

УДК 628.15

А. В. Игнатенко

Белорусский государственный технологический университет

**МЕТОД ПРОБОПОДГОТОВКИ И БИОТЕСТИРОВАНИЯ ТОКСИЧНОСТИ
ОСАДКОВ СТОЧНЫХ ВОД**

В работе изучено использование амфотерного биоПАВ желчи для перевода токсичных веществ, связанных с иловыми осадками сточных вод, в доступную для биотестирования водную форму.

Определены отдельные физико-химические показатели водных растворов желчи и желчных вытяжек осадков сточных вод, а также индексы их токсичности для тест-культуры клеток микроводоросли *Euglena gracilis*.

Полученные результаты указывают на хорошие эмульгирующие и солюбилизирующие свойства желчи и возможность ее использования при пробоподготовке ОСВ для удаления гидрофобных загрязнителей и биотестирования их токсичности.

Оценка влияния желчи на выживаемость микроводоросли *E. gracilis* показала, что данное биоПАВ не оказывает токсичного действия на тест-культуру клеток при концентрации ниже 1,0%. Это позволяет использовать желчь для биотестирования токсичности желчных вытяжек осадков сточных вод.

Предложен упрощенный метод обработки осадков сточных вод, основанный на использовании желчи в качестве солюбилизатора гидрофобных токсичных веществ, связанных с поверхностью осадков. Он позволяет упростить пробоподготовку осадков для биотестирования их токсичности и сократить ее длительность до 2 ч.

Ключевые слова: осадки сточных вод, пробоподготовка, желчь, свойства, желчные вытяжки, биотестирование, токсичность.

A. V. Ignatenko

Belarusian State Technological University

**METHOD OF SAMPLE PREPARATION AND SEWAGE SLUDGE WASTES
TOXICITY BIOTESTING**

The paper studies the use of amphoteric bile surfactant for the transfer of toxic substances associated with sewage sludge sediments into an aqueous form available for biotesting.

Some physical and chemical properties of bile aquatic solutions and bile extracts from sewage sludge sediments were estimated. It were also determined their toxicity indexes for microalgae cells test-culture *Euglena gracilis*.

The obtained results indicate good emulsifying and solubilizing properties of bile and the possibility of its use in the sample preparation of sewage sludge sediments for the removal of hydrophobic pollutants and biotesting their toxicity.

Evaluation of the effect of bile action on the survival of microalgae *E. gracilis* showed that this surfactant does not have a toxic effect on test culture of cells at concentrations below 1.0%. This allows the use of bile for biotesting the toxicity of bile extracts of sewage sludge.

A simplified method of treatment of sewage sludge with bile as a solubilizer of hydrophobic toxic substances associated with the sediment surface is proposed. It allows to simplify sample preparation of sediments for biotesting their toxicity and reduce its duration to 2 hours.

Key words: sewage sludge sediments, samples preparation, bile, properties, bile extracts, biotesting, toxicity.

Введение. В результате работы городских очистных сооружений в Республике Беларусь ежегодно накапливается свыше 100 тыс. т неиспользуемых осадков сточных вод, и 9,5 млн. т их находится на иловых площадках очистных сооружений, загрязняя окружающую среду [1]. Только в малых городах, имеющих городские очистные сооружения и не содержащих крупных промышленных предприятий, загрязняющих сточные воды, уровень токсичности

осадков сточных вод (ОСВ) позволяет их использовать для получения удобрений, выработки биогаза или на кормовые нужды [2].

Применение иловых ОСВ в качестве удобрений и для получения кормов требует обязательного постоянного контроля их химической и биологической безопасности.

ОСВ представляют собой сложную многокомпонентную систему, содержащую одновременно до 500 видов различных соединений,

среди которых примерно десятую часть составляют опасные вещества.

Для их контроля необходимо использование целого ряда методов физико-химического, микробиологического и биологического анализа.

Не весь перечень опасных веществ нормируется и контролируется на практике из-за отсутствия простых и дешевых методов контроля.

Инструментальный физико-химический анализ каждого опасного компонента дорог, что делает контроль всех показателей безопасности ОСВ данными методами экономически невыгодным.

В качестве альтернативы физико-химическим методам анализа могут быть использованы методы биотестирования ОСВ, позволяющие в принципе решить проблему контроля их химической безопасности с минимальными затратами и максимальной гарантией безвредности осадков.

Методы биотестирования широко используются у нас в стране и за рубежом для контроля водных сред, однако для анализа ОСВ, почв их применение все еще ограничено. Это связано с тем, что большинство токсичных веществ в ОСВ или почвах находится в связанном состоянии и слабо доступны тест-культурам.

Для увеличения их доступности могут быть использованы различные поверхностно активные вещества (ПАВ). При удалении гидрофобных загрязнителей с поверхности ОСВ могут применяться ПАВ как синтетической природы (СПАВ), так и биогенного происхождения (биоПАВ).

Недостатком СПАВ является их повышенная токсичность для тест-культур. ПДК СПАВ составляет 0,1–0,5 мг/дм³ [3]. В этой связи для пробоподготовки и биотестирования ОСВ более целесообразно использовать биоПАВ.

Одним из таких биоПАВ может быть желчь. Она является биогенным амфотерным ПАВ животных организмов, участвующим в процессах эмульгирования, транспорта и ферментативного расщепления жировых веществ [4].

В данной работе проверена возможность использования биоПАВ желчи для перевода связанных токсичных веществ ОСВ в доступную для биотестирования форму.

Основная часть. Цель работы – разработка экспресс-метода пробоподготовки для биотестирования токсичности ОСВ.

В работе применяли следующее оборудование: муфельную печь ШОЛ-1.6 2.5 1/1, термостат суховоздушный ТС-80М-2, центрифугу Hettich модель ЕВА-2, фильтродержатель Swinnex Millipore, мембранные фильтры Millipore HAWG047S6 с размером пор 0,45 мкм, микроскоп ЛЮМО ЕС P11, аналитические весы Sartorius CPA225D, СВЧ-печь Samsung CE935GR, автоматические дозаторы

жидкости АW-2-2000. Измерение рН растворов выполняли на рН-метре Hanna рН 211.

В качестве объектов исследования служили: избыточный активный ил Минской очистной станции (МОС-1), отобранный из илоприемника; препараты сухой желчи крупного рогатого скота (производитель ФБУН ГНЦ ПМБ Оболенск, РФ).

Поверхностное натяжение растворов желчи (0,01–1,00%) определяли методом отрыва капель [5] при (20 ± 1)°С и вычисляли силу поверхностного натяжения водных растворов по формуле

$$\bar{b}_ж = \bar{b}_в \cdot n_в \cdot \rho_ж / \rho_в \cdot n_ж,$$

где $\bar{b}_ж$ – поверхностное натяжение водного раствора желчи; $\bar{b}_в$ – поверхностное натяжение воды, равное 72,75 мН/м [6]; $n_в$ и $n_ж$ – число капель воды и желчи в фиксированном объеме 10 мл; $\rho_ж$, $\rho_в$ – плотности желчи и воды, определенные весовым методом.

Значение критической концентрации мицеллообразования (ККМ) желчи находили по изменению величины силы поверхностного натяжения ее водных растворов в зависимости от концентрации [6].

Пробоподготовку образцов ОСВ к биотестированию проводили в соответствии с [7]. Для выделения слабо и прочно связанных токсичных веществ ОСВ использовали метод, основанный на получении водных вытяжек осадков, обработанных при 20, 100, 270, 550°С [7].

Для этого к 2 г образцов ОСВ добавляли 10 мл воды, выдерживали в течение 1 ч при 20, 100°С, после чего образцы центрифугировали 10 мин при 6000 об./мин.

Далее осадок высушивали до постоянной массы при 105°С и обрабатывали при 270°С, а затем при 550°С в течение 2 ч.

Из полученных образцов готовили водные вытяжки, которые, как и образцы, обработанные при 20, 100°С, использовали для биотестирования их токсичности.

В модифицированном варианте метода к 2 г образцов ОСВ добавляли 10 мл 0,1%-ной желчи, выдерживали в течение 1 ч при 20°С и 0,5 ч при 100°С в закрытых емкостях, после чего образцы фильтровали через микропористый мембранный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм и биотестировали фильтрат на токсичность.

Биотестирование токсичности вытяжек из ОСВ проводили по изменению выживаемости клеток *E. gracilis*, как описано ранее [7].

Полученные результаты обрабатывали статистически, используя программное обеспечение Microsoft Excel.

Химический состав и содержание основных веществ желчи приведены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, основным компонентом желчи являются желчные кислоты и холестерин.

Таблица 1
Состав и содержание сухой желчи

Состав желчи	Содержание компонентов желчи, %
Желчные кислоты и их соли	89,6
Фосфолипиды	2,3
Холестерин	7,2
Желчные пигменты	0,9

По своей химической природе желчные кислоты, как и холестерин, принадлежат к стероидным соединениям, различающимся степенью гидрофобности.

Желчные кислоты являются производными холановой кислоты ($C_{23}H_{39}COOH$), к кольцевой структуре которой присоединены одна, две или три гидроксильные группы.

Желчные кислоты способны эмульгировать жиры и жироподобные вещества и формировать простые сферические мицеллы, а также образовывать комплексы с металлами.

Фосфолипиды в основном представлены лецитином, способным образовывать везикулы с холестерином. Благодаря из взаимодействию с желчными кислотами эмульгирующие и солюбилизирующие свойства желчи усиливаются.

К желчным пигментам относятся билирубин и биливердин, которые определяют цвет желчи.

Основную роль в процессах диспергирования и эмульгирования жиров играют соли желчных кислот, лецитин, холестерин, обладающие амфотерными поверхностно активными свойствами. В этой связи желчь представляет собой ассоциат биоПАВ, способный образовывать смешанные мицеллы, участвующие в процессе солюбилизации жироподобных веществ [4].

На первом этапе работы была проведена оценка поверхностно-активных свойств используемой желчи. Как известно, к основным физико-химическим свойствам коллоидных ПАВ относятся [6]:

- 1) поверхностная активность;
- 2) способность к самопроизвольному мицеллообразованию при концентрациях выше ККМ;
- 3) способность к солюбилизации веществ.

Для определения поверхностной активности водных растворов желчи использовали метод отрыва капель [5].

На рис. 1 приведена изотерма изменения $\sigma_{ж}$ в зависимости от концентрации желчи в растворе при $(20 \pm 1)^\circ C$.

Снижение силы поверхностного натяжения с ростом концентрации вещества является отличительным признаком всех ПАВ.

Как видно из рис. 1, желчь проявляет характерные свойства ПАВ. Сила поверхностного натяжения ее водных растворов снижается

с увеличением концентрации и для 1%-ного раствора достигает значений 27,6 мН/м.

Величина тангенса угла наклона зависимости $\sigma_{ж}$ от $C_{ж}$ на начальном участке (рис. 1) характеризует поверхностную активность желчи, проявляющуюся уже при концентрации 0,01%. Это обеспечивает желчи хорошие эмульгирующие свойства по сравнению с другими ПАВ.

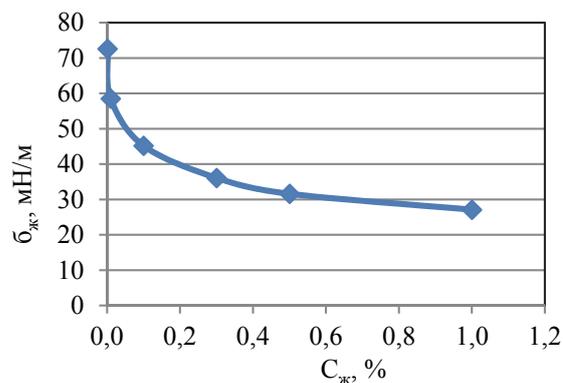


Рис. 1. Изотерма изменения силы поверхностного натяжения водных растворов желчи в зависимости от ее концентрации

Важным физико-химическим показателем коллоидной устойчивости ПАВ является значение критической концентрации мицеллообразования. Величину ККМ можно получить по точке излома зависимости $\sigma_{ж}$ от $\ln C_{ж}$ (рис. 2).

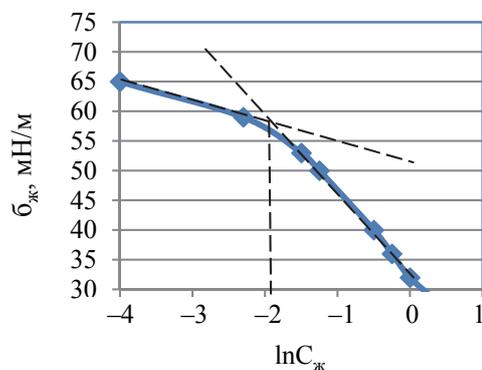


Рис. 2. Изотермы изменения силы поверхностного натяжения водных растворов желчи в полулогарифмических координатах

Как видно из рис. 2, величина ККМ желчи составила 0,1%. Из смысла значения ККМ следует, что при концентрациях ниже ККМ желчь находится в молекулярной форме, а при больших – в мицеллярной форме.

Полученные значения ККМ желчи ниже, чем для однокомпонентных ПАВ, для которых данная величина изменяется от 0,5 до 5,0% [8], что указывает на ее хорошие диспергирующие и солюбилизирующие свойства.

Для проверки способности желчи удалять связанные загрязнители ОСВ изучили изменение силы поверхностного натяжения вытяжек после обработки ОСВ желчью в концентрациях 0,0–1,0% (рис. 3).

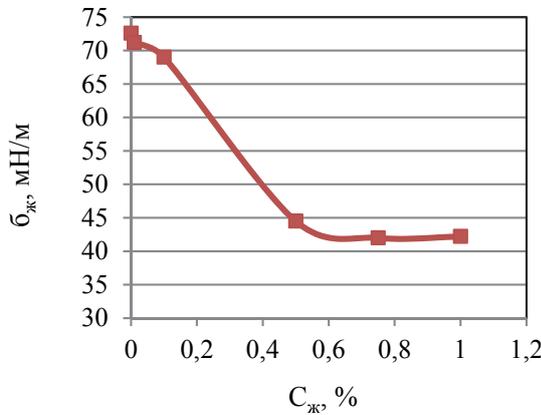


Рис. 3. Изотерма изменения силы поверхностного натяжения желчных вытяжек из ОСВ в зависимости от концентрации желчи

Как видно из рис. 3, наблюдается снижение поверхностной активности водно-желчных вытяжек из ОСВ, а также увеличение ККМ заполненных желчных мицелл, о чем свидетельствует изменение минимального значения $\sigma_{ж}$ от 27,6 до 42,0 мН/м и смещение величины ККМ от 0,1 до 0,5% по сравнению с чистой желчью (рис. 1).

Наблюдаемые изменения могут быть вызваны увеличением размеров мицелл.

При взаимодействии молекул желчи со связанными гидрофобными соединениями на поверхности ОСВ молекулы биоПАВ встраиваются в них, что вызывает снижение силы поверхностного натяжения и энергии связи веществ с поверхностью. Это способствует переходу гидрофобных токсичных веществ из связанного с ОСВ состояния в водную среду.

Включение десорбированных загрязнителей в ядро желчных мицелл приводит к увеличению их размеров, росту величины ККМ и снижению поверхностной активности заполненных мицелл.

Солюбилизация желчными мицеллами гидрофобных загрязнителей ОСВ облегчает их взаимодействие с мембранами клеток, что может усиливать токсичное действие десорбированных веществ.

При биотестировании токсичности желчных вытяжек важным является отсутствие влияния самой желчи на тест-культуру клеток.

Для проверки токсичных свойств желчи изучили влияние ее 0–1%-ных водных растворов на индекс выживаемости (ИВ) клеток *E. gracilis*. Полученные результаты приведены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, для клеток тест-культуры токсичность желчи проявляется при

концентрациях 1%, учитывая, что минимальным значением уровня токсичности образцов при биотестировании служит величина, превышающая ИВ = 10% [7].

Таблица 2

Изменение индекса токсичности от концентрации желчи для клеток *E. gracilis*

Концентрация желчи, %	T, %
1,0	12,0 ± 1,5
0,1	6,0 ± 0,7
0,01	2,3 ± 0,2

Для эффективности удаления желчью токсичных веществ существенное значение может иметь температура обработки ОСВ. Для учета ее влияния были определены индексы токсичности водных и желчных вытяжек для клеток *E. gracilis* при различных режимах термообработки ОСВ. Полученные результаты приведены на рис. 4.

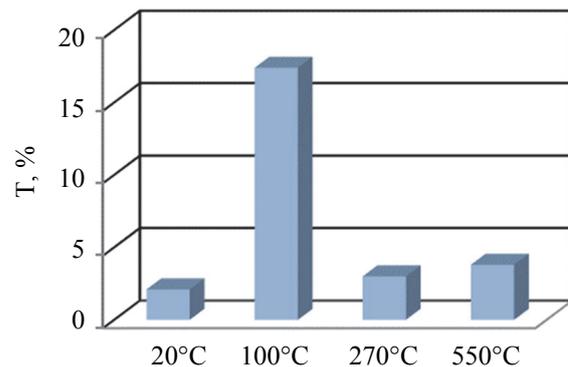


Рис. 4. Токсичность водных вытяжек из ОСВ, обработанных при 20, 100, 270, 550°C

Критерием выбора наилучшего режима прободготовки служил максимальный выход токсичных веществ из ОСВ. Как видно из рис. 4, токсичность водных вытяжек ОСВ, полученных при 20°C, была незначительной и увеличивалась почти на порядок после обработки при 100°C.

Низкая токсичность фракций, полученных после обработки при 270 и 550°C, указывает на невысокое содержание прочно связанных токсичных веществ в данных ОСВ.

На рис. 5 приведены результаты определения средних значений величин токсичности желчных вытяжек для тех же ОСВ.

Как видно из рис. 5, желчь обеспечивает в 6 раз больший выход токсичных веществ при 20°C, чем вода (рис. 4). Благодаря амфотерным свойствам желчи основная доля токсичных веществ снималась с ОСВ данным биоПАВ уже при 20°C.

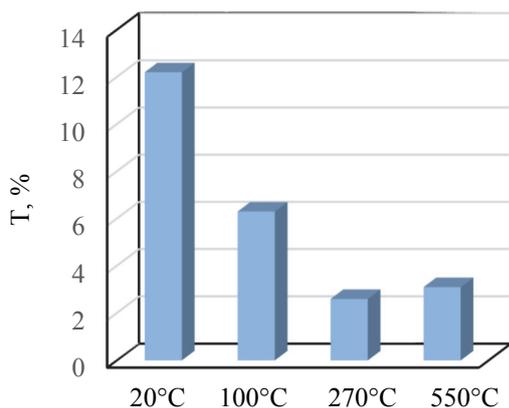


Рис. 5. Токсичность желчных вытяжек ($C_{ж} = 0,1\%$) ОСВ, обработанных при 20, 100, 270, 550°C

С повышением температуры обработки до 100°C (рис. 5) уровень токсичности желчных вытяжек снижался, в отличие от водных экстрактов (рис. 4).

Как видно из рис. 4 и 5, основная доля токсичных веществ снималась с ОСВ при обработке водой и желчью при 20 и 100°C.

Дальнейшая обработка ОСВ желчью при 270, 550°C не приводила к существенному изменению индекса токсичности желчных вытяжек по сравнению с водными экстрактами.

Общий выход токсичных веществ с желчью для данных ОСВ не изменялся по сравнению с водной вытяжкой, изменился только характер распределения тяжелых металлов между анализируемыми фракциями.

Разный характер изменения токсичности водных и желчных вытяжек указывает на то, что использованные ОСВ преимущественно загрязнены гидрофобными токсичными веществами.

Полученные результаты говорят о том, что для экспресс-анализа степени безопасности ОСВ достаточно выделения с вытяжками наиболее подвижных форм токсичных веществ, полученных при 20 и 100°C обработке ОСВ. Это позволяет сократить длительность пробоподготовки для биотестирования токсичности осадков сточных вод, загрязненных гидрофобной органикой, до 2 ч.

Заключение. В результате проведенной работы изучены физико-химические свойства

желчи и показана возможность ее использования как биоПАВ для пробоподготовки и биотестирования токсичности ОСВ.

Показано, что сильное снижение поверхностного натяжения воды и низкие значения ККМ способствуют отрыву гидрофобных загрязнителей с поверхности ОСВ и их сольubilизации внутри мицелл.

Величина ККМ для желчи составила 0,1%, а для желчных вытяжек ОСВ – 0,5% при $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$, что может быть связано с увеличением размеров желчных мицелл, содержащих гидрофобные загрязнители.

Анализ токсичных свойств желчи методом оценки выживаемости клеток показал, что желчь не оказывает токсичного действия на тест-культуру *E. gracilis* при концентрации до 1,0%. Это позволяет ее использовать для биотестирования токсичности желчных вытяжек ОСВ.

Опасность ОСВ в общем случае определяется присутствием в них связанных токсичных гидрофильных и гидрофобных веществ.

Водная вытяжка не всегда позволяет полностью выделить гидрофобные токсичные вещества из ОСВ.

Использование желчи дает возможность повысить выход токсичных веществ из ОСВ при низкотемпературной обработке.

В работе предложен метод пробоподготовки ОСВ, позволяющий перевести гидрофобные токсичные вещества, связанные с поверхностью ОСВ, в доступную для биотестирования водную фазу.

Наблюдаемое повышение токсичности гидрофобных веществ в мицеллярном состоянии показывает, что в таком виде они могут легче встраиваться в цитоплазматическую мембрану или проникать внутрь клеток, где способны оказывать повреждающее действие на живые организмы.

Использование последовательной термообработки ОСВ при 20, 100, 270, 550°C, экстракции токсичных веществ водой и желчью и биотестирование образцов показали, что основная доля гидрофобных и гидрофильных токсичных веществ удаляется из ОСВ при 20 и 100°C.

Это позволяет, используя упрощенную схему пробоподготовки ОСВ, сократить ее длительность в 2–3 раза.

Литература

1. Марцунь В. Н., Войтов И. В. Обращение с осадками очистных сооружений канализации в Республике Беларусь // Новые технологии рециклинга отходов производства и потребления: материалы докладов Международной научно-технической конференции, 19–21.10. 2016. Минск: БГТУ, 2016. С. 5–8.
2. Никовская Г. Н., Калининченко К. В. Биотехнология утилизации осадков муниципальных сточных вод // *Biotechnologia Acta*. 2014. Vol. 7, No. 3. P. 21–32.
3. ПДК химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования: ГН-2.1.5.1315-03. Введ. 15.06.2003 // Российская газета. № 119/1, 20.06.2003 (специальный выпуск).

4. Color Atlas of Physiology / A. Despopoulos [et al]. Thieme Medical Publishers, 2003. 432 p.
5. Савельев И. В. Курс общей физики. В 3 т. Т. 1. М.: Наука, 1987. 352 с.
6. Фридрихсберг Д. А. Курс коллоидной химии. Л.: Химия, 1984. 368 с.
7. Игнатенко А. В. Пробоподготовка и биотестирование токсичности иловых осадков сточных вод // Химическая безопасность. 2018. Т. 2, № 2. С. 251–271.
8. Русанов А. И. Мицеллообразование в растворах поверхностно-активных веществ: монография. СПб: Лань, 2016. 612 с.

References

1. Martsul' V. N., Voytov I. V. Handling sludge from sewage treatment plants in the Republic of Belarus. *Materialy dokladov mezhdunarodnoy nauchno-tekhnicheskoy konferentsii "Novye tekhnologii retsyklinga otkhodov proizvodstva i potrebleniya"* [Materials of scientific and practical conference "New technologies for recycling production and consumption waste"]. Minsk, BSTU Publ., 2016, pp. 5–8 (In Russian).
2. Nikovskaya G. N., Kalinichenko K. V. Biotechnology of municipal wastewater sludge disposal. *Biotechnologia Acta*, 2014, vol. 7, no. 3, pp. 21–32 (In Russian).
3. MPC of chemical substances in water of water objects of economic-drinking and cultural-household water use: GN-2.1.5.1315-03. *Rossiyskaya Gazeta* [Russian Newspaper], no. 119/1, 20.06.2003 (special issue) (In Russian).
4. Despopoulos A., Silbernagl S., Gay R., Rothenburger A. Color Atlas of Physiology. Thieme Medical Publishers, 2003. 432 p.
5. Savel'ev I. V. *Kurs obshchey fiziki. Tom 1* [Course of total physics. Vol. 1]. Moscow, Nauka Publ., 1987. 352 p.
6. Fridrikhsberg D. A. *Kurs kolloidnoy khimii* [Course of colloid chemistry]. Leningrad, Khimiya Publ., 1984. 368 p.
7. Ignatenko A. V. Sample preparation and biotesting of the toxicity of sewage sludge. *Khimicheskaya bezopasnost'* [Chemical safety], 2018, vol. 2, no. 2, pp. 251–271 (In Russian).
8. Rusanov A. I. *Mitselloobrazovanie v rastvorakh poverkhnostno-aktivnykh veshchestv: monografiya* [Micelle formation in solutions of surface-active substances: monograph]. St-Peterburg, Lan' Publ., 2016. 612 p.

Информация об авторе

Игнатенко Аркадий Васильевич – кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры биотехнологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: ignatenko_av @tut.by

Information about the author

Ignatenko Arkadiy Vasil'yevich – PhD (Biology), Associate Professor, Assistant Professor, the Department of Biotechnology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ignatenko_av@tut.by

Поступила 29.10.2019