

Введение Сегодня прикладная биотехнология характеризуется высокими темпами развития, что позволяет существенно интенсифицировать производство, повышать эффективность использования природных ресурсов, решать экологические проблемы, создавать новые источники энергии. Экобиотехнология сегодня дает новейший подход к охране и сохранению окружающей среды при совместном использовании достижений биологических и инженерных наук. Загрязнение гидросферы сегодня – один из наиболее острых вопросов экологии и проблем человечества. Интенсивное использование запасов пресной воды в промышленных и бытовых целях диктует необходимость разработки новых, более эффективных, усовершенствованных методов защиты гидросферы. Как известно, плотность частной застройки за последние десятилетия сильно увеличилась и, как следствие, возрос уровень загрязнения окружающей среды продуктами жизнедеятельности человека и промышленных сточных вод. Сегодня очистка сточных вод различного происхождения осуществляется в том числе с помощью сооружений биологической очистки.[1] Главенствующая роль в этом процессе принадлежит бактериям, количество которых варьирует от 10^6 до 10^{14} клеток на 1 г сухой биомассы. Повышение физиологической активности бактерий путем введения биологически активных веществ [2] или микроэлементов в очищаемую воду может значительно повысить скорость и эффективность процесса очистки [3]. Экспериментальная часть Рапа и бишофит являются природными источниками микроэлементов. Открытие залежей бишофита в Нижнем Поволжье (как по чистоте — $MgCl_2$ до 95-98%, так и по объемам запасов — около 500 млрд.т.) явилось уникальным событием. Волгоградский природный бишофит представляет собой спрессованный под высоким давлением вышележащих слоев камень. По химико-минеральному составу — это комплекс солей и микроэлементов (табл.1) [4].

Таблица 1 - Химический состав Волгоградского природного бишофита

Хим. формула	Содержание, % масс.
Хлористый магний $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	90-96
Хлористый калий-магний $KCl \cdot MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0,1-5,5
Сернокислый магний $MgSO_4 \cdot 6H_2O$	0,1-2,5
Бромистый магний $MgBr_2$	0,4-0,95
Сернокислый кальций $CaSO_4 \cdot 2H_2O$	0,1-0,7
Хлористый натрий $NaCl$	0,1-0,4
Бор	0,002-0,08
Кальций	0,003-0,005
Висмут	0,0005-0,001
Молибден	0,0001-0,0003
Железо	0,005-0,001
Мо	0,003-0,005
Алюминий	0,0001-0,0006
Титан	0,0001-0,0002
Медь	0,0001-0,0003
Al	0,001-0,02
Ti	0,005-0,001
Cu	0,0001-0,0003
Кремний	0,02-0,2
Барий	0,0001-0,0006
Si	0,001-0,02
Ba	0,0001-0,0002
Стронций	0,0001-0,0003
Рубидий	0,0001-0,0003
Цезий	0,0001-0,0003
Sr	0,0001-0,0003
Rb	0,0001-0,0003
Cs	0,0001-0,0003
Li	0,0001-0,0003

Состав бишофита определяет его применение в качестве возможного стимулятора роста микроорганизмов активного ила. Имеются данные о низком содержании наиболее опасных и распространенных пестицидов в бишофите данного месторождения, что предотвращает ингибирующее действие подобных веществ на жизнедеятельность микрофлоры сооружений биологической очистки. Для изучения влияния бишофита на рост микроорганизмов активного ила, использовали пробы воды, отобранные из

аэротенка городских очистных сооружений, расположенных на острове Голодный волгоградской области. Отработанную жидкость с хлопьями активного ила отстаивали для осаждения микроорганизмов и отбирали надосадочную жидкость. Надиловую жидкость засекали в жидкую питательную среду на основе пептона и D- глюкозы и культивировали при 37 °C в течение 20-24 часов. Полученную суспензию микроорганизмов использовали в эксперименте по выявлению действия бишофита на скорость роста микроорганизмов активного ила. Для подбора оптимальных концентраций бишофита, повышающих скорость роста микроорганизмов его разводили в дистиллированной воде в соотношении 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, а также применяли неразведенный бишофит. При проведении эксперимента в стерильные пробирки помещали 5 мл питательной среды, добавляли 0,1 мл соответствующего разведения бишофита и засекали по 0,1 мл суспензии микроорганизмов активного ила. В качестве контроля использовали питательную среду, засеянную исследуемыми микроорганизмами без добавления бишофита. Опытные и контрольные пробирки термостатировали при 37 °C в течение 20-24 часов и оценивали результаты, используя оптический метод определения концентрации биомассы. Сравнение интенсивности роста и накопления биомассы микроорганизмов в опытах и в контроле осуществляли на приборе КФК-2-УХЛ-4.2 при длине волны светофильтра 670 нм в кюветах с длиной оптического пути 5,065 мм. В качестве растворов сравнения использовали стерильную питательную среду, не засеянную микроорганизмами. Для оценки полученных данных рассчитывали коэффициент соотношения оптической плотности микробной суспензии в опыте и в контроле (К) и выражали его в процентах. В результате проведенных экспериментов была получена следующая зависимость (рис. 1):

Рис. 1 – Зависимость коэффициента прироста биомассы активного ила от разведения бишофита

Применение бишофита в качестве стимулятора ростовых процессов микроорганизмов активного ила не должно приводить к увеличению концентрации патогенных и условно - патогенных бактерий. Поэтому нами было изучено действие бишофита на скорость ростовых процессов санитарно – показательного микроорганизма - кишечной палочки. Полученные данные представлены ниже (рис. 2.)

Рис. 2- Влияние добавок бишофита на интенсивность роста бактерий E.coli

Ценным природным источником минералов и микроэлементов, необходимых для роста микроорганизмов, является рапа – вода минеральных соленых озер, лиманов, представляющая собой насыщенный раствор (рассол) концентрированных солей рапы (300-370г/л). Рапа озера Эльтон (Волгоградская область) относится к бромным крепким рассолам хлоридного и магниевона-натриевого состава. В рапе преобладают галит – около 56%, бишофит – около 29%, содержатся также кизерит, карналлит и др. соли. [5] Из катионов в рапе содержатся: литий, аммоний, калий, натрий, магний, кальций. Из анионов присутствуют хлорид,

бромид, сульфат, гидрокарбонат. Реакция среды рапы нейтральная ($\text{pH}=7,1$). Для получения стимулирующего рост бактерий активного ила эффекта в питательную среду на основе глюкозы и гидролизата казеина в качестве источников минерального питания добавляли различные концентрации рапы озера Эльтон. Полученные среды засеивали суспензией микроорганизмов активного ила, культивировали в течение суток и сравнивали скорость роста микроорганизмов при различных концентрациях рапы с ростом в контрольной среде. В качестве контрольной служила питательная среда, содержащая глюкозу, гидролизат казеина, хлорид натрия (0,5%) и гидрофосфат аммония (0,1%). Экспериментальные данные позволили получить зависимость интенсивности роста микроорганизмов активного ила (в % от контроля) от концентрации рапы в питательной среде (в% по объему) (рис.3). Нами была исследована возможность интенсификации бактериального штамма, выделенного из сточных вод кожевенного производства и идентифицированного как *Bacillus* sp.TY5 [6], путем добавления в питательную среду выше описанных минеральных компонентов: бишофита, рапы – и солей Мертвого моря. В лабораторных условиях выделенный штамм *Bacillus* sp.TY5 был подвергнут воздействию УФ- облучения (260 нм, 8 мин.) с целью получения клона с повышенной урожайностью. Рис. 3 – Зависимость интенсивности роста микроорганизмов активного ила в % от концентрации рапы в питательной среде

Сточные воды кожевенных заводов и меховых фабрик являются высококонцентрированными. Качественная характеристика этих вод и концентрация загрязнений в них зависят от вида производства, обрабатываемого сырья и принятой технологии выработки кож и меха. Санитарно-химический состав исследуемых сточных вод представлен ниже (мг/л): взвешенные частицы – 2730, сухой остаток – 6000, азот аммонийный – 120, жировые вещества – 330, хлориды – 2200, оксид хрома – 25, сульфаты - 930, сульфиды – 140, фенолы -20 [7]. На первом этапе исследования было изучено влияние различных компонентов на рост штамма *Bacillus* sp. TY5, в результате чего подобрана полусинтетическая питательная среда для культивирования указанных микроорганизмов. В ходе эксперимента готовили 6 питательных сред, из которых одна среда (далее №1 - контроль) имела полный состав, в остальных исключали один из компонентов, заменяя его на эквивалентные количества другим. Состав полной среды приведен ниже (г/л): глюкоза – 40; NH_4NO_3 -1,2; KH_2PO_4 – 0,8; MgSO_4 – 0,2; FeSO_4 – 0,04. Среда № 2 – NaCl вместо глюкозы; среда № 3 – исключен NH_4NO_3 , среда № 4 вместо KH_2PO_4 – KCl ; среда №5 - вместо MgSO_4 был добавлен NaH_2PO_4 ; среда №6 – вместо FeSO_4 был добавлен Na_2SO_4 . В подготовленные среды производили посев суспензии исследуемого бактериального штамма в количестве 0,1 мл с концентрацией 10^3 м.к./мл, выращивали в термостате при температуре 37 °C в течение 24 ч. Оценку интенсивности роста бактерий в средах различного состава производили путем

измерения оптической плотности полученных суспензий на приборе КФК-2-УХЛ-4.2 при длине волны светофильтра 670 нм в кюветах с длиной оптического пути 5,065 мм. В качестве растворов сравнения были использованы среды, не засеянные культурой. Результаты эксперимента представлены на рис. 4. Для исследования влияния минеральных добавок на интенсивность роста клона бактериального штамма *Bacillus* sp. TU5 были приготовлены полусинтетические питательные среды, в которые добавляли в качестве источника углерода - глюкозу (4% масс.), источника азота - нитрат аммония (1 % масс.) и природные минеральные добавки: бишофит (0,05% об.), солевая рапа озера Эльтон (5% об.) или соли Мертвого моря (5% масс.). Составы бишофита и солевой рапы оз. Эльтон приведены выше. Состав солей Мертвого моря значительно отличается от этих минеральных добавок: NaCl - 14-16%, KCl - 18-22%, MgCl₂ - 25-31%, CaCl₂ - 0,5-1%, бромиды - 0,2-0,3%, кристаллизационная вода - 26—32%, нерастворимые компоненты (железо, фтор) - 0,2% [8].

Рис. 4 - Подбор оптимальной среды для роста бактериального штамма *Bacillus* sp. TU5. С целью подбора оптимальной концентрации полусинтетические питательные среды в объеме 3 мл двукратно разводили стерильной дистиллированной водой в пяти пробирках и засеивали в них полученный мутантный штамм *Bacillus* sp. TU5. После 22 часов инкубации при 37 °C в пробирках оценивали уровень накопления биомассы фотокolorиметрическим методом. В качестве контроля использовали экспериментальную культуру, засеянную в питательную среду без добавления минеральных природных компонентов. Результаты эксперимента представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Изучение интенсивности роста мутантного клона *Bacillus* sp. TU5 в полусинтетических питательных средах с минеральными добавками

Минеральная добавка	Концентрация минеральной добавки, % (масс.)	Оптическая плотность, усл. ед.	% отклонения от контроля
Бишофит	0,05000	0,0000	-100,00
Бишофит	0,02500	0,0000	-100,00
Бишофит	0,01250	0,0067	-42,70
Бишофит	0,00625	0,0117	0,00
Бишофит	0,00313	0,0050	-57,30
Солевая рапа о.Эльтон	5,0000	0,0017	-85,50
Солевая рапа о.Эльтон	2,5000	0,0367	+213,70
Солевая рапа о.Эльтон	1,2500	0,0233	+99,10
Солевая рапа о.Эльтон	0,6250	0,0133	+13,70
Солевая рапа о.Эльтон	0,3125	0,0117	0,00
Соли Мертвого моря	5,0000	0,0000	-100,00
Соли Мертвого моря	2,5000	0,0067	-42,70
Соли Мертвого моря	1,2500	0,0167	+42,70
Соли Мертвого моря	0,6250	0,0183	+56,40
Соли Мертвого моря	0,3125	0,0133	+13,70
Контроль	-	0,0117	0,00

Результаты и обсуждение. Данные, полученные по приросту биомассы активного ила в зависимости от разведения бишофита, свидетельствуют о максимальной скорости накопления биомассы при разведении бишофита 1:4, т.е. при концентрации 0,38% (об.). Интенсивность роста микроорганизмов в этих условиях возрастает на 17,4 % по сравнению с контролем. Добавление неразведенного бишофита снижает скорость роста микроорганизмов на 14,5%, а использование низких концентраций бишофита практически не сказывается на скорости роста исследуемых бактерий активного ила. Результаты эксперимента по изучению влияния добавок бишофита на интенсивность роста бактерий *E.coli* показывают, что оптимальные для бактерий активного ила концентрации

бишофита практически не влияют на скорость роста бактерий группы кишечной палочки. Также было установлено, что 5%-ное содержание рапы оз. Эльтон в питательной среде стимулирует накопление биомассы микроорганизмов активного ила на 7,9% по сравнению с контрольной величиной. В результате проведенных исследований с высокопродуктивным мутантным клоном *Bacillus* sp. ТУ5 показана возможность интенсификации роста полученного штамма путем добавления в питательную среду природных минеральных компонентов: рапы оз. Эльтон и солей Мертвого моря. Подобраны оптимальные концентрации природных минеральных добавок, позволяющие повысить скорость роста мутантного штамма *Bacillus* sp. ТУ5. Добавление бишофита снижает показатели оптической плотности суспензии изучаемого микроорганизма, что свидетельствует о подавляющем воздействии хлорида магния - основного компонента бишофита. Данные по изучению интенсивности роста мутантного клона *Bacillus* sp. ТУ5 в полусинтетических питательных средах с минеральными добавками свидетельствуют, что добавление минеральных компонентов изменяет уровень накопления биомассы бактерий в жидкой питательной среде. Так, в питательной среде с солевой рапой оз. Эльтон превышение оптической плотности суспензии по сравнению с контролем составило 213%, в среде с солями Мертвого моря наибольшее отклонение в положительную сторону составило 56%, это позволяет сделать вывод о том, что природные компоненты данных полусинтетических сред способствуют интенсификации роста исследуемого бактериального штамма. Полученные результаты могут быть использованы для создания бактериального препарата и разработки технологии его получения и применения для эффективной очистки сточной воды кожевенных производств. Исследования, проведенные с целью интенсификации роста микроорганизмов активного ила при добавлении в него природных минеральных добавок (бишофита и рапы) - месторождения которых находятся на территории Волгоградской области - показывают возможность использования этих веществ для ускорения процессов утилизации органических загрязнителей сточных вод.