Ц_{нт} = p \times \sum_{i=1}^k M_i \times v_i,$$

где p – вероятность получения ожидаемого результата;

k – число оцениваемых параметров;

M_i – оценка результатов НИР в баллах по i -ому признаку;

v – коэффициент весомости (значимости) i -ого признака.

Оценка результатов НИР приведена в таблице 23.

Таблица 23 - Оценка результатов НИР

Фактор результативности	Коэффициент значимости	Качество фактора	Характеристика фактора	Оценка
Новизна полученных результатов	0,5	Средняя	Некоторые новые закономерности, методы, способы, позволяющие создать принципиально новую продукцию	7
Глубина научной проработки	0,35	Средняя	Невысокая сложность расчётов, проверка на небольшом объёме экспериментальных данных	7
Степень вероятности успеха	0,15	Большая		10

Вероятность получения ожидаемого результата при проведении НИР оценивали формулой:

$$p = p_1 \times p_1 \times p_1 = 0,95 \times 0,6 \times 0,5 = 0,285,$$

где p_1 – вероятность успешного завершения НИР, $p_1 = 0,95$;

p_2 – вероятность внедрения результатов НИР, $p_2 = 0,6$;

p_3 – вероятность соответствия ожидаемого экономического эффекта теоретическому, который может быть получен при внедрении результатов НИР, $p_3 = 0,5$.

Тогда научная ценность результатов НИР составляет:

$$Ц_{нт} = 0,285 \times (0,5 \times 7 + 0,35 \times 7 + 0,15 \times 10) = 2,12$$

Таким образом, результаты данной научно-исследовательской работы экономически целесообразны и имеют значительную ценность для дальнейших научных и практических разработок с последующим внедрением на промышленных предприятиях.

Заключение и выводы по работе

Технический прогресс, быстрое развитие промышленности, интенсификация сельского хозяйства, развитие транспорта связано с загрязнением окружающей среды различными отходами, побочными продуктами, трудно разлагаемыми веществами. Экологическая биотехнология, являясь специфическим применением биотехнологии для решения проблем окружающей среды, охватывает широкий круг вопросов, в значительной степени позволяющий ослабить негативные последствия технической деятельности человеческого общества.

Широкое использование биологического метода для очистки сточных вод обусловлено возможностью удалять разнообразные органические соединения, в том числе токсичные; простотой аппаратного оформления; относительно невысокими эксплуатационными расходами.

Основная роль в деструкции загрязнений сточных вод принадлежит бактериям, использующим разнообразные органические и неорганические вещества в качестве источников питания и энергии. Чем выше скорость роста и потребления субстрата, тем эффективнее идет процесс биоочистки. В связи с этим конструирование бактериальных биопрепаратов с повышенными ростовыми характеристиками и разработка способов их применения является одним из приоритетных направлений экологической биотехнологии.

В качестве основы для получения биопрепарата в работе был использован бактериальный штамм, выделенный из сточной воды кожевенного завода ООО «Шеврет» г. Волгограда. Выделение культуры осуществляли методом высева проб на селективные питательные среды, содержащие в качестве единственного источника углерода отходы переработки кожи (кожную мездру). В результате экспериментов было получено семь штаммов, отличающихся между собой по культуральным и морфологическим свойствам. Анализ скорости роста бактерий позволил отобрать микробную культуру, дающую наибольшее количество биомассы на селективной питательной среде. Исследование культуральных, морфологических и биохимических свойств выделенного штамма позволило

отнести его к семейству Bacillaceae, роду Bacillus, виду subtilis. Штамм был обозначен нами B.subtilis ВГТУ5 и депонирован в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск».

Поскольку жировые вещества являются одним из основных компонентов сточной воды кожевенных производств, в работе была изучена липидоокисляющая активность выделенного микроорганизма, которую оценивали по результатам роста в бульоне Штерна и на плотной питательной среде, содержащей животный жир. Полученные в ходе проведенных исследований результаты позволили сделать вывод о высокой липолитической активности выделенного бактериального штамма.

Для получения клона микроорганизмов с повышенными ростовыми характеристиками проводили генетическое конструирование штамма B.subtilis ВГТУ5 путем получения индуцированных мутантных клонов. В качестве мутагенного фактора было выбрано воздействие на популяцию клеток ультрафиолетового облучения. По результатам эксперимента отобрали наиболее высокопродуктивный клон, дающий наибольший выход биомассы.

Бактериальные клетки, участвующие в технологиях управляемой аэробной очистки промышленных и бытовых сточных вод, представляют собой иммобилизованные системы, поскольку находятся в прикрепленном состоянии на хлопьях активного ила в аэротенках или в биопленке на гранулах загрузки биофильтров. В связи с этим в работе была определена возможность выращивания полученной бактериальной культуры в иммобилизованном состоянии. В качестве носителя использовали магнитные гранулы из альгината кальция. Применение магнитного материала (оксида железа) в носителе бактериальных клеток способствует приданию иммобилизованной системе магнитоуправляемости, что позволяет значительно облегчить работу с ней. Иммобилизованные в магнитные альгинатные носители бактериальные клетки штамма B.subtilis ВГТУ5 сохраняли жизнеспособность в течение 5 циклов культивирования в жидкой питательной среде при стационарном культивировании.

Поскольку применение магнитных носителей для иммобилизации микроорганизмов связано с изучением уровня воздействия электромагнитного поля на данный биологический объект, в процессе исследований было изучено влияние электромагнитного поля на интактный и иммобилизованный в магнитоуправляемые носители бактериальный штамм. Для экспериментов был разработан специальный прибор, создающий электромагнитное поле различной напряженности, который позволил установить оптимальное значение напряженности ЭМП для культивирования клеток штамма *B.subtilis* ВГТУ5, равное 12,24 А/м. При культивировании микроорганизмов в питательной среде в присутствии ЭМП урожайность биомассы была выше контрольного значения на 29%. Выращивание бактериальных клеток в иммобилизованном состоянии не снизило эффект от воздействия электромагнитного поля и прирост биомассы штамма *B.subtilis* ВГТУ5, наблюдаемый при культивировании микроорганизмов в питательной среде в присутствии ЭМП напряженностью 12,24 А/м, был также выше контроля на 29%.

В улучшении ростостимулирующей активности штамма, использующего органические загрязнения сточной воды, особое значение имеет добавление в среду минеральных компонентов. При исследовании влияния макро- и микроэлементов на рост штамма *B.subtilis* ВГТУ5, была выявлена высокая потребность культуры в магнии. Экономически целесообразно использовать магнийсодержащие компоненты, находящиеся в природных минералах. В связи с этим была определена возможность роста бактерий в питательных средах, содержащих раствор бишофита Приволжской моноклинали, солевую рапу озера Эльтон и соль Мертвого моря. В работе были определены оптимальные концентрации этих природных компонентов, влияющие на уровень накопления биомассы бактерий в жидкой питательной среде. В результате проведенных экспериментов было установлено, что наибольший эффект дает добавление в среду выращивания 2,5% солевой рапы озера Эльтон.

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 микроорганизмов-деструкторов использовали пробы сточной воды из коллектора кожевенного предприятия, удаляя из нее взвешенные частицы.

В результате стационарного выращивания культуры *B.subtilis* ВГТУ5 наблюдали осветление сточной воды в 15 раз. При этом произошло снижение pH среды до нейтральной величины, что важно при сбросе очищенной воды в природные водоемы.

При моделировании биологической очистки в глубинной культуре изучали возможность его аппаратного выращивания в биореакторе. При исследовании динамики роста штамма *B.subtilis* ВГТУ5 в жидкой питательной среде было установлено, что лаг-фаза длится около 2 ч, экспоненциальная фаза - до 23 ч от начала выращивания. Максимальная концентрация биомассы ($6 \cdot 10^9$ м.к./мл) была достигнута к 27 ч культивирования, после чего скорость размножения снижалась и наступала фаза гибели клеток.

При моделировании промышленной технологии биоочистки осуществляли аппаратное выращивание бактериального штамма-деструктора в сточной воде кожевенного завода в присутствии 2,5% рапы озера Эльтон. Наибольшая концентрация микробной массы была получена к 27-31 часу от начала выращивания бактерий в сточной воде, где единственным источником питания микроорганизмов являлись присутствующие в ней загрязнения. В результате культивирования биопрепарата наблюдали увеличение прозрачности воды в 24 раза. Кроме того, произошла нейтрализация стока: снижение pH от 8,5 до 7,2.

Экспериментальные результаты по исследованию воздействия природных минеральных добавок и лабораторному моделированию обрабатывали методами корреляционного анализа при математическом моделировании на ЭВМ, применяя методы наименьших квадратов и наименьших относительных квадратов. Статистическая обработка с использованием коэффициентов корреляции и их анализ по критериям Кохрена и Фишера показали, что полученные в

диссертационном исследовании результаты являются достоверными, воспроизводимыми и адекватными.

Таким образом, проведенные нами исследования позволили предложить новый бактериальный биопрепарат - штамм-деструктор *B.subtilis* ВГТУ5, подобрать условия его использования для совершенствования биологической очистки сточной воды 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 проведения индуцированного мутагенеза выделенного штамма получен высокопродуктивный клон, позволяющий увеличить выход биомассы на 34%.

3. Установлено, что оптимальными условиями выращивания клеток *B.subtilis* ВГТУ5 в электромагнитном поле, позволяющими увеличить урожайность культуры на 29%, является напряженность 12,24 А/м. Проведена иммобилизации бактериального штамма в магнитные альгинатные носители, которые были использованы для культивирования бактериальных клеток при найденных параметрах электромагнитного поля.

4. Обнаружено стимулирующее влияние солей магния на рост выделенной культуры. Исследовано влияние природных магнийсодержащих добавок в среду выращивания штамма-деструктора - бишофита, солевой рапы озера Эльтон и соли Мертвого моря. Установлено повышение выхода биомассы штамма *B.subtilis* ВГТУ5 на 213% при внесении в среду 2,5% рапы озера Эльтон.

5. Определена динамика роста культуры *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. Проведено математическое моделирование экспериментальных результатов на ЭВМ методами наименьших квадратов и наименьших относительных квадратов. При корреляционном анализе с использованием критериев Кохрена и Фишера показана достоверность, воспроизводимость и адекватность результатов исследования.

8. Эколого-экономическая оценка результатов работы показала их экономическую целесообразность, научную ценность и перспективность для внедрения на предприятиях биологической очистки. Годовой экономический эффект от внедрения биопрепарата составит 786035,73 руб.

Список сокращений

БПК – биологический показатель кислорода

м.к. – микробные клетки

МНК - метод наименьших квадратов

ПАВ – поверхностно-активное вещество

ПДК - предельно допустимая концентрация

СНиП – санитарные правила и нормы

СПАВ – синтетическое поверхностно-активное вещество

ХПК – химический показатель кислорода

ЭМП – электромагнитное поле

Список использованных источников

1. Александров, В.И. Повышение эффективности очистки сточных вод кожевенного и мехового производства [Текст] / В.И. Александров, П.А. Гембицкий, Н.Е. Кручинина и др. // Экология и промышленность. – 2002. - №10. – С 36-37.
2. Алферова, А. А. Замкнутые системы водного хозяйства промышленных предприятий, комплексов и районов [Текст] / А. А. Алферова, А. П. Нечаев. - М.: Стройиздат. – 1987. - 65 с.
3. Артемов, А.В. Производство изделий из кожи: проблемы экологии [Текст] / А.В. Артемов // Экология и промышленность. – 2004. - № 2. – С 32-35.
4. Байкина, Н. Д. Многократное использование отработанных зольных жидкостей [Текст] / Н. Д. Байкина и др. – М.: Кожевенно-обувная промышленность, 1979. - №8. - С.3-5.
5. Береза, А. И. Очистка и использование поверхностного стока с территорий промышленных предприятий [Текст] / А. И. Береза, Ю. П. Беличенко - М.: ВЗИИТ, 1985. – 48 с.
6. Биологическая очистка сточных вод кожевенных и меховых предприятий [Электронный ресурс]. - [2011]. - Режим доступа: <http://biofile.ru/bio/17044.html>.
7. Биопрепараты «Живая экология» [Электронный ресурс]. - [2011] : режим доступа: <http://www.live-ecology.ru/katalog-biopreparatov.htm>
8. Бондарь, А.Г. Планирование эксперимента в химической технологии. Основные положения. Примеры и задачи / А.Г.Бондарь, Г.А.Ститюха.- Киев: Вища школа, 1976. - 184 с.
9. Божко, Л. Д. и др. Безотходная интенсивная технология консервирования кожевенного сырья [Текст] / Л. Д. Божко, А. В. Игнатенко, Т. В. Шарыхина // Науч.-практ. конф. «Ресурсоберег. и экол. чист. технол.». М., 1996. - С. 273.
10. Боровков, В. М. и др. Исследование возможности многократного использования хромосодержащих растворов для дубления кож [Текст] / В. М.

Боровков, Л. В. Конопелькина, А. С. Романь, А. С. Фица, И. Т. Шкаранда // Кожевенно-обувная промышленность. М., 1984. - №11. - С.8-9.

11. Будыкина Т.А. Комплексная система очистки сточных вод предприятий кожевенной промышленности [Текст]: Дис. ... докт. техн. наук: 05.23.04: / Будыкина Татьяна Алексеевна. – Москва, 2006. - 295 с.

12. Бусов, А. Н. и др. Клонирование и селекция бактериального штамма, осуществляющего очистку сточных вод кожевенного производства [Текст] / А. Н. Бусов, Н. В. Герман, И. В. Владимцева // Экологобезопасные и ресурсосберегающие технологии и материалы. Улан-Удэ, 2011. - С. 83-84.

13. Бухгалтер, Б. Л. Очистка сточных вод от нефтепродуктов с помощью иммобилизованных микроорганизмов [Текст]: Дисс... канд. техн. наук: 25.00.36 / Бухгалтер Борис Львович. - Москва, 2003. - 137 с.

14. Вебер, Н. А. Очистка кожевенных сточных вод от сульфидов [Текст] / Н. А.

Вебер, Н. А. Вакулова // Кожевенно-обувная промышленность, 1983. - № 7. - С. 8-

10. Владимцева, И.В. Исследование бактериального штамма для очистки сточных вод кожевенного производства [Электронный ресурс] / И.В. Владимцева, Н.В.

Герман // Экологические проблемы урбанизированных территорий : матер. всерос. конф. (г. Пермь, 16–18 марта 2011 г.) / ГОУ ВПО «Пермский гос. техн. ун-т». - Пермь, 2011. - 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). - С. 40-44.

15. Владимцева, И. В. Подготовка лабораторного оборудования и питательных сред для микробиологических исследований: методические указания к лабораторной работе №1 по курсу «Основы биотехнологии» [Текст] / И. В. Владимцева, Т. В Хохлова, О. В. Колотова, Л. В. Федотова; ВолгГТУ - Волгоград, 2004. – 12 с.

16. Воронов, Ю. В. Водоотведение и очистка сточных вод [Текст] / Ю. В. Воронов. М.: Издательство ассоциаций строительных вузов, 2006. – 704 с.

17. Гарин, В. М. Экология: для технических вузов. Серия «Высшее образование». [Текст] / В. М. Гарин, И. А. Клёнова, В. И. Колесников; под ред. В. М. Гарина. Ростов н/Д: Феникс, 2003. - 384 с.

18. Геллер, Т. Э. Исследование методов электрокоагуляционной очистки сточных вод [Текст] / Т. Э. Геллер, Е. Д. Гаврилова. М.: Кожевенная обувная промышленность, 1981. - №12. – 245 с.
19. Герман, Н.В. Выделение и изучение свойств бактериального штамма, осуществляющего 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.
20. Временная типовая методика определения экономической эффективности осуществления природоохранных мероприятий и оценки экономического ущерба, причиняемого народному хозяйству загрязнением окружающей среды [Текст]: одобрена пост. Госплана СССР, Госстроя СССР, Президиума АН СССР от 21 октября 1983 г. № 254/284/134.
21. Голованчиков, А.Б. Применение ЭВМ в химической технологии и экологии: учеб.пособие [Текст] / А.Б.Голованчиков, Б.В.Симонов - Волгоград: ВолгГТУ, 1994. - Ч.1. - 114 с.
22. Голубовская, Э. К. Биологические основы очистки воды [Текст] / Э. К. Голубовская. - М.: Высшая школа, 1978. - 268 с.
23. Гончаров, В. С. Активирование коагуляции стоков [Текст] / В. С. Гончаров. М.: Кожевенно-обувная промышленность, 2000. - № 2. - С.35.
24. Горбатов, С. А. и др. Многократное использование отработанной жидкости после хромового дубления [Текст] / С. А. Горбатов и др. М.: Кожевенно-обувная промышленность, 1980. - №5. – 245 с.
25. Гордин, И. В. Технологические системы водообработки [Текст] / И. В. Гордин. - Л.: Химия, 1987, - 264 с.
26. Грачёва, И. М. Технология ферментных аппаратов [Текст] / И. М. Грачева. - М.: Агропромиздат, 1987. - 335 с.
27. Гуторова, Н.В. Оценка и моделирование экологической обстановки на предприятиях легкой промышленности [Текст]: Дис. ... канд. техн. наук :

05.19.05: / Гуторова Наталья Васильевна. – М., 2011. - 170 с.

28. Данилкович, А. Г. и др. Исследование возможности многократного использования красильно-жировальных растворов в производстве кожи [Текст] / А. Г. Данилкович, В. И. Бухарский, И. Т. Шкоранда. М.: Кожевенно-обувная промышленность, 1984. - №11. - С. 6-8.

29. Дергунова, Л. Н. Научно-исследовательский институт научно-технической информации и техноэкономических исследований [Текст] / «Очистка сточных вод кожевенного производства», Экспресс-информация Госплана узбекской ССР, 1985 г.

30. Друзьянова В.П., Андреева Л.С. Анализ сточных вод предприятий, перерабатывающих кожевенно-меховое сырье // Universum: Технические науки: электрон. научн. журн., 2014. - №2(3). URL: <http://7universum.com/ru/tech/archive/item/1040>

31. Душин, Б. М. Методы очистки сточных вод кожевенных заводов [Текст] / Б. М. Душин, В. И. Григорьева, Л. А. Фридман. - М.: Легкая индустрия, 1978. – 96 с.

32. Егоров, Н.С. Биотехнология: учеб. пособие для вузов. В 8 кн. Кн. 7: Иммуобилизованные ферменты / Н.С. Егоров, В.Д. Самуилов; под ред. Н.С. Егорова. – М.: Высш. шк., 1987. – 159 с.

33. Елфимова, Г. И. Способ очистки сточных вод от хрома [Текст] / Г. И. Елфимова, И. В. Машников. М.: Унитр. Предприятие НИИ кож.-легк. автоматиз. легк. промышленности. - 2000. - 137 с.

34. Жмаков, Г. Н. Об очистке сточных вод на меховых и кожевенных заводах [Текст] / Жмаков Г. Н. М.: Кожевенная промышленность, 1983. - №7, С. 5-8.

35. Жмаков, Г. Н. Очистка сточных вод меховых предприятий Болгарии [Текст] / Г. Н. Жмаков М.: Кожевенно-обувная промышленность, 1977. - №4. - С. 51-55.

36. Жмаков, Г. Н. Эксплуатация оборудования и систем водоснабжения и водоотведения [Текст] / Г. Н. Жмаков. М.: Инфра-М, 2005. – 237 с.

37. Жмур, Н. С. Технологические и биохимические процессы очистки сточных вод на сооружениях с аэротенками [Текст] / Н. С. Жмур. М.: Акварос, 2003. – 512 с.

38. Жуков, А. И. Канализация промышленных предприятий. Очистка промышленных сточных вод [Текст] / А. И. Жуков, И. Л. Монгайт, И. Д. Родзимер. М.: Госстройиздат, 1962. – 602 с.
39. Жуков, А. И. Методы очистки производственных сточных вод [Текст] / Жуков, А. И., Монгайт, К. Л., Родзиллер И. Л. - М.: Стройиздат, 1977, - 204 с.
40. Захарова, А.А. Очистка сточных вод кожевенного производства от сульфидов и фенолсодержащих соединений [Текст] / А. А. Захарова // Экологический вестник. – 1984. - № 2. – С.28-31.
41. Зиятдинов, Н. Н. Системный подход к повышению эффективности биологической очистки промышленных сточных вод [Текст] / Н. Н. Зиятдинов Казань, 2001. – 39 с.
42. Иванов, В. Ф. Очистка городских сточных вод [Текст] / В. Ф. Иванов. - Изд. 2-е. - Издание Одесского ОНТУ ВСНХ УССР, 1929. - 512 с.
43. Кобзев Е.Н., Петрикевич С.Б., Шкидченко А.Н. Исследование устойчивости ассоциации микроорганизмов-деструкторов в открытой системе. // Прикладная биохимия и микробиология, 2001, т. 37, № 4, 413-417.
44. Кобызева Н.В. Локальная очистка промышленных сточных вод с помощью препарата «Ленойл» [Текст]: Дис.... канд. биол. наук: 03.00.23: / Кобызева Надежда Валерьевна. – Уфа, 2009. - 131 с.
45. Ковалева, Н. Г. Биохимическая очистка сточных вод предприятий химической промышленности [Текст] / Н. Г. Ковалева, В. Г. Ковалев - М.: Химия, 1987. - 160 с.
46. Когановский, А. М. Очистка и использование сточных вод в промышленном водоснабжении [Текст] / А. М. Когановский, Н. А. Клименко, Т. М. Левченко и др. - М.: Химия, 1983. – 288 с.
47. Корчуганова Т.М. Разработка технологии утилизации осадков сточных вод кожевенного производства [Текст]: Дис. ... канд. техн. наук : 05.19.05, 05.17.11: / Корчуганова Татьяна Михайловна. – М., 1997. - 170 с.
48. Кочетков, Б. С. Новое в переработке отходов кожевенного производства [Текст]. / Б. С. Кочетков - М.: Кожевенно-обувная промышленность. -1992. - №4.

49. Ксенофонтов, Б.С. Проблемы очистки воды / Б. С. Ксенофонтов - М.: Общество «Знание», 1991. – С. 36-38.
50. Кузнецов, А.Е. Прикладная экобиотехнология: учебное пособие: в 2 т. Т. 1 / А.Е. Кузнецов [и др.]. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2012. – 629 с.
51. Лабинская, А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований [Текст] / А. С. Лабинская. - М.: Медицина, 1978. – 394 с.
52. Ласков, Ю. М. Очистка сточных вод предприятий кожевенной и меховой промышленности [Текст] / Ю. М. Ласков, Т. Г. Федоровская, Г. Н. Жмакова. - М.: Легкопромбытиздат, 1984. – 168 с.
53. Ласкорин, Б. Н., Цыганков, А. П. Проблемы развития безотходных производств [Текст] / Б. Н. Ласкорин и др. М.: Стройиздат, 1985. – С.13-15.
54. Легоцкий, Н. Т. Очистка сточных вод кожевенных заводов на локальных сооружениях [Текст] Экспресс-Информация: кожевенного пром. в СССР. - М.: ЦНИИТЭИ легпро., 1977. - №1. - С. 8-21.
55. Локальные очистные сооружения [Электронный ресурс]. - [2008]. - Режим доступа: <http://www.klimat.od.ua/content/view/289/1/>.
56. Мамков, А. А. и др. Электрофлотационная очистка сточных вод кожевенного завода от хрома и его регенерация из пенопродукта [Текст] бул. Ака. Штинце РССмолд. Изв. АН МолдССР. // сер. Физ-техн. и мат. наук, 1973 г. - №1.
57. Манцев, А. И., Щербаков, В. Н. Очистка сточных вод после золениа шкур с целью повторного использования [Текст] / А. И. Манцев, В. Н. Щербаков. - М.: Легпромбытиздат, 1988. – 240 с.
58. Манцев, А. И., Щербаков, В. Н. Очистка сточных вод после золениа шкур [Текст] / А.И. Манцев, В.Н. Щербаков. – М.: Кожевенно-обувная промышленность, 1983 г. - № 7. - С. 12-14.
59. Методы общей бактериологии. Т.3 /под ред. Ф. Герхардта. – М.: Мир. - 1984. - 265с.
60. Микробиология: лабораторный практикум / Н. Б. Градова и др. - Рязань: РХТУ им. Менделеева, 2001. - 243 с.

61. Мэм, С. К. и др. Очистка маслоэмульсионных сточных вод методом коагуляции [Текст] / С. К. Мэм, А. М. Каролинский, Т. И. Фомина. М.: Химия и Технология воды, 1984 г. - №5. С.451-452.
62. Начева, П. М. Разработка схемы очистки высококонцентрированных сульфидсодержащих сточных вод кожевенных заводов [Текст]: Дисс. ... канд. техн. наук. - М., 1985. - 153 с.
63. Ненашева, М. Н. Микробная очистка сточных вод, содержащих токсичные вещества [Текст] / М. Н. Ненашева, М. Б. Циинберг, Л. Ф. Добрынина // Гигиена и санитария. - 1999. - №1. - С. 52-57.
64. Нечаева, И.А. Биодegradация углеводов нефти психротрофными микроорганизмами-деструкторами [Текст]: Дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23 : / Нечаева Ирина Александровна. - Пушкино, 2009. - 133 с.
65. Носова, Е. Г., Теплых, С. Ю. Очистка сточных вод меховой фабрики с большим содержанием хрома / Е. Г. Носова, С. Ю. Теплых. - Самарский государственный архитектурно-строительный университет, Самара. – Водочистка, №6. – 2012 г. – С. 34-37.
66. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Т. 2. Пер. с англ. /Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса. – М., Мир, 1997. – 368 с.
67. Павлов, К. Ф. Примеры и задачи по курсу процессов и аппаратов химической технологии [Текст]: учеб. пособ. для вузов / К. Ф. Павлов, П. Г. Романков, А. А. Носков. - Л.: Химия, 1991. - 560 с.
68. Павлова, М.С. Экологический аспект химической технологии кожи. – М.: МГАЛП, 1997. – 191с.
69. Пат. 2105562 Российская Федерация А61К35/74, А01N63/00, С12N1/20, С12N1/20, С12R1:125. Способ получения бактериального препарата на основе *Bacillus subtilis* [Текст] / Лемяк А.И., Костровский В.Г., Рязанкина О.И., Набиев К.Ф. и др.; заявл. 14.06.95 ; опубл. 27.02.1998.
70. Пат. 2490286 Российская Федерация, МПК: С08Н1/06 ; А23J1/10. Способ получения белкового гидролизата [Текст] / Греков Л.И., Нефедьева Е.Э., Даниленко Т.И., Желтобрюхов В.Ф., Голованчиков А.Б.; Заявитель и

патентообладатель ФГБОУ ВПО «Волгоградский государственный технический университет». – № 2012104284/05; заявл. 07.02.12, опубл. 20.08.13. .

71. Пат. № 2530042 Российская Федерация С02F9/08, С02F1/24, С02F1/52, С02F1/56, С02F1/36, С02F103/24 Способ очистки сточных вод кожевенного производства [Текст] / Баяндин М.В., Кленовский Д.В., Баяндина Е.Н., Кленовская М.А. и др.- Заявл. 17.04.2013, опубл. 10.10.2014.

72. Перелыгина, Л.С. Разработка биотехнологического метода обработки меховой овчины [Текст]: Дис. ... канд. техн. наук : 03.00.23 : / Перелыгина Лилия Сергеевна. - Улан-Удэ, 2004. - 133 с.

73. Перт, С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток [Текст] / С. Дж. Перт. - М.: Мир, 1978. - 331 с.

74. Планирование эксперимента в химической технологии (основные положения, примеры и задачи) [Текст]: учеб. пособие для НИИ / Бондарь А. Г., Статюха Г. А. – Киев – Издательское объединение «Вища школа», 1976. – 184 с.

75. Поруцкий, Г. В. Биохимическая очистка сточных вод органических производств [Текст] / Поруцкий, Г. В. – М.: Химия, 1975. – 256 с.

76. Потапова Л.В. Иммобилизация в магнитные носители микроорганизмов, осуществляющих очистку сточных вод [Текст]: Дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23: / Потапова Лариса Витальевна. - Волгоград, 2006. - 144 с.

77. Плешакова Е.В. Получение нефтеокисляющего биопрепарата путём стимуляции аборигенной углеводородокисляющей микрофлоры [Текст] / Е.В. Плешакова, Н.Н. Позднякова, О.В. Турковская // Прикл. биохим. и микробиол. 2005. - Т. 41. - № 6. - С. 634-639.

78. Преснякова, О. В., Репин, А. Г. Экологическая чистая технология дубления [Текст] / О. В. Преснякова, А. Г. Репин // ICSEC-96: Междунар. науч. практ. конф. по исполз. достиж. науки и техн. в развитии городов, посвящ. 850-летию основания Москвы, 1996. – С. 275-276.

79. Проскуряков, В. А. Очистка сточных вод в химической промышленности [Текст] / В. А. Проскуряков, Л. И. Шмидт. - Л.: Химия, 1977. - 464 с.

80. Пузырева С.Г. Разработка условий получения бактериальной суспензии и ее использование для обработки меховой овчины [Текст]: Дис. ... канд. техн. наук : 03.00.23 : / Пузырева Светлана Геннадьевна. - Улан-Удэ, 2005. - 161 с.
81. Пугачев, Е. А. Методы и средства защиты окружающей природной среды в легкой промышленности [Текст] – М.: Легпромбытиздат, 1988. -240 с.
82. Пустыльник, Я. И. Кожевенные отходы - золотое дно [Текст] / Я. И. Пустыльник // В мире оборудования. - 2002. - № 2 (19). – С. 16-19.
83. Пяткин, К. Д., Кривошеин Ю. С. Микробиология. / К. Д. Пяткин, Ю. С. Кривошеин - М.: Медицина, 1980, - 512 с.
84. Рандольф, Р. Что делать со сточными водами [Текст] / пер. с нем. И. Б. Палееса; под ред. Т.А. Карюхиной - 2-е изд. М.: Стройиздат, 1987 - 120 с.
85. Роговская, Ц. И. Биохимический метод очистки производственных сточных вод [Текст] / Ц. И. Роговская. - М: Стройиздат, 1987. - 288 с.
86. Родинов, А. И. Техника защиты окружающей среды [Текст] / А. И. Родинов, В. Н. Клушин, Н. С. Торочешников – М.: Химия, 1989, - 512 с.
87. Смирнов, В.И. Экологические проблемы развития кожевенной промышленности // Кожевенно-обувная промышленность. – 1994. - №9. – С. 42-44.
88. Снижение потребления воды и загрязненности сточных вод на отечественных и зарубежных кожевенных заводах. - М., ЦНИИТЭИлегпром, 1974. - 44 с.
89. Сточные воды кожевенного и мехового производства [Электронный ресурс]. - [2013]. - Режим доступа: <http://biofile.ru/bio/17044.html>.
90. Сьмеховски, К. Проблема сточных вод кожевенных промышленностей Польши [Текст] // Кожевенно-обувная промышленность, 1996 г. - №3. - С.30-31.
91. Телитченко, М. М. Введение в проблемы биохимической экологии: Биотехнология, сельское хозяйство, Охрана среды / М. М. Телитченко; отв. ред. Большаков В. Н.; АН СССР. - М.: Наука, 1990. - 284 с.
92. Теппер, Е. З. Практикум по микробиологии [Текст] / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. – М.: Колос, 1979. - 216 С.

93. Терентьев, В.И. Биотехнология очистки воды / В. И. Терентьев, Н. М. Павловец. В 2-х частях. 4.1. - Спб.: Изд-во Гуманистика, 2003. - 272 с.
94. Ткачук, Н. Г. Влияние электрического тока на рост и ферментативную активность микроорганизмов активного ила [Текст] / Н. Г. Ткачук // Электронная обработка материалов. - 1978. - №4. - С. 78-79.
95. Толковый словарь (сборник электронных словарей) [Электронный ресурс]. - [2013]. - Режим доступа: <http://slovo.ru/index.php?a=&ID=45529&pg=56&s=%CE&w=%CE%CA%D1%C8%C4%C0%C7%DB>
96. Трунова, О. Н. Биологические факторы самоочищения водоёмов и сточных вод [Текст] / О. Н. Трунова. - Л.: Наука, 1979. - 109 с.
97. Туровский, И. С. Обработка осадков сточных вод / И. С. Туровский - М.: Стройиздат, 1984. - 134 с.
98. Уонд, Д. Ферментация и технология ферментов [Текст] / Д. Уонд, Ч. Коней, А. Демайн. - М.: Лёгкая и пищевая промышленность, 1983. - 35 с.
99. Федоровская, Т. Г. и др. Исследование процесса отстаивания сточных вод кожевенных заводов в схемах локальных очистных сооружениях [Текст] / Т. Г. Федоровская, М. А. Малаян, Л. М. Мухина // Сб. трудов МИСИ им. В. В. Куйбышева. Вопросы очистки сточных вод. - М.: МИСИ, 1980. - №175. - С. 129-133.
100. Федоровская, Т. Г. и др. Предварительная очистка сточных вод кожевенных заводов [Текст] / Т. Г. Федоровская, И. Н. Чурбанова, И. Н. Кудряшова. // Кожевенно-обувная промышленность, 1984. - №11. - С.9-14.
101. Флэрти, Ф. О. и др. Химия и технология кожи [Текст] / Ф. О. Флэрти, В. Т. Родди, Р. М. Поллэр // Подготовительные к дублению операции. - М.: Издательство научно-технической литературы РСФСР, 1960. - С. 56-63.
102. Форстер, К. Ф. Экологическая биотехнология [Текст]: пер. с англ. / Форстер, К. Ф., Вейза, Д. А.; под ред. Дымшица, В.А. - Л.: Химия, 1990. - 284 с.
103. Хамад, А. Т. Очистка сточных вод кожевенных заводов в условиях Ирака [Текст]: Дис....канд. техн. наук: 05.23.04: / Хамад Аммар Тамир. - М., 2004. - 93 с.

104. Хамид, Б. Х. Рекуперация хрома (Ш) и повторное использование хромосодержащих растворов производства [Текст]: автореф. дисс. ... канд. тех. наук / Б. Х. Хамид. - М., 1983 г. – 125 с.
105. Хенце, М. Очистка сточных вод. Биологические и химические процессы [Текст] / Хенце М. – 1993 г. – 122 с.
106. Хенце, М. Армоэс, П. Ля-Кур-Янсесен, Й. Арван Э. перевод с английского Массаловой Т.П. под редакцией Ключного С.В. Очистка сточных вод биохимические и химические процессы. – М.: Мир. 2006,- 480 с.
107. Цао, Ч.Х. Очистка сточных вод кожевенных заводов от соединений хрома [Текст]: автореф. дисс. ... канд. тех. наук / Ч. Х. Цао. - М., 1995. - 139 с.
108. Чурбанова, И. Н. и др. Очистка сточных вод кожзаводов от сульфидов [Текст] / И. Н. Чурбанова, Т. Г. Фёдоровская, И. Н. Кудряшова // Водоснабжение и канализация. - М. - б.и. – 1984. - С. 109-112.
109. Чурсин, В. И. Экологические аспекты нетрадиционных технологий [Текст] / В. И. Чурсин // Кожевенно-обувная промышленность, 1999. - №5. – С.42-43.
110. Шалбуев, Д. В. Практикум по оценке качества сточных вод на кожевенно-меховых предприятиях [Текст]: учебное пособие. / Д. В. Шалбуев – Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2006. – 77 с.
111. Шалбуев, Д. В. Экобиотехнологический метод переработки овчинно-шубного и пушно-мехового сырья [Текст] Дис....докт. техн. наук: 05.19.05: / Д. В. Шалбуев. – Улан-Удэ., 2010. - 369 с.
112. Шименович, В. С. Новый способ очистки кожевенных стоков [Текст] / В. С. Шименович // Кожевенно-обувная промышленность, 1999. - №6. – С. 26-31.
113. Щербаков, В. Н. Очистка и многократное использование сточных вод после золенин шкур на кожевенных заводах [Текст]: автореф. дисс. ... канд. тех. наук / В. Н. Щербаков - М., 1984. - 23с.
114. Яковлев, С. В. Биологическая очистка производственных сточных вод [Текст] / С. В. Яковлев и [др.]; под ред. С. В. Яковлева. - М.: Стройиздат, 1985. – 208 с.

115. Яковлев, С. В. Биологические процессы в очистке сточных вод [Текст] / С. В. Яковлев, Т. А. Карюхина – М.: Стройиздат, 1980. – 68 с.
116. Яковлев, С. В. и др. Очистка производственных сточных вод [Текст] / С. В. Яковлев, Я. А. Карелин, Ю. М. Ласков, Ю. В. Воронов - М.: Стройиздат, 1979. – 320 с.
117. Яковлев, С. В. Биохимические процессы при очистке сточных вод [Текст] / С. В. Яковлев. - М.: Стройиздат, 1980. - 200 с.
118. 2-Fluorophenol degradation by aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor / A. F. Duque, V. S. Bessa, M. F. Carvalho et al. // Water res. – 2011. – Vol. 45, N 20. – P. 6745-6752.
119. Barber J. etc. Electrical diffuse layers and their influence on photosynthetic process. / J. Barber, J. Mills, A. Love – FEBS Letters. – 1977. – v.74, №2. – p. 174-181.
120. Berg L. van den, Lentz C. P., Effects of Film Area-to-Volume Ratio, Film Support, Height and Direction of Flow on Performance of Methanogenic Fixed Film Reactors. In: Anaerobic Filters An Energy Plus for Wastewater Treatment, Proceedings of the Seminar/Workshop January 9-10 Florida, pp. 1-10 (1980). Argonne National Laboratory, Argonne, Illinois. (ANL/CNSV-TM-50).
121. Brain, D. J. etc. Kinetics of oxygenation of reduced sulfur species in aqueous solution / D. J. Brain, F. B. Brinker // J. Envir. Sci. And Tech., Vol.11, 1977. - №12. - p. 1114.
122. Caneda, F., Peters, R. Evaluation of chemical oxidation for hydrogen sulfide control // F. Caneda, R. J. Peters // Water Pollution Control Fed, Vol. 60, 2008. - №7. - p. 1269.
123. Chen, K.Y. Oxidation of sulfide by O₂: catalysts and inhabitation / K. Y. J. Chen // Sanitary inhabitation division, Vol. 98, 1972. - p. 215.
124. Dawood, Z.F. Recovery and reuse of some chemicals compound from tannery waste / Z. F. Dawood Msc. Thesis, University of Mosul, Iraq, 1979. – p. 312-315.
125. Degradation de composes traces organiques (CTO) au cours du traitement de boues urbaines par digestion anaerobie / E. Trably, D. Patureau, D. Batstone et al. // Eau, ind., nuisances. – 2005. – N 287. – P. 37-41. – Bibliogr.: 14 ref.

126. De, S.H. Some aspects of tannery effluent control / S. H. De Jour. Amer. Leather Chem. Ass, 1973. - №8. - p.316.
127. Dickenson, D. Practical waste treatment and disposal / D. Dickenson Applied science publisher LTD, London, 1974. - p. 171-185.
128. Dohnalek, D. A., Fitzpatrickm, J. A. The chemistry of reduced sulfur species and their removal from ground water supplies / D. A. Dohnalek, J. A. Fitzpatrickm J.A. // J. AWWA, Vol.75. – 2005. - №6. - p.298.
129. Eckenfelder, W. W. Industrial water pollution control / W.W. Eckenfelder McGraw-Hill Company, New York, 1966. – p. 432.
130. Eye D. Literature review of tannery wastewater / D. Eye J. Water Pollution Control Fed, 1974. - №6. - p. 1283.
131. Fluorochemical mass flows in a municipal wastewater treatment facility / M. M. Schultz, C. P. Higgins, C. A. Huset et al. // Environ. sci. a. technol. – 2006. – Vol. 40, N 23. – P. 7350-7357.
132. Folachier, A., Sanejouand, H. La pollution due aux compos'es toxiques et aux sels dissous / A. Folachier, H. Sanejouand // Technicuir, 10, 1976. - №8. - p. 134.
133. Jewell, W. J. etc. Municipal Wastewater Treatment with the Anaerobic Attached Microbial Film Expanded Bed Process. / W. J. Jewell, M. S. Svntzenbaum, J. W. Morris // J.WPCF, 53. – 2011. - 482-490.
134. Giles, M. Chemical treatment solves tannery waste problems / M. Giles // Industrial Wastes, Vol. 26. – 2010. - №2. - p.30-31.
135. Gills, H. Bacteriology of Activated Sludge / H. Gills // Res. Inst. for Publ. Health Eng. The Netherlands. – 1964. - № 32. – p. 41-42.
136. Hill, T.L. Some possible biologic effects of an electric field activy on nucleic acids or proteins. / T. L. Hill – London, 1957. – 150 p.
137. Kiman, R. N. Treatment of tannery wastewater from Bona Allen Inc., Buford, Georgia / R. N. Kiman // Jour. Amer. Leather Chem. Ass., 1973. - №8. - p.308.
138. Lighthart, B., Loew, G.A. Identification key for bacteria clusters from an activated sludge plant. / B. Lighthart, G. A. Loew – JWPCF. - 1972. – N 11. – p. 44.
139. Lighthart, B., Oglessly, R.T. Bacteriology of an activated sludge wastewater

- treatment plant – a guide to methodology. / B. Lighthart, R. T. Oglesly – JWPCF – 1969.– N 8. – p. 41.
140. Maeda, Y. Preliminary studies on treatment of chromium tannery waste sludge by anaerobic digestion / Y. J. Maeda Fermentation tech., Vol. 62. - 2014. - №5. - p.421.
141. Magnetic particles and new incentives to use of immobilization // Bioprocess Technol. – 2007. – V. 9, № 4. – P.7.
142. Nandy T. and others Waste water management in cluster of tanneries in Tamil Nadu through implementation of common efficient treatment plans / T. Nandy and others // J. Sci. And. Res., 2009. - №7. - p. 475-516.
143. Refling, D. R. etc. Advanced biological treatment of tannery wastewater / D. R. Refling, M. G. Biesinger, L. K. Barber // Industrial wastes, Vol. 27. – 2011. - №3. – p. 16-18.
144. Roets, S. D. A system developed for the treatment of tanning and others proteinaceous effluents / S. D. Roets // Wat. Sci. Tech., 2012. - Vol. 14. - p. 1547-1548.
145. Samlie, T. Package effluent treatment plant for tannery wastewater / T. Samlie // Chemical engineering, vol.18. – 2013. - №11. - p.85-88.
146. Shodo, M. Effect of high magnetic field on microbial growth / M. Shodo // J. Radiat. Res. – 2005. – 36, № 4. – p. 282.
147. Sieler, H., Busse, M. Die Flora analyse in biolodischen Kläranlagen und deren Aussage / H. Sieler, M. Busse – Wasser – und Abwasser – Forsch., - 1978. – 11. – N 3 – 4.
148. Sreeram, K.J. etc. Use of hydrogen peroxide for tannery waste water treatment / K. J. Sreeram and others // J. Sci. And Ind. Res. 1998. - № 2. - p. 64-69.
149. Train, R. E. Quality criteria for water / R. E. Train Castle house publication ltd. - London, 1979. – p. 235-240.
150. Viessman, W., Hammer, J. Water supply and pollution control / W. Viessman, J. Hammer Harper international edition. - New York, 1985. – p. 267-271.
151. Vlimmeren, P. New development in the line sulfide unhearing process improve the quality of tannery wastewater / P. Vlimmeren XIV-congress, Barcelona, 1978. – p. 222-225.

152. Volpe P. etc. Cell membrane lipid molecular dynamics in a solenoid versus a magnetically shielded room. / P. Volpe, T. Parasassi, C. Espito, G. Ravagnan, A. M. Giusti, A. Pascuarelli, T. Eremenko – Bioelectromagnetics. - 1998. - 19, №2. - P. 107 – 111.
153. Wilmot, P.D. etc. Kinetics of sulfide oxidation by dissolved oxygen / P. D. Wilmot etc. // J. Water Pollution Control Fed. - Vol. 60. – 1988. - №7. - p. 1246.
154. Xu Wei-jun Очистка сточных вод производства полимерного кремния / Xu Wei-jun, Gao Fan, Wang Jia-de // Zhongguo jishui paishui = China water a. wastewater. – 2012. – Vol. 28, N 20. – P. 129-132. – Bibliogr.: 8 ref. – Кит. яз.
155. Zhang Chao-jie Изучение аэробной биodeградации фторфенолов / Zhang Chao-jie, Zhou Qi, Sun Xiao-yu // Fudan xuebao. Ziran kexue ban = J. Fudan univ. natur. sci. – 2004. – Vol. 43, N 6. – P. 1102-1106. – Bibliogr.: 13 ref. – Кит. яз.

Список иллюстративного материала

Таблица 1. Санитарно-химический состав сточных вод основных процессов кожевенного производства - стр. 14-15.

Рисунок 1. Отстойники горизонтального типа - стр. 23.

Рисунок 2. Схема биофильтра - стр. 33.

Рисунок 3. Аэротенк для очистки промышленных и бытовых сточных вод на острове Голодный Волгоградской области - стр. 37.

Таблица 2. Культурные и морфологические свойства выделенных бактериальных штаммов - стр. 47.

Рисунок 4. Оптическая плотность взвесей биомассы трех штаммов выделенных микроорганизмов - стр. 48.

Рисунок 5. Накопление биомассы бактериальными штаммами в средах с различным содержанием белкового гидролизата - стр. 49.

Рисунок 6. Колонии штамма на плотной питательной среде (x 120) - стр. 50.

Рисунок 7. Край колонии бактериального штамма (x 120) - стр. 51.

Рисунок 8. Результаты окраски по Грамму выделенного бактериального штамма (x 1350) - стр. 51.

Рисунок 9. Окраска спор по методу Ожешко (x 1350) - стр. 52.

Рисунок 10. Липидоокисляющая активность штамма *B.subtilis* ВГТУ5 - стр. 54.

Рисунок 11. Урожайность культуры *B.subtilis* ВГТУ5 в средах, содержащих животный жир - стр. 55.

Таблица 3. Оценка накопления биомассы тремя клонами культуры *B.subtilis* ВГТУ5 после обработки ультрафиолетовым облучением - стр. 56.

Рисунок 12. Альгинатные магнитные сорбенты. - стр. 62.

Таблица 4. Результаты нескольких циклов выращивания иммобилизованных клеток *B.subtilis* ВГТУ5 в жидкой питательной среде - стр. 63.

Рисунок 13. Установка для изучения влияния электромагнитного поля различной напряженности на микроорганизмы - стр. 64.

Таблица 5. Воздействие электромагнитного поля на клетки штамма *Bacillus* sp. ТУ5 - стр. 65.

Таблица 6. Урожайность биомассы при культивировании иммобилизованной бактериальной культуры *B.subtilis* ВГТУ5 в ЭМП - стр. 66.

Рисунок 14. Результаты изучения влияния источников минерального питания на рост бактериальных клеток - стр. 67.

Таблица 7. Состав бишофита Приволжской моноклинали - стр. 68

Таблица 8. Состав солевой рапы озера Эльтон - стр. 69.

Таблица 9. Компонентный состав солей Мертвого моря - стр. 70.

Рисунок 15. Зависимость оптической плотности суспензии бактерий (D) от концентрации бишофита (C) - стр. 71.

Рисунок 16. Зависимость оптической плотности суспензии бактерий (D) от концентрации солевой рапы озера Эльтон (C) - стр. 71.

Рисунок 17. Зависимость оптической плотности суспензии бактерий (D) от концентрации соли Мертвого моря (C) - стр. 72.

Рисунок 18. Наибольшие значения оптической плотности биомассы бактерий *B.subtilis* ВГТУ5 на средах с минеральными добавками – стр. 73.

Рисунок 19. Зависимость оптической плотности суспензии клеток от концентрации бишофита – стр. 74.

Рисунок 20. Зависимость оптической плотности суспензии клеток от концентрации солевой рапы озера Эльтон – стр. 75.

Рисунок 21. Зависимость оптической плотности суспензии клеток от концентрации солей Мертвого моря – стр. 77.

Таблица 10. Результаты лабораторного моделирования очистки сточной воды в стационарных условиях с помощью биопрепарата *B. subtilis* ВГТУ5 - стр. 79.

Рисунок 22. Динамика роста биопрепарата *B. subtilis* ВГТУ5 при глубинном культивировании - стр. 80.

Рисунок 23. Динамика роста бактериального биопрепарата в сточной воде при глубинном аппаратном культивировании - стр. 81.

Рисунок 24. Динамика рН при глубинном культивировании штамма *B. subtilis* ВГТУ5 в сточной воде - стр. 82.

Рисунок 25. Зависимость оптической плотности суспензии клеток от времени глубинного культивирования биопрепарата - стр. 83.

Рисунок 26. Зависимость концентрации клеток от времени глубинного культивирования биопрепарата - стр. 84.

Рисунок 27. Зависимость рН сточной воды от времени культивирования биопрепарата - стр. 86.

Таблица 11. Соотношение трудоёмкости этапов НИР - стр. 89.

Таблица 12. План-график выполнения НИР - стр. 89.

Таблица 13. Соотношение трудоёмкости этапов НИР для категорий исполнителей - стр. 90.

Таблица 14. Остаточная стоимость оборудования - стр. 91.

Таблица 15. Затраты на сырье и материалы - стр. 92.

Таблица 16. Затраты на электроэнергию - стр. 93.

Таблица 17. Стоимость посуды - стр. 94.

Таблица 18. Амортизационные отчисления оборудования - стр. 96.

Таблица 19. Смета расходов по НИР - стр. 97.

Таблица 20. Энергетические расходы - стр. 101.

Таблица 21. Расходы на энергоресурсы - стр. 101.

Таблица 22. Расчет эксплуатационных расходов оборудования с учетом использования биопрепарата - стр. 103.

Таблица 23. Оценка результатов НИР - стр. 105.