Утилизация и биодеградация отходов

УДК 628.38:615.9 DOI: 10.25514/CHS.2020.1.17005

Экспресс-метод пробоподготовки иловых осадков сточных вод и биотестирования их токсичности

А. В. Игнатенко

Белорусский государственный технологический университет, кафедра биотехнологии, г. Минск, Республика Беларусь, e-mail: ignatenko_av@tut.by

Поступила в редакцию: 20.04.2020 г., после доработки: 19.05.2020 г., принята в печать: 02.06.2020 г.

Аннотация – Проведен анализ эффективности использования биогенного поверхностно-активного вещества (биоПАВ) желчи для перевода связанных токсичных веществ иловых осадков сточных вод в водную форму и биотестирования токсичности их водных и желчных вытяжек. Определены физико-химические и биологические показатели водных растворов желчи и индекс их токсичности для клеток микроводоросли *Euglena gracilis*. Полученные результаты указывают на высокую поверхностную активность и хорошие солюбилизирующие свойства желчи, а также на отсутствие ее токсичности для тест культуры. Это позволяет использовать желчь для сокращения времени пробоподготовки осадков сточных вод, выделения из них гидрофобных загрязнителей и биотестирования их токсичности. Сравнительный анализ водных и желчных вытяжек осадков сточных вод показал, что биоПАВ увеличивает выход токсичных веществ из осадков в 6–8 раз по сравнению с водной вытяжкой. Наличие сильной прямой корреляционной связи между показателями токсичности проб, определенными по индексам выживаемости и подвижности клеток *E. gracilis* позволяет сократить длительность анализа токсичности осадков с 24 ч до 15 мин.

Ключевые слова: осадки сточных вод, пробоподготовка, желчь, желчные вытяжки, клетки *Euglena gracilis*, токсичность, биотестирование, экспресс-метод.

Express method for sample preparation and sewage sludge waste toxicity biotesting

Arkadiy V. Ignatenko

Belarusian State Technological University, Department of Biotechnology, Minsk, Republic of Belarus, e-mail: ignatenko_av@tut.by

Received: April 29, 2020, Revised: May 19, 2020, Accepted: June 2, 2020

Abstract – The paper analyzes an effectiveness of using a cattle bile as a biogenic surfactant for transferring bounded toxic substances of sewage sludge (SS) into the aqueous form, along with its use in bioassays for testing toxicity of SS aqueous and bile extracts. Physical, chemical and biological parameters of bile solutions (surface tension strength, critical micellar concentration, solubilizing capacity), and also bile toxicity index for the test culture of *E. gracilis* microalgae cells have been determined. The obtained results indicate a high surface activity and good solubilizing properties of bile which provides a possibility of its use in SS sample preparation, isolation of hydrophobic pollutants from the samples, and biotesting their toxicity. A benchmarking analysis of aqueous and bile extracts of

SS samples is carried out revealing an influence of bile on the survival and mobility of *E. gracilis* microalgae cells with the absence of toxic effect on the test culture at the bile concentration level of less than 1.0%. An assessment of toxicity level of bile extracts of SS at the bile concentration of 0.1% and 0.5% has revealed a 6–8 fold increase in the yield of toxic substances from SS as compared to the aqueous SS extracts. Overall, the results show a great potential for using bile for biotesting toxicity of SS. A strong correlation between the toxicity indicators of samples determined from the indices of the survival and mobility of *E. gracilis* cells makes it possible to reduce the duration of the SS toxicity bioassay from 24 h to 15 min.

Keywords: sewage sludge, sample preparation, cattle bile, bile extracts, toxicity, *Euglena gracilis* cells, bioassay, express-method.

ВВЕДЕНИЕ

Переработка и применение иловых осадков сточных вод очистных сооружений является актуальной эколого-биотехнологической задачей, решение которой позволит защитить окружающую среду от загрязнений и использовать дополнительные биоресурсы [1–3].

В настоящее время в результате работы очистных станций ежегодно во всем мире накапливаются сотни миллионов тонн осадков сточных вод (ОСВ), которые преимущественно депонируются в почву, выводя ее из использования на десятилетия и загрязняя окружающую среду.

ОСВ представляют собой сложную поликомпонентную систему, содержащую одновременно до 500 видов различных соединений, из которых примерно десятую часть представляют опасные вещества.

В нормативной документации нормируются только наиболее часто встречаемые и опасные соединения – тяжелые металлы, а также нефтепродукты, полихлорированные ароматические углеводороды, СПАВ, пестициды и другие гидрофобные вещества, плохо растворимые в водных средах и адсорбирующиеся на ОСВ.

Они слабо утилизируются микроорганизмами в анаэробных условиях, накапливаются в окружающей среде и могут, как и тяжелые металлы, мигрировать по пищевым цепям к человеку.

Несмотря на высокую опасность, ОСВ – это ценный сырьевой ресурс, широко применяемый за рубежом. В малых городах, имеющих городские очистные сооружения и не содержащих крупных промышленных предприятий, загрязняющих водную среду, уровень токсичности иловых осадков сточных вод позволяет после их обработки использовать ОСВ для получения органоминерального удобрения, выработки биогаза или для кормовых нужд.

Вместе с тем, бесконтрольное использование ОСВ в РФ в качестве удобрений в сельском хозяйстве, в лесопитомниках и садоводческих хозяйствах, для ремедиации почв или для получения кормов запрещено [4–6].

Применение ОСВ на практике требует обязательного постоянного контроля их химической и биологической безопасности. Для этого необходимо использование целого ряда методов физико-химического, микробиологического и биологического анализа.

Инструментальный физико-химический анализ каждого опасного загрязнителя дорог, что делает полный контроль безопасности ОСВ экономически невыгодным.

В качестве альтернативы физико-химическим методам анализа могут быть использованы методы биотестирования, позволяющие в принципе решить проблему контроля химической безопасности сред с минимальными затратами и максимальной гарантией их безвредности [7–9].

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

Знание уровня и природы токсичных веществ ОСВ позволит целенаправленно подбирать технологии их детоксикации и безопасного использования на практике.

Для увеличения доступности токсичных веществ тест-культурам могут быть использованы различные поверхностно-активные вещества (ПАВ). К ним предъявляется ряд требований: кроме высокой поверхностной активности и способности снижать поверхностное и межфазное натяжение до предельно низких значений, они должны обладать хорошей солюбилизирующей способностью, быть нетоксичными и биоразлагаемыми [10].

Целью данной работы являлась разработка экспресс-метода пробоподготовки и биотестирования токсичности осадков сточных вод и анализ эффективности использования желчи для перевода связанных токсичных веществ иловых осадков сточных вод в доступную для биотестирования форму.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы

Объект исследования – избыточный активный ил с влажностью 99%, отобранный из илоприемника Минской очистной станции-1. В качестве биоПАВ использовали желчь крупного рогатого скота (КРС) по ТУ 10.02.01.112-89 (РФ).

В работе применяли следующее оборудование: спектрофотометр Specord M-40 (Analytik Jena AG, Германия), центрифугу Hettich модель EBA-2 (Hettich, Германия), микровизор Levenhuk DTX 500 LCD (Levenhuk, США), аналитические весы Sartorius CPA225D (Sartorius AG, Германия), аквадистиллятор ДЭ-10М (ЭМО, РФ), одноканальные дозаторы Thermo Scientific Finnpipette F1 фиксированного объема 10-1000 мкл и наконечниками (Thermo Fisher Scientific, Финляндия). Значения pH растворов измеряли на pH-метре pH 211(Hanna Instruments, Германия).

Поверхностное натяжение растворов желчи (0,01–1,0%) определяли методом отрыва капель при 20 ± 1°C [11].

Величину силы поверхностного натяжения водных растворов желчи ($\sigma_ж$) вычисляли по формуле:

$$\sigma_ж = \sigma_в \cdot n_в \cdot \rho_ж / \rho_в \cdot n_ж \quad (1)$$

где $\sigma_ж$ – поверхностное натяжение водного раствора желчи; $\sigma_в$ – поверхностное натяжение воды, равное 72,75 мН/м [12]; $n_ж$ и $n_в$ – число капель желчи и воды в фиксированном объеме 10 мл; $\rho_ж$, $\rho_в$ – плотности желчи и воды, найденные весовым методом.

Значение критической концентрации мицеллообразования (ККМ) желчи находили по изменению величины силы поверхностного натяжения ее водных растворов в зависимости от концентрации [11].

Размеры мицелл определяли методом спектротурбодиметрии по Геллеру [13, 14].

В упрощенной схеме пробоподготовки ОСВ к 2 г образцов ОСВ добавляли по 10 мл воды или желчи (0,01–1,0%), выдерживали в течение 1 ч при 20°С, после чего образцы центрифугировали 10 мин при 6000 об./мин. Надосадочную жидкость использовали для измерения силы ее поверхностного натяжения, а также для анализа токсичности.

Тест-объектом при биотестировании токсичности проб служила 3-х суточная культура клеток микроводоросли *Euglena gracilis,* выращенная на свету при комнатной температуре в среде Лозино-Лозинского. Анализ безопасности водных и желчных вытяжек для тест-культуры *E. gracilis* проводили по изменению индексов выживаемости [15] и подвижности клеток, которую определяли из выражения:

$$\nu_{i\,(k)} = l / t_{i(k)}, \qquad (2)$$

где l – путь, мкм; $t_{i(k)}$ – время пробега фиксированного расстояния клетками в анализируемом (i) и контрольном (k) образцах, соответственно.

Усреднение показаний двигательной активности клеток проводили по n = 10 измерениям:

$$\bar{u} = \sum \nu_{i\,(k)} / n. \qquad (3)$$

Встроенная цифровая видеокамера и жидкокристаллический монитор, а также программное обеспечение микровизора позволяют производить фото- и видеозапись информации, подсчет окрашенных и неокрашенных микрообъектов, измерять линейные размеры и другие параметры изображений.

Полученные результаты обрабатывали статистически, используя программное обеспечение Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Характеристика поверхностно-активных свойств желчи

Для удаления гидрофобных загрязнителей ОСВ, могут применяться поверхностно-активные вещества (ПАВ), как синтетической природы (СПАВ), так и биогенного происхождения (биоПАВ).

Недостатком СПАВ является их повышенная токсичность для тест-культур. Предельно допустимая концентрация в воде водоема хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования для СПАВ составляет 0,5 мг/дм^3, для рыбохозяйственных целей – 0,1 мг/дм^3 [16].

В этой связи для пробоподготовки и биотестирования ОСВ более целесообразно применение биоПАВ, одним из которых служит желчь. Она является природным биоПАВ, используемым животными организмами для эмульгирования, транспорта и ферментативного расщепления жировых веществ [17]. Желчь способна связывать тяжелые металлы, а также обладает антимикробными свойствами и применяется в микробиологии для приготовления микробиологических питательных сред для подавления жизнедеятельности Гр(+)-микроорганизмов [18].

Химический состав и содержание компонентов желчи КРС приведены на рис. 1.

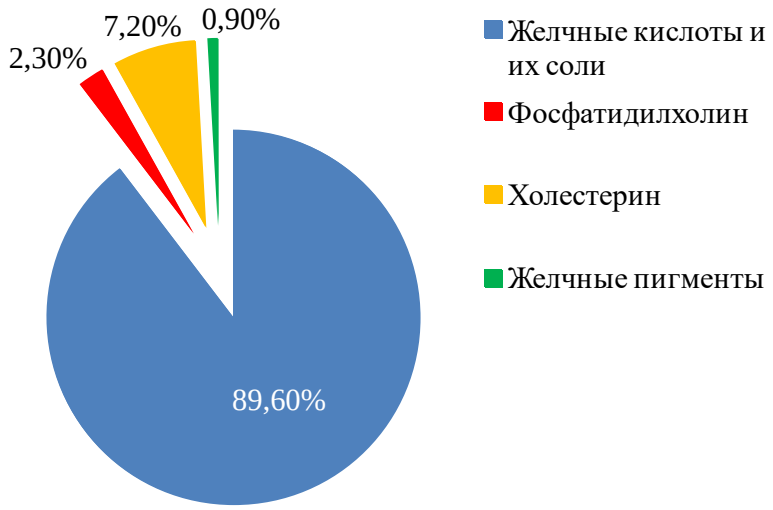

Рис. 1. Химический состав желчи КРС.
Fig. 1. Chemical composition of cattle bile.

Основным компонентом желчи являются желчные кислоты и их соли [18]. 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. Они способны эмульгировать жиры и жироподобные вещества, формировать простые сферические мицеллы, а также образовывать комплексы с металлами.

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

К желчным пигментам относятся билирубин и продукт его окисления биливердин, имеющие характерную полосу поглощения УФ-спектра в области $\lambda_{мах} = 450–460$ нм. Основную роль в процессах диспергирования и эмульгирования жиров играют: соли желчных кислот, лецитин, холестерин. Они обладают поверхностно-активными свойствами, в этой связи желчь представляет собой комплексное амфотерное коллоидное биоПАВ, образующее

смешанные мицеллы, участвующие в процессе солюбилизации жироподобных веществ.

Как известно, к основным физико-химическим свойствам коллоидных ПАВ относятся: сила поверхностного натяжения, поверхностная активность; способность к самопроизвольному мицеллообразованию; способность к солюбилизации гидрофобных веществ [11, 20].

На первом этапе работы была проведена оценка поверхностно-активных свойств используемой желчи. Для этого определяли силу поверхностного натяжения водных растворов данного биоПАВ методом отрыва капель. На рис. 2 приведена изотерма изменения силы поверхностного натяжения желчи в зависимости от ее концентрации при 20 ± 1°С.

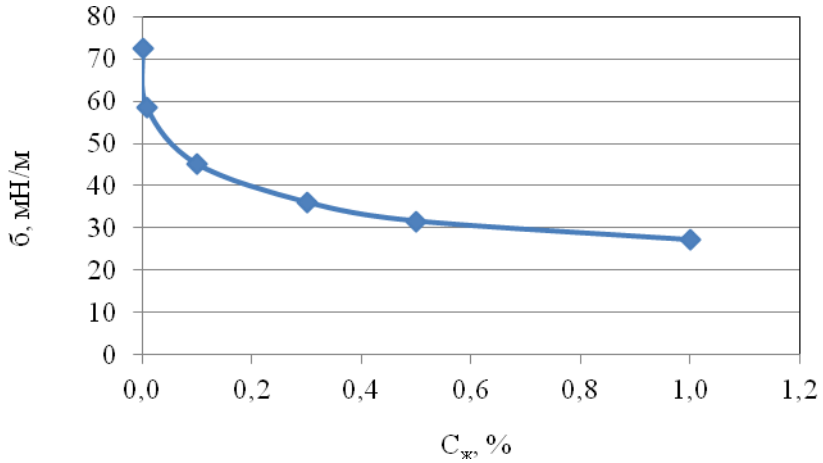

***Рис.* 2.** Изотерма изменения силы поверхностного натяжения (σ) водных растворов желчи в зависимости от ее концентрации.
Fig. 2. Isotherm of changes in surface tension of aqueous solutions of bile (σ), depending on bile concentration.

Как видно из рис. 2, желчь проявляет характерные свойства ПАВ. Сила поверхностного натяжения ее водных растворов снижается с увеличением концентрации желчи, и для 1% раствора достигает значений 27,6 мН/м.

Для большинства ПАВ данная величина изменяется от 25 мН/м до 38 мН/м. Известны отдельные фтор-содержащие и другие ПАВ, снижающие силу поверхностного натяжения до 10 мН/м [21]. Как правило, такие вещества обладают токсичным действием на клетки живых организмов.

Величина начального тангенса угла наклона зависимости σ от $С_{пав}$ характеризует максимальную поверхностную активность ПАВ (g), определяемую, как

$$g = (\sigma_0 - \sigma_{ккм}) / ККМ, \quad (4)$$

где σ_0 – сила поверхностного натяжения растворителя; $\sigma_{ккм}$ – сила поверхностного натяжения в критической точке растворимости ПАВ, ККМ – критическая концентрация мицеллообразования.

Из рис. 2 видно, что желчь проявляет высокую поверхностную активность уже при концентрациях 0,001%.

Важным физико-химическим показателем коллоидной устойчивости ПАВ является значение критической концентрации мицеллообразования. При концентрациях ниже ККМ молекулы ПАВ находятся в растворенной в воде форме. При более высокой концентрации они образуют мицеллярную коллоидную систему, состоящую из десятков или сотен молекул. Мицеллы обратимо распадаются на отдельные молекулы при разбавлении коллоидной дисперсии до концентрации ниже ККМ.

На рис. 3 приведено определение ККМ желчи по изменению величины $\sigma_ж$ в зависимости от концентрации биоПАВ.

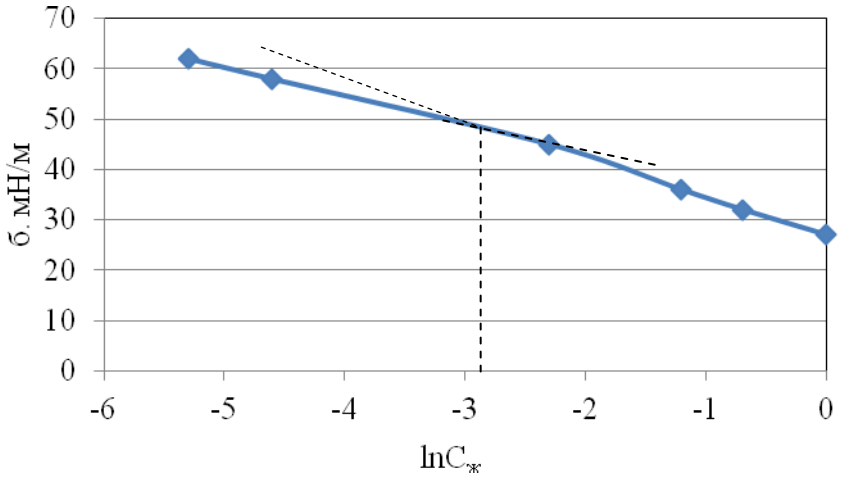

Рис. 3. Изотерма изменения силы поверхностного натяжения водных растворов желчи в полулогарифмических координатах.
Fig. 3. Isotherm of changes in surface tension force of aqueous solutions of bile in semi-log coordinates.

Точка перегиба на графике зависимости $\sigma_ж$ от $\ln C_ж$ указывает на величину ККМ желчи, равную 0,06%.

Значение ККМ – важнейшая характеристика ПАВ, определяющая их эффективность при солюбилизации гидрофобных соединений. Чем ниже величина ККМ, тем выше эффективность ПАВ.

Для монокомпонентных ПАВ величина их ККМ, как правило, изменяется от 0,5 до 5%. В случае многокомпонентных ПАВ, таких как желчь, величина их ККМ может снижаться на порядок [19, 21].

Для определения размеров частиц желчи использовали спектротурбидиметрический метод светорассеяния [13, 14].

Как известно, связь между интенсивностью падающего (I_o) и рассеянного частицами (I_p) света в условиях отсутствия его поглощения и многократного рассеяния описывается уравнением Рэллея, которое в упрощенном виде имеет вид:

$$I_p = K \cdot C \cdot (\upsilon^2 / \lambda^4) \cdot I_o, \quad (5)$$

где K – константа, зависящая от показателей преломления дисперсной фазы и среды; C – концентрация частиц; υ – объем частиц; λ – длина волны света.

Оптическая плотность светорассеяния $D_\lambda = \lg(I_p / I_o)$ для коллоидных частиц с радиусом $\lambda/10 – \lambda/3$ определяется эмпирическим уравнением Геллера [13]:

$$D_\lambda = B / \lambda^a , \quad (6)$$

где B и a – относительные константы.

Величина a характеризует волновой экспонент и может быть найдена из выражения

$$a = (\lg D_{\lambda 1} - \lg D_{\lambda 2}) / (\lg \lambda_2 - \lg \lambda_1). \quad (7)$$

Для рэлеевских частиц с радиусом порядка 20 нм $a = 4$. У более крупных частиц, размер которых превышает длину волны света, используемую в эксперименте, величина a может изменяться от 4 до 0, для случая полного отражения света.

Использование калибровочного уравнения Геллера позволяет по величине экспериментально определенного показателя a найти значение среднего радиуса r частиц дисперсной фазы (рис. 4).

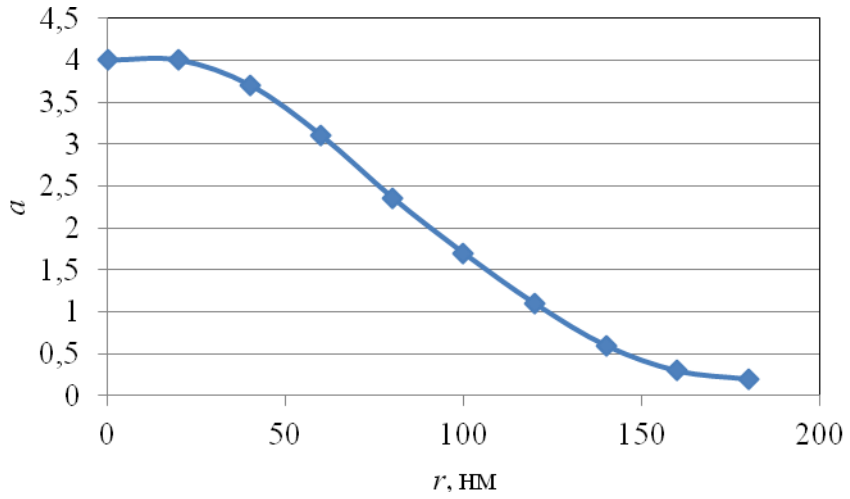

Рис. 4. Зависимость показателя a от радиуса частиц в калибровочном уравнении Геллера.
Fig. 4. Dependence of a value on particle radius in Geller calibration equation.

Для линейного участка калибровочной зависимости Геллера, описывающего изменение a в интервале 3,7 ÷ 1,2 , величина среднего радиуса частиц r изменяется от 40 до 120 нм и может быть рассчитана из выражения:

$$r = 40 + (3,7 - a)\cdot 10^2 / 3,13 \quad (8)$$

На рис. 5 приведены результаты анализа изменения величины D_λ от длины волны света (500 – 650 нм) в логарифмических координатах для водных растворов желчи с концентрацией 0,01%, 0,1%.

В соответствии с уравнением (6), полученная зависимость носит линейный характер в логарифмических координатах и позволяет определить показатель волнового экспонента (7).

Уравнение Геллера $a = \varphi(r)$ справедливо для случая C = const и отсутствия ее влияния на светорассеяние.

В случае мицеллообразования происходит взаимодействие рассеивающих свет коллоидных частиц с образованием более крупных мицелл, в результате чего показатель $a = f(C, r)$.

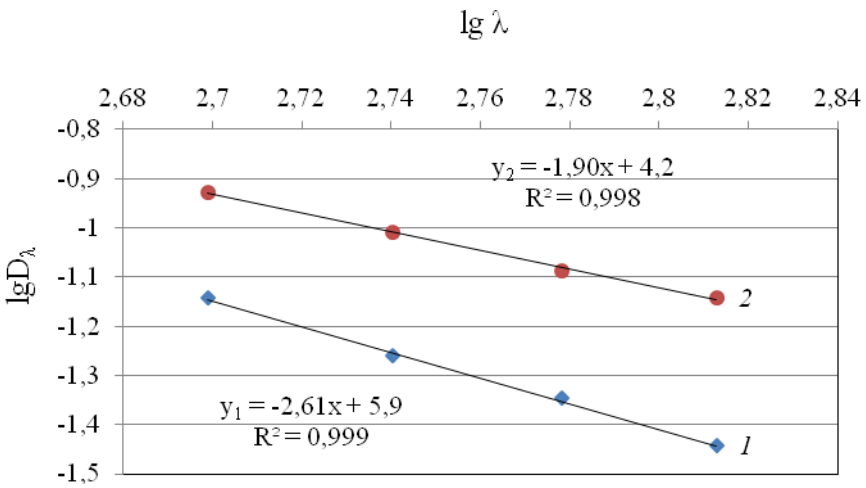

Рис. 5. Изменение оптической плотности светорассеяния водных растворов желчи от длины волны света в логарифмических координатах: *1* – 0,01%; *2* – 0,1%.
Fig. 5. Change in optical density of light scattering of aqueous solutions of bile as a function of wavelength of light in logarithmic coordinates: *1* – 0.01%; *2* – 0.1%.

На рис. 6 приведены результаты измерения величины *a* в зависимости от концентрации желчи.

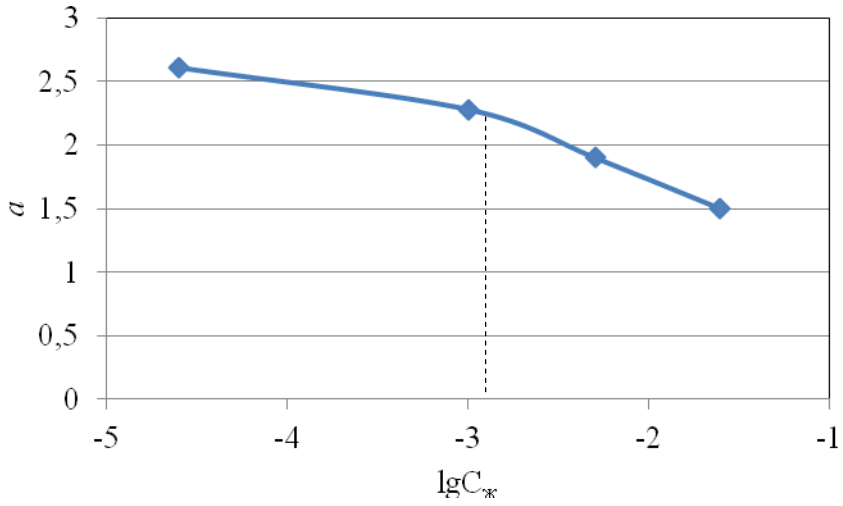

Рис. 6. Изменение показателя волнового экспонента *a* от концентрации желчи в водной среде в полулогарифмических координатах при 20 ± 1°C.
Fig. 6. Change in wave exponent *a* as a function of bile concentration in aqueous media in semi-log coordinates at 20 ± 1°C.

Как видно из рис. 6, зависимость *a* от $\ln C_ж$ носит нелинейный характер и наблюдается точка ее излома при $C_ж$ = 0,06%. Это совпадает с величиной ККМ желчи, найденным методом отрыва капель (рис. 3).

Средний радиус мицелл желчи, рассчитанный с использованием выражения (8) для ККМ = 0,06%, составил r = 85 нм.

Быстрое уменьшение поверхностного натяжения водных растворов желчи и низкие значения ее ККМ указывают на то, что желчь проявляет высокую поверхностную активность при концентрациях 0,001–0,01%. Это обеспечивает

ей хорошие эмульгирующие свойства по сравнению с другими ПАВ и позволяет использовать желчь для пробоподготовки ОСВ.

2. Оценка солюбилизирующего действия желчи на иловые осадки сточных вод

Для проверки способности желчи десорбировать и солюбилизировать связанные вещества ОСВ изучили изменение силы поверхностного натяжения водных вытяжек осадков после их обработки желчью с концентрацией 0,01–1,0% (рис. 7).

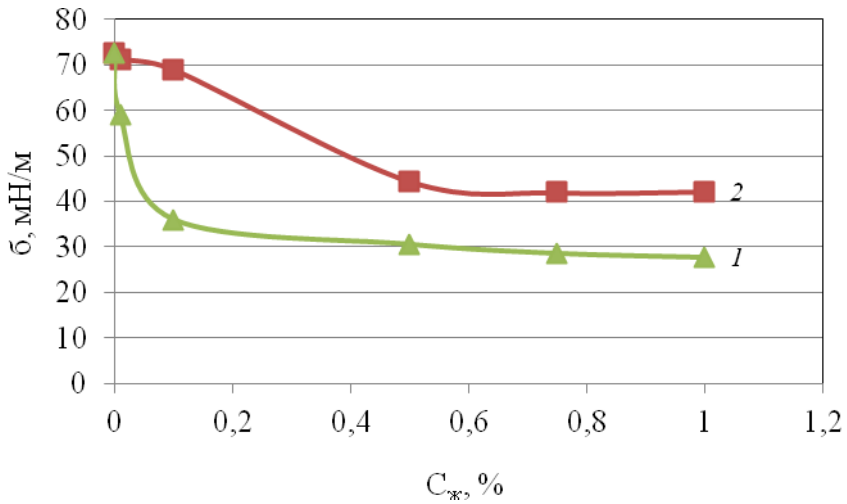

Рис. 7. Изотермы изменения силы поверхностного натяжения желчных вытяжек из ОСВ в зависимости от концентрации желчи: *1* – исходная желчь; *2* – желчная вытяжка.
Fig. 7. Isotherms of changes in surface tension force of bile extracts from sewage sludge depending from concentration of bile: *1* – initial bile; *2* – bile extract.

Для устранения влияния взвешенных частиц ОСВ их осаждали центрифугированием при 6000 об./мин 10 мин. Мицеллярные суспензии желчи в отличие от взвешенных частиц ОСВ не осаждаются после центрифугирования и остаются в надосадочной жидкости.

Из рис. 7 видно, что для водно-желчных вытяжек из ОСВ наблюдается снижение поверхностной активности заполненных мицелл и увеличение их ККМ, о чем свидетельствует изменение минимального значение $\sigma_ж$ от 27,6 мН/м до 42,0 мН/м и увеличение значения ККМ от 0,06% до 0,5% по сравнению с чистой желчью.

При взаимодействии со связанными гидрофобными соединениями на поверхности ОСВ молекулы желчи встраиваются в них, что вызывает снижение силы поверхностного натяжения и энергии связи молекул загрязнителя с поверхностью. Это способствует переходу веществ из связанного с ОСВ состояния в водную среду и включению их в ядро желчных мицелл, что увеличивает размеры и критическую концентрацию мицеллообразования, а также снижает поверхностную активность заполненных мицелл.

Учитывая известные ранее данные [17, 19, 22] о строении сферической желчной мицеллы и местоположении основных компонентов, ее структуру можно представить схемой, приведенной на рис. 7.

Благодаря хорошим амфифильным свойствам соли желчных кислот образуют при низких концентрациях термодинамически устойчивые мицеллы сферической формы, при этом гидрофобные молекулы холестерина, а также солюбилизированные загрязнители, удаленные из ОСВ, располагаются преимущественно внутри мицеллы и окружены желчными кислотами, лецитином.

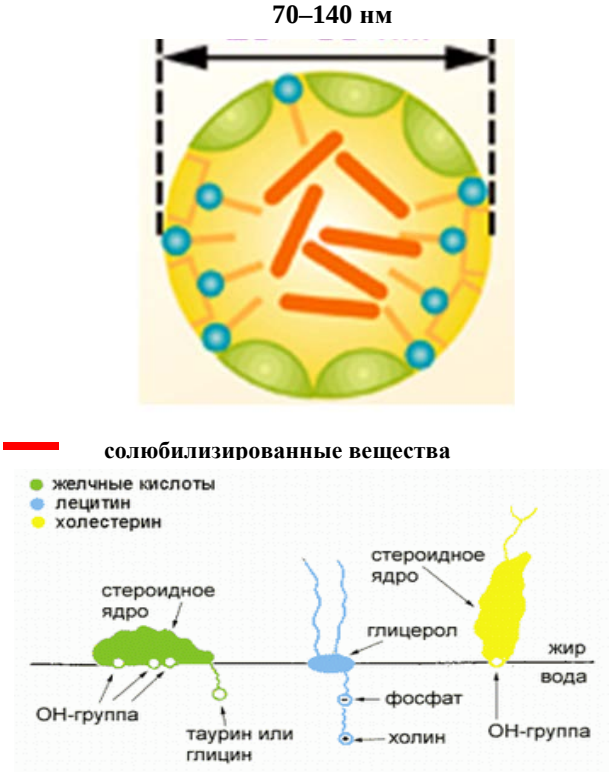

Рис. 8. Общий вид, размеры мицелл солей жирных кислот и расположение основных компонентов желчи на границе жир/вода.

Fig. 8. General scheme, sizes of micelles of fatty acid salts and location of the main components of bile at the fat/water interface.

Особенностью желчи является хорошая солюбилизация гидрофобных и слабое растворение гидрофильных веществ, поскольку данное биоПАВ биологически предназначено для растворения жировых веществ. Количество вещества в мицеллярной форме может значительно превышать его содержание в молекулярном состоянии. Несмотря на то, что основная функция желчи – эмульгирование жировых веществ, она может взаимодействовать и с водорастворимыми веществами: тяжелыми металлами, аминами и др. [22].

Способность солей желчных кислот образовывать смешанные мицеллы совместно с лецитином обеспечивает солюбилизацию холестерина и удаление стероидных веществ из организмов животных, а также способствует эмульгированию связанных гидрофобных токсичных загрязнителей ОСВ и переводу их в мицеллярную форму. С ростом концентрации ПАВ форма

мицелл может изменяться от сферической (мицеллы Гартли) до цилиндрической, пластинчатой и др. (мицеллы Мак-Бэна) [11].

3. Анализ влияния желчи на выживаемость и подвижность тест-культуры клеток E. gracilis

При использовании желчи в методе биотестирования опасных веществ ОСВ важное значение имеет отсутствие токсичного действия самой желчи на тест-культуру.

Для проверки этого провели оценку влияния 0,001–1% водных суспензий желчи на тест-культуру клеток *E. gracilis*. Токсичность (Т) проб оценивали по изменению индексов выживаемости (ИВ) и индексов подвижности (ИП) клеток тест-культуры в образцах.

$$ИВ = (N_k - N_t) / N_k \cdot 100\%, \quad (9)$$

где N_k – количество выживших клеток в контроле; N_t – количество выживших клеток в исследуемой пробе.

$$ИП = (\bar{u}_k - \bar{u}_i) / \bar{u}_k \cdot 100\%, \quad (10)$$

где $\bar{u}_k$, $\bar{u}_i$ – средние скорости движения клеток в контрольной и исследуемой пробе, соответственно.

Полученные результаты приведены на рис. 9.

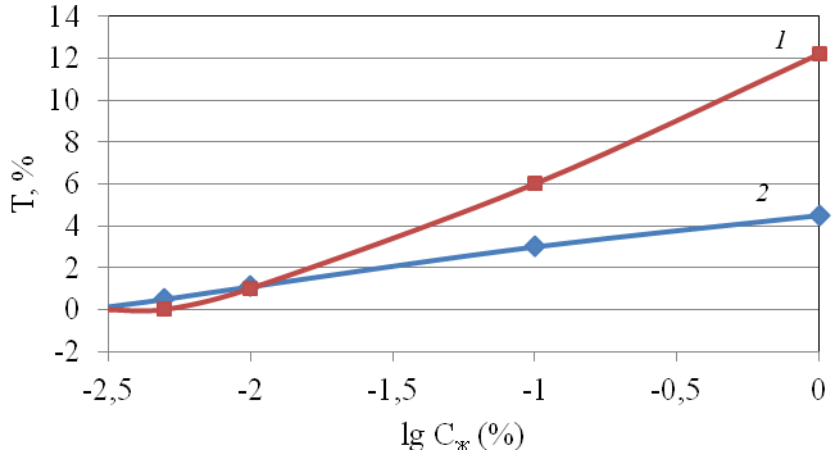

Рис. 9. Изменение индексов токсичности водных суспензий желчи от lgC_{bile} для микроводоросли *E. gracilis*, определенных по выживаемости (*1*) и подвижности (*2*) клеток. Т = 20°С.

Fig. 9. Change in toxicity indices of aqueous suspensions of bile as a function of $lgC_ж$ for microalga *E. gracilis*, determined by survival (*1*) and motility (*2*) of cells. T = 20°C.

Как видно из рис. 9, метод биотестирования токсичности по подвижности клеток *E. gracilis* сохраняет общий характер изменений от концентрации желчи, как и тест на выживаемость клеток.

Токсичные свойства желчи проявляются при концентрациях 1% и выше. При более низких $С_ж$ ее влиянием на подвижность и выживаемость клеток можно пренебречь, учитывая, что минимальным значением уровня токсичности образцов при биотестировании служит значение 10% [15].

Между показателями токсичности, определенными по ИВ и ИП существует сильная прямая корреляционная связь ($К_{корреляции}$ = 0,98–0,99).

Метод биотестирования выживаемости клеток дает более надежные результаты степени опасности сред, чем метод биотестирования их подвижности, так как реагирует только на концентрации токсичных веществ, убивающие клетки. Биотестирование подвижности клеток проявляет чувствительность к малым концентрациям токсичных веществ, на которые тест на выживаемость клеток не реагирует.

Различие между тестами на подвижность и выживаемость клеток связано со способностью тест-культуры к репарации и восстановлению своей жизнеспособности при малых концентрациях токсичных веществ. Гибель клеток наблюдается при высоких дозах, превышающих возможности их систем репарации.

4. Оценка уровня токсичности желчных вытяжек осадков сточных вод

На данном этапе работы был выяснен характер влияния концентрации желчи на уровень токсичности эмульгированных веществ, выделенных из ОСВ. Об уровне их токсичности судили по изменению индексов выживаемости и подвижности клеток *E. gracilis*.

На рис. 10 приведены результаты биотестирования токсичности водных и желчных ($С_{ж1}$= 0,1% , $С_{ж2}$= 0,5%) вытяжек ОСВ, обработанных при 20°С.

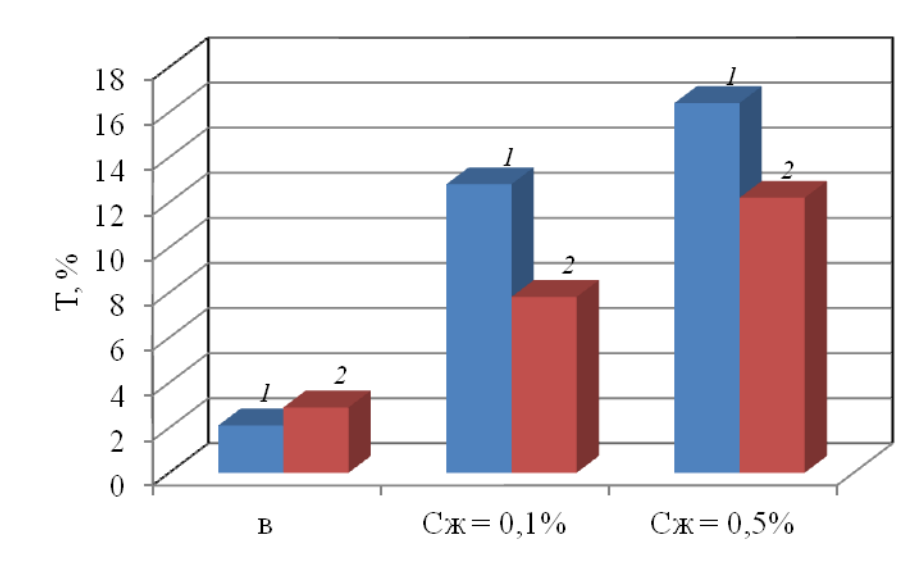

Рис. 10. Изменение токсичности водных (в) и желчных (ж) вытяжек осадков сточных вод, определенных по индексам выживаемости (*1*) и подвижности (*2*) клеток *E. gracilis.*
Fig. 10. Changes in toxicity of water (c) and bile (g) extracts of sewage sludge determined by survival (1) and motility (2) indices of *E. gracilis* cells.

Как видно из рис. 10, повышение концентрации желчи от 0,1% до 0,5% при обработке ОСВ при 20°С увеличивает выход токсичных веществ на 20–30% по сравнению с 0,1% желчью. Максимальный выход токсичных веществ, оцененный по индексу выживаемости клеток, составил 16,4%, а по индексу подвижности – 12,2%.

Между показателями ИВ и ИП для образцов вытяжек ОСВ сохраняется сильная прямая корреляционная связь и общий характер изменений, установленный на модельных растворах желчи (рис. 9). Это дает возможность использовать метод оценки подвижности клеток для скрининга уровня опасности ОСВ и позволяет сократить длительность анализа токсичности проб с 24 ч при биотестировании выживаемости до 15 мин при биотестировании подвижности клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Перевод связанных с осадками сточных вод токсичных веществ в водную фазу с помощью амфотерных ПАВ является основой для биотестирования опасных липофильных загрязнителей органической природы, позволяющей значительно сократить длительность и трудоемкость пробоподготовки осадков для анализа их безопасности.

Изучение возможности использования желчи в качестве биоПАВ для пробоподготовки и биотестирования токсичности иловых осадков сточных вод показало, что она обладает высокой поверхностной активностью и имеет низкие значения показателя критической концентрации мицеллообразования. Это способствует отрыву гидрофобных загрязнителей с поверхности ОСВ и их солюбилизации внутри желчных мицелл.

Анализ изменения волнового экспонента *a* от $\ln C_{ж}$ показал, что полученные значения ККМ = 0,06%, совпадают с величиной ККМ, найденной методом оценки изменения силы поверхностного натяжения желчи.

При характеристике свойств желчных вытяжек ОСВ в зависимости от концентрации желчи установлено, что показатель ее ККМ сдвигается к величине 0,5%. Это указывает на солюбилизацию связанных с ОСВ гидрофобных веществ и перевод их в мицеллярную форму. При этом поверхностная активность заполненных желчных мицелл снижается, а содержание в них ассоциированных молекул желчи и размеры желчных мицелл, увеличиваются.

Радиус желчных мицелл по данным светорассеяния варьировал от 70 нм для свободных мицелл до 140 нм в случае заполненных мицелл.

Оценка влияния желчи на выживаемость и подвижность тест-культуры клеток *E. gracilis* показала, что желчь не оказывает токсичного действия на клетки тест-культуры при концентрации ниже 1,0%. Это позволяет использовать ее для биотестирования токсичности желчных вытяжек ОСВ.

Сравнение токсичности водных и желчных вытяжек ОСВ показало, что в случае экстракции ОСВ преимущественно загрязненных липофильными токсичными веществами уровень токсичности водных вытяжек был низким, в то время как в случае желчных вытяжек он увеличивался в 6–8 раз по сравнению с водными вытяжками. Повышение концентрации желчи от 0,1% до 0,5% увеличивало выход токсичных веществ в 1,3 раза.

Наблюдаемое повышение токсичности желчных вытяжек ОСВ может указывать на увеличение выхода десорбированных с ОСВ токсичных веществ, а также на то, что в таком мицеллярном состоянии токсичные вещества могут

легче встраиваться в цитоплазматическую мембрану или проникать внутрь клеток и оказывать на них повреждающее действие.

Наличие сильной прямой корреляционной связи между показателями токсичности водно-желчных вытяжек, определенной по индексам выживаемости и подвижности тест-культуры клеток *E. gracilis,* дает возможность сократить длительность анализа токсичности ОСВ с 24 ч при биотестировании выживаемости клеток до 15 мин при биотестировании их подвижности.

Список литературы:

1. Кузнецов А.Е. (2010). *Прикладная экобиотехнология*. В 2-х т. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний.
2. Пахненко Е.П. (2013). *Осадки сточных вод и другие нетрадиционные органические удобрения*: М.: БИНОМ. Лаборатория знаний.
3. Никовская Г.Н., Калиниченко К.В. (2014). Биотехнология утилизации осадков муниципальных сточных вод. *Biotechnologia Acta, 7*(3), 21 - 32.
4. СанПиН 2.1.7.573-96. «2.1.7. Почва. Очистка населенных мест. Бытовые и промышленные отходы. Санитарная охрана почвы. Гигиенические требования к использованию сточных вод и их осадков для орошения и удобрения». М.: Стандартинформ, 1997.
5. ГОСТ Р 17.4.3.07-2001. Охрана природы. Почвы. Требования к свойствам осадков сточных вод при использовании их в качестве удобрений. М.: Стандартинформ, 2001.
6. ГОСТ Р 54534-2011. Ресурсосбережение. Осадки сточных вод. Требования при использовании для рекультивации нарушенных земель. М.: Стандартинформ, 2012.
7. Жмур Н.С. (1997). *Государственный и производственный контроль токсичности вод методами биотестирования в России*. М: МДС.
8. *Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование* (2010). Под ред. О.П. Мелеховой, Е.И. Егоровой. 3-е изд. М.: Изд. центр «Академия».
9. Терехова В.А. (2011). Биотестирование почв: подходы и проблемы. *Почвоведение, 2,* 190 - 198.
10. ГОСТ 32509-2013. Межгосударственный стандарт. Вещества поверхностно-активные. Метод определения биоразлагаемости в водной среде. М.: Стандартинформ, 2014.
11. Волков В.А. (2015). *Коллоидная химия. Поверхностные явления и дисперсные системы*. СПб.: Изд-во «Лань».
12. Фридрихсберг Д.А. (1984). *Курс коллоидной химии*. Л.: Химия.
13. Heller W., Bhatnagar H.L., Nakagaki M. (1962). Theoretical investigations on the light scattering of spheres. XIII. The “wavelength exponent” of differential turbidity spectra. *J. Chem. Phys., 36*(5), 1163 - 1170. https://doi.org/10.1063/1.1732710
14. Khlebtsov N.G., Maksimova I.L., Tuchin V.V., Wang L. (2002). In: *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics.* Ed. by Tuchin V.V. Washington: Bellingham. Ch. 1. P. 31.
15. Игнатенко А.В. (2018). Пробоподготовка и биотестирование токсичности иловых осадков сточных вод. *Химическая безопасность, 2*(2), 251 - 271. https://doi.org/10.25514/CHS.2018.2.14120
16. ГН-2.1.5.1315-03. ПДК химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования. М.: Стандартинформ, 2003.
17. Despopoulos A., Silbernagl S., Gay R., Rothenburger A. (2003). *Color Atlas of Physiology*. Stuttgart, New York: Thieme Medical Publishers.
18. Begly M., Gahan C.G.M., Hill C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews, 29*(4), 625 - 651. https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.09.003

19. Carey M.C. (1985). In: *Sterols and Bile Acids*. Ed. H. Danielsson, J. Sjövall, V. 12. Ch. 13. P. 345.
20. Холмберг К., Йенссон Б., Кронберг Б., Линдман Б. (2007). *Поверхностно-активные вещества и полимеры в водных растворах*. М.: БИНОМ.
21. Буканова Е.Ф. (2006). *Коллоидная химия ПАВ. Ч. 1. Мицеллообразование в растворах ПАВ*. М.: МИТХТ им. М.В. Ломоносова.
22. Hofman A.F., Small D.M. (1967). Detergent properties of bile salts: correlation with physiological functions. *Annu. Rev. Med.*, 18, 333 - 376. https://doi.org/10.1146/annurev.me.18.020167.002001

References:

1. Kuznetsov, A.E. (2010). *Applied ecobiotechnology*. In 2 vols. M.: BINOM. Lab. znanii (in Russ).
2. Pakhnenko, E.P. (2013). *Sewage sludge and other non-traditional organic fertilizers*. M.: BINOM: Lab. znanii (in Russ).
3. Nikovskaya, G.N., & Kalinichenko, K.V. (2014). Biotechnology of utilization of municipal wastewater sediments. *Biotechnologia Acta*, *7*(3), 21 - 32 (in Russ).
4. Sanitary Regulations and Norms 2.1.7.573-96. Hygienic requirements to wastewater and sewage sludge use for land irrigation and fertilization. M.: Standartinform, 1997 (in Russ).
5. GOST [State Standard] R 17.4.3.07-2001. Nature protection. Soils. Requirements for sewage sludge use for fertilization. M.: Standartinform, 2001 (in Russ).
6. GOST [State Standard] R 54534-2011. Resource saving. Sewage sludge. Requirements for recultivation of disturbed lahds. M.: Standartinform, 2012 (in Russ).
7. Zhmur, N.S. (1997). *State and industrial control of water toxicity by biotesting methods in Russia*. M: MDS (in Russ).
8. *Biological environmental control: bioindication and biotesting* (2010). Ed. by O.P. Melekhova, E.I. Egorova. 3rd ed. M.: Tsentr Akademia (in Russ).
9. Terekhova, V.A. (2011). Soil bioassay: problems and approaches. *Eurasian Soil Science*, *44*(2), 173 - 179. https://doi.org/10.1134/S1064229311020141
10. GOST [State Standard] 32509-2013. Surface-active agents. Method for determination of biodegradability rate in aquatic environment. M.: Standardinform, 2014 (in Russ).
11. Volkov, V.A. (2015). *Colloid and surface chemistry. Surface phenomena and dispersed systems*. 2nd ed. SPb.: Lan' (in Russ).
12. Friedrichsberg, D.A. (1984). *Course of colloid chemistry*. 2nd ed. L.: Khimiya (in Russ).
13. Heller, W., Bhatnagar, H.L., & Nakagaki, M. (1962). Theoretical investigations on the light scattering of spheres. XIII. The "wavelength exponent" of differential turbidity spectra. *J. Chem. Phys.*, *36*(5), 1163 - 1170. https://doi.org/10.1063/1.1732710
14. Khlebtsov, N.G., Maksimova, I.L., Tuchin, V.V., & Wang, L. (2002). In: *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics*. Ed. by V.V. Tuchin Washington: Bellingham. Ch. 1. P. 31.
15. Ignatenko, A.V. (2018). Sample preparation and biotesting of toxicity of sewage sludge wastes. *Khimicheskaya Bezopasnost' = Chemical SafetyScience*, *2*(2), 251 - 271 (in Russ). https://doi.org/10.25514/CHS.2018.2.14120
16. Hygienic Standards 2.1.5.1315-03. Maximum permissible concentrations of chemical substances in water of water bodies for drinking and cultural and domestic water use. M.: Standartinform, 2003 (in Russ).
17. Despopoulos, A., Silbernagl S., Gay, R., & Rothenburger, A. (2003). *Color Atlas of Physiology*. Stuttgart, New York: Thieme Medical Publishers.
18. Begly, M., Gahan, C.G.M., & Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews*, *29*(4), 625 - 651. https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.09.003
19. Carey, M.C. (1985). In: *Sterols and Bile Acids*. Ed. by H. Danielsson, & J. Sjövall. V. 12. Ch. 13. pp. 345 - 403.

20. Holmberg, K., Jonsson, B., Kronberg, B., & Lindman, B. (2002). *Surfactants and polymers in aqueous solution.* 2nd Ed. Chichester: John Wiley & Sons.
21. Bukanova, E.F. (2006). *Colloidal chemistry of surfactants. Part 1. Micelle formation in solutions of surfactants*. M.: MITKhT (in Russ).
22. Hofman, A.F., & Small, D.M. (1967). Detergent properties of bile salts: correlation with physiological functions. *Annu. Rev. Med.,* 18, 333 - 376. https://doi.org/10.1146/annurev.me.18.020167.002001