

Вестник

№ 2

КАЗАНСКОГО ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО УНИВЕРСИТЕТА



2010

УДК 543.423.1: 628.336.6: 577.15.064.151: 543.39

К. В. Холин, А. З. Миндубаев, Э. И. Галеева, С. Т. Минзанова,
А. Д. Волошина, Д. Е. Белостоцкий, В. В. Зобов, В. Ф. Миронов,
А. И. Коновалов, Ф. К. Алимова, Е. С. Нефедьев

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ И БИОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БИОГАЗОВЫХ СУБСТРАТОВ И ИХ ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Ключевые слова: биогазовый субстрат, аэробная переработка, атомно-эмиссионный анализ, СНН-анализ. biogas substratum, aerobic processing, atomic-emissive analysis, CHN-analysis.

Выяснено, что дополнительная аэробная переработка отработанного биогазового субстрата в присутствии почвенной микрофлоры на протяжении 3 месяцев ведет к детоксикации продуктов анаэробного сбраживания и превращению их в органику, легко усваиваемую почвенными микроорганизмами. Этим методом можно превращать токсичные осадки сточных вод в удобрения. В целом, переработанный в аэробных условиях субстрат оказался более благоприятной средой для растений по сравнению с почвой, как в плане всхожести семян, так и в плане роста и веса проростков. Это позволяет рассматривать переработанный в аэробных условиях субстрат в качестве потенциального удобрения.

It is found that an additional anaerobic processing of waste biogas substrate in the presence of soil microflora for 3 months leads to the detoxification of anaerobic digestion products, and transform them into easily assimilated by soil microorganisms organic matter. This method can be used to transform toxic sewage sludge into fertilizer. In general, the processed substrate under aerobic conditions was more favorable environment for plants, as compared with the soil, both in terms of seed germination, and in terms of height and weight of sprouts. This allows to consider a revised under aerobic conditions substrate as a potential fertilizer.

Введение

В настоящее время одной из важнейших проблем становится нехватка энергетических ресурсов, обусловленная интенсивной эксплуатацией месторождений невозобновляемых энергоносителей. В свете этого необходимость перехода энергетики на возобновляемое сырье, продукты жизнедеятельности живых организмов и их биомассу, является очевидной. Нашим авторским коллективом на протяжении трех лет в рамках Программы № 7 Президиума РАН успешно ведется работа по получению биогаза из органических отходов (осадки сточных вод и др.) [1]. Однако токсичность продуктов анаэробного сбраживания является препятствием на пути внедрения биогазовых технологий [2]. Известным методом снижения токсичности перебродивших субстратов является аэробная переработка [3].

Экспериментальная часть

Объект исследования - отработанный биогазовый субстрат на основе вторичных осадков сточных вод с водоочистного сооружения г. Казани.

Для определения зольности (табл.1) использовали методику определения содержания золы (ГОСТ 2918).

1г продукта взвешивают в предварительно доведенном до постоянного веса тигле. Затем сжигают в муфельной печи и взвешивают снова. Зольность вычисляют по формуле:

$$P = P_1 / P \cdot 100, \%$$

где Π - зольность, %; P_1 - вес продукта после сжигания, г; P - вес продукта до сжигания, г.

Элементный анализ на С, Н и N проведен на анализаторе CHN-3 (табл.2). В качестве стандарта применялся стрептоцид. Содержание элементов в стрептоциде (%): С (41,85), Н (4,65), N (16,26).

Измерения концентраций элементов в объектах исследования проводились на атомно-эмиссионном спектрометре с индуктивно-связанной плазмой iCAP 6300 DUO (фирма Thermo Scientific, США). В спектрометре используются оптическая схема Эшелле и полупроводниковый CID-детектор. Конструкция спектрометра обеспечивает одновременное измерение аналитических линий в диапазоне от 166 до 867 нм. Оптическое разрешение – менее 0,007 нм на длине волны 200 нм, что дает возможность анализировать материалы с самыми сложными спектрами. Частота индукционной катушки составляет 27,12 МГц. Двойное наблюдение плазмы (аксиальное и радиальное) позволяет оптимизировать процесс измерения интенсивности спектральных линий и подавления спектральных шумов. Градуировочные графики, связывающие содержание аналита в плазме с инструментальным откликом, обычно линейны в интервале пяти порядков величины концентрации. Для многих элементов пределы обнаружения - 1 ч 100 мкг/л. Возможно одновременное определение большого числа элементов.

Из образцов ила готовилась суспензия, добавлением концентрированной серной кислоты ЧДА. Затем она отстаивалась в течении суток и пропусклась через фильтровальную бумагу. Таким образом получался раствор, содержащий большую часть элементов способных аккумулироваться в растениях.

Выбор спектральных линий обуславливался малыми шумами и отсутствием спектральных наложений (рис.1). Измерения проводились по 3 раза, после чего результат усреднялся. Стандартизация проводилась с помощью 5 многоэлементных стандартов по 3 точкам для каждого из элементов (рис. 1). Относительная ошибка измерений, состоящая из случайных ошибок при разбавлении и ошибки прибора, не превышает 10 %. Анализ проводился в аксиальном режиме. Время промывки капилляров перед анализом 30 с. Скорость насоса при промывке 100 об/мин, во время анализа 50 об/мин. Поток аргона на распылителе и вспомогательный поток составляли 0,7 л/мин и 0,5 л/мин соответственно. Мощность подаваемая на плазму 1150 Вт. Интегрирование сигнала проводилось в течении 15 с.

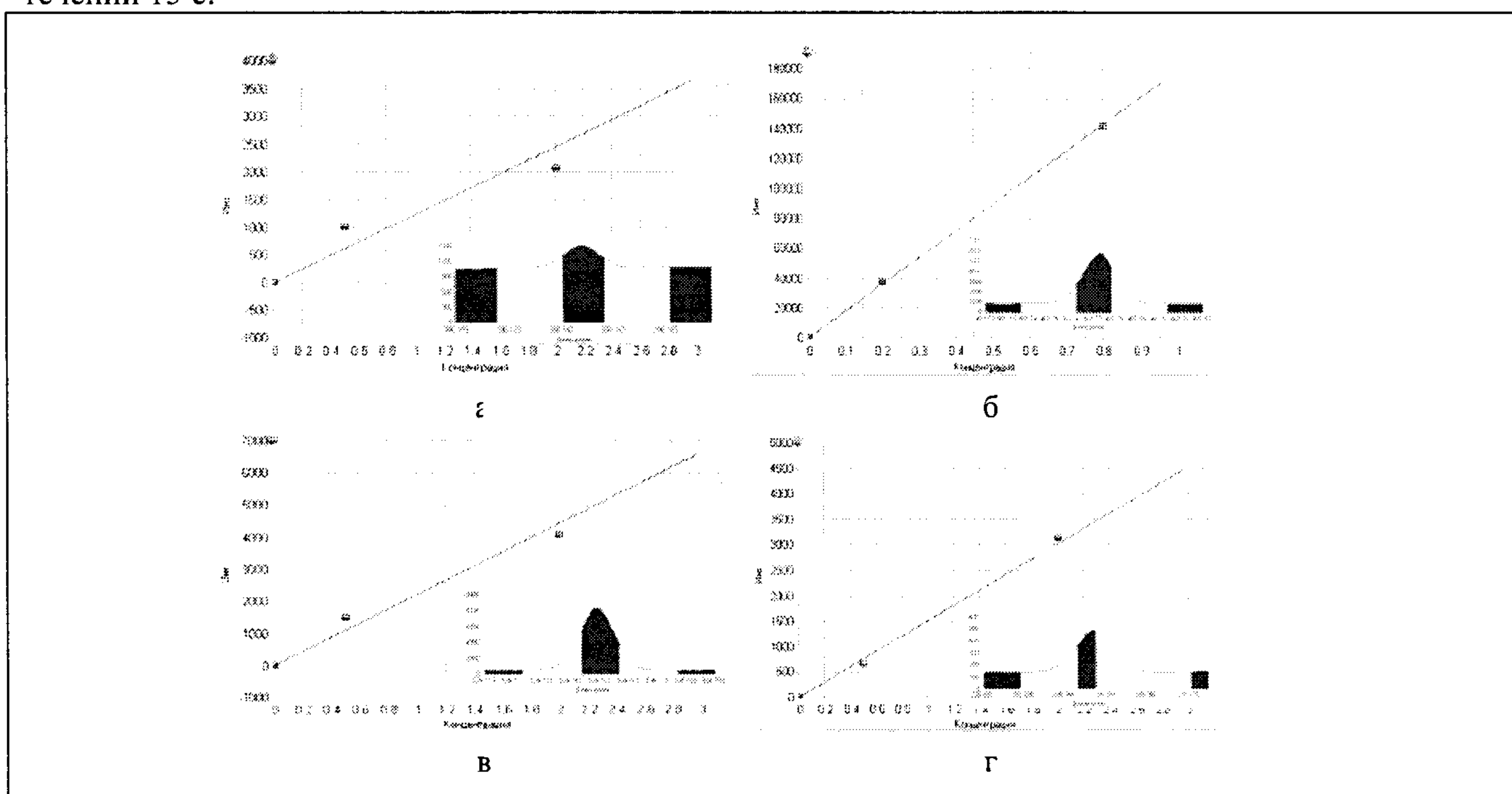


Рис 1 - Пример калибровочных графиков и спектральных линий для некоторых элементов: а) алюминий, б) стронций, в) медь, г) свинец. Коэффициент корреляции графиков для всех элементов не ниже 0,98

В качестве тест-объектов использовались грибы, выделенные из почвы: *Aspergillus niger*,

Fusarium и *Trichoderma* и азотфиксирующие бактерии *Azotobacter*. Грибы выращивались на среде Сабуро с левомицетином, азотобактер – на среде Эшби для азотфиксаторов, бактерии на мясопептонном агаре. Посев *Azotobacter* производился следующим образом: отбиралась проба и разбавлялась физиологическим раствором (0.9 % раствор NaCl) в 100 (0.5 г субстрата на 50 мл р-ра) и 10000 раз. По 1 мл полученного раствора вносили в культуру *Azotobacter*, разведенную в 10, 100 и 1000 раз. Аналогично были посеяны культуры грибов *A. niger*, *Fusarium* и *Trichoderma*, разбавленные до 10^4 спор / мл.

Результаты и обсуждение

Характеристики сырья:

Влажность жидкого ила 98.8 %

Влажность ила после отжима на фильтр-прессе (твердого) 81.6 %

Была определена зольность субстратов (табл. 1).

Таблица 1 – Зольность субстратов

	Зольность, % на сухой вес	Органика, % на сухой вес	Органика, % на сырой вес
Жидкий ил	37.0	63.0	0.8
Твердый ил	39.7	60.3	11.0

*Значение завышено, поскольку в твердый ил добавлен полиакриламид, содержащий азот

Результаты элементного анализа полученные с помощью анализатора CHN-3 и АЭС ИСП iCAP 6300 DUO представлены в таблицах 2 и 3 соответственно.

Таблица 2 – Результаты CHN – анализа

	Углерод, %	Водород, %	Азот, %
Жидкий ил	34.65	6.20	7.15
Твердый ил	39.82	7.04	5.81*

Таблица 3 - Элементный состав илов

Элемент	Ил после отжима на фильтр-прессе (% сухого веса)	Жидкий ил (% сухого веса)
1	2	3
Алюминий	2.9350	1.0060
Барий	0.1236	0.0779
Бериллий	0.0002	-
Бор	0.2727	0.4737
Ванадий	0.0302	0.0024
Галлий	0.0003	-
Железо	8.9210	5.0765
Кадмий	0.1758	0.2675
Калий	4.0070	5.9070

Окончание табл. 3

1	2	3
Кальций	28.650	12.5200
Кобальт	1.4020	1.9760
Кремний	1.0280	5.0730
Литий	0.0026	0.0029
Магний	3.0345	2.2820
Марганец	0.3940	0.3793
Медь	3.2100	5.4190
Молибден	0.0030	0.0016
Мышьяк	0.0029	-
Натрий	2.7360	3.3280
Никель	0.8088	1.3880
Олово	0.0078	0.0047
Свинец	0.6157	0.8691
Серебро	0.2878	0.5067
Стронций	0.2533	0.1071
Титан	0.0946	0.7874
Фосфор	7.623	3.6140
Хром	0.3631	0.1534
Цинк	2.0870	2.7585

В образцах в достаточном количестве обнаружены такие нежелательные элементы как: алюминий, медь, никель, стронций, свинец, хром.

Вначале исследовалась токсичность исходного биогазового субстрата. Выяснилось, что субстрат угнетает рост грибов, не оказывая подобного влияния на бактерии (рис. 2).

Вероятно, угнетающее действие на эукариоты обусловлено наличием в субстратах продуктов анаэробного брожения - ЛЖК, индола, скатола и спиртов при отсутствии растворимых сахаров – питательной среды для грибов. Поэтому дальнейшим этапом исследования стала дополнительная аэробная переработка.

За основу взят тот же самый субстрат, который анализировался на токсичность ранее. Он был смешан с равным по весу количеством почвы. В смесь добавили культуру гриба *Trichoderma*: известно, что ферменты грибов стимулируют редукцию токсичных веществ в процессе аэробной переработки. Изначально смесь имела угольно-черный цвет и интенсивный запах анаэробно сброженного субстрата. Приблизительно раз в неделю смесь поливалась отстоявшейся (без хлора) водопроводной водой и перемешивалась. Внешне никаких изменений не произошло: окраска осталась прежней, рост колоний микроорганизмов не наблюдался. На 29 день отмечено ослабление запаха, на 61 день запах стал едва ощутим, на 73 день отмечено отсутствие запаха.

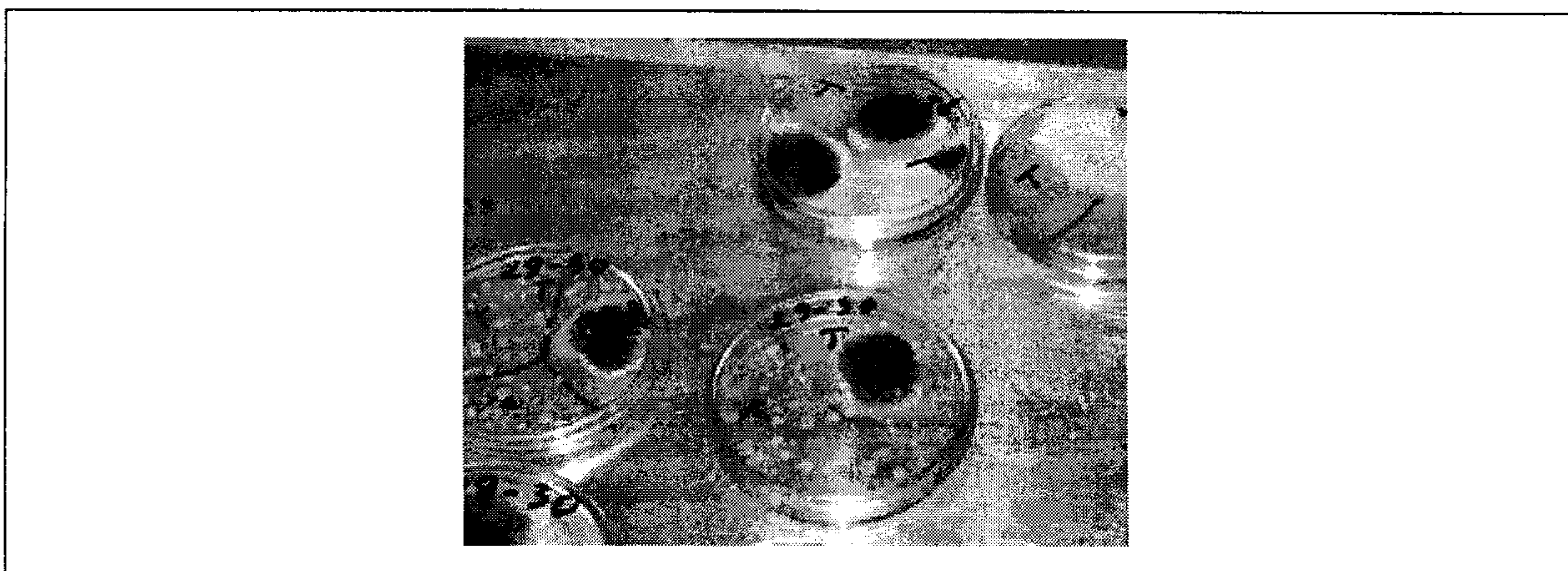


Рис. 2 - По сравнению с контролем рост грибов замедлен, но интенсивно разрастаются колонии бактерий активного ила

Спустя 97 дней была взята проба субстрата. В противоположность исходному субстрату, наблюдалась стимуляция роста грибов, а не угнетение (табл. 4).

Таблица 4 - Влияние аэробно переработанного субстрата на рост азотобактера и гриба

Вид	Плотность культуры (клетки / мл)	
	Контроль (без субстрата)	Опыт (с субстратом)
<i>Azotobacter</i>	3.810^8	4.010^8
<i>Aspergillus niger</i>	7010^4	$(100 - 108) 10^4$

Кроме того, был сделан посев переработанного субстрата, разбавленного физиологическим раствором в 100 и 10000 раз, на мясо-пептонном агаре (среда для бактерий), среде Эшби (для *Azotobacter*) и среде Сабуро с левомицетином (для грибов), с целью определить состав его микрофлоры. Одновременно был сделан аналогичный посев почвы, собранной в том же месте, где была взята почва для аэробной переработки. Данное исследование ставило целью сравнить микрофлору переработанного субстрата и почвы, и определить, вытесняет почвенная микрофлора иловую в процессе аэрации, или нет.

На мясо-пептонном агаре из почвы (1:100 с физраствором) выросли следующие бактерии (табл. 5).

Из субстрата (1:100 с физраствором) выросли следующие бактерии (табл. 6).

Более ранние исследования [4] показали, что микрофлора «старых» биогазовых субстратов представлена почти целиком строгими анаэробами клостридиями, среди которых встречаются продуценты токсинов и условные патогены. Наличие других микроорганизмов в субстрате после дополнительной переработки означает, что в аэробных условиях почвенная микрофлора вытесняет микрофлору субстрата, что положительно сказывается на его санитарно-гигиенических и экологических характеристиках.

Таблица 5 - Наиболее показательные колонии бактерий в почве

Внешний вид колонии	Вид под микроскопом
Белая, складчатая, морщинистая, с неровным краем	Грамположительные палочки, прямые и изогнутые, скопления спор
Сухая, белая, морщинистая, с неровным краем	Цепочки мелких грамотрицательных клеток
Круглая, с ровным краем, выпуклая в центре	Очень мелкие одиночные грамотрицательные кокки
Желтоватая складчатая, с неровным краем	Крупные удлиненные палочки, много спор

Таблица 6 - Наиболее показательные колонии бактерий в переработанном субстрате

Внешний вид колонии	Вид под микроскопом
Круглая, блестящая, сероватая	Крупные и мелкие грамположительные палочки
Желтоватая, складчатая, с неровным краем	Палочки со спорой на конце (предположительно, клостридии)
Белая, складчатая, с неровным краем	Укороченные бочонкообразные палочки

На среде Сабуро из почвы выросли белые колонии грибов, а из переработанного субстрата – триходерма и гриб кремового цвета, а также белая колония гриба с каплевидными утолщениями на гифах (табл. 7).

Таблица 7 - Видовой состав грибов почвы и субстрата после аэробной переработки

Видовой состав грибов почвы	Видовой состав грибов субстрата
<i>Aspergillus glaucus</i>	<i>Trichoderma</i>
<i>Penicillium</i>	<i>Mucor</i>
Дрожжеподобный	<i>Penicillium</i>
<i>Penicillium album</i>	<i>Alternaria</i>
<i>Rhizopus Mycelia sterilia</i>	<i>Fusidium</i>
Дрожжи темной окраски	

Видовой состав микрофлоры почвы и переработанного субстрата различается как для бактерий, так и для грибов. Это свидетельствует о том, что споры почвенных микроорганизмов присутствуют в осадках городских стоков, но не имеют возможности прорасти в силу неблагоприятных условий (высокая токсичность). Только после аэробной переработки илов в них наблюдается рост почвенных микроорганизмов и вытеснение ими экологически неблагоприятной анаэробной микрофлоры.

Проведена работа по исследованию влияния аэрированного субстрата на высшие растения [5]. Методика проведения эксперимента следующая. Субстрат смешали с дистил-

лированной стерильной водой без точной пропорции до полужидкого состояния, когда его можно размешать. На следующий день разделили субстрат на 11 частей и поместили в чашки Петри, посадив в каждую по 1 зерну кукурузы *Zea mays*. Через каждые три дня измерялись длина проростков в сантиметрах. В качестве контроля использовались 11 посевов на стерильную почву (также в чашки Петри). Через 7 дней проростки извлекались из почвы и разделялись на стебли и корни. Измерялся общий вес стеблей и корней. После этого стебли и корни высушили в течение 3 суток, разложив тонким слоем. Затем снова взвесили, получили сухой вес. Эксперимент повторялся дважды, с интервалом в 7 дней.

Подсчет фитотоксической активности производили по формуле:

$$A_f = 100 - ((D_x - D_n) / (D_k - D_n) \cdot 100),$$

где A_f – фитотоксическая активность в % ингибирования роста корней; D_x – средняя длина корней (проростков) на 7 сутки в опытном варианте (см); D_k – средняя длина корней (проростков) на 7 сутки в контроле (см); D_n – начальная длина корней (проростков) (см).

Так, на стерильной почве проросли 6 семян кукурузы из 11, а на субстрате всхожесть была 100 % (проросли все 11 семян). Фитотоксичность субстрата оказалась отрицательной (табл. 8).

Таблица 8 - Фитотоксичность субстрата после аэробной переработки

	Контроль	Опыт	Фитотоксичность
Н семян	21	21	
Длина корней, см	3±0.4	9±1.2	-40
Длина проростков, см	4±0.4	16±2.4	46
Среднее знач.	5.1	12.3	
Сырой вес корней, г	2.15±0.3	4.34±0.3	-124
Сухой вес корней, г	0.27±0.04	0.45±0.06	-103
Сырой вес проростков,г	5.15±0.7	7.84±1.0	81
Сухой вес проростков,г	0.35±0.05	0.68±0.09	73

Выводы

Выяснено, что дополнительная аэробная переработка отработанного биогазового субстрата в присутствии почвенной микрофлоры на протяжении 3 месяцев ведет к детоксикации продуктов анаэробного сбраживания и превращению их в органику, легко усваиваемую почвенными микроорганизмами. Этим методом можно превращать токсичные осадки сточных вод в удобрения.

В целом, переработанный в аэробных условиях субстрат оказался более благоприятной средой для растений по сравнению с почвой, как в плане всхожести семян, так и в плане роста и веса проростков. Это позволяет рассматривать переработанный в аэробных условиях субстрат в качестве потенциального удобрения.

Работа поддержана: Государственный контракт между Федеральным агентством по науке и инновациям и государственным образовательным учреждением «Казанский государственный технологический университет» на 2008г. №02.552.11.7027 по теме 2008-7-5.2-00-08: «Развитие центра коллективного пользования научным оборудованием в области получения и исследования наночастиц оксидов металлов, металлов и полимеров с заданными химическим составом и формой; программа № 19 ОХНМ РАН.

Литература

1. *Миронов, В.Ф.* Средство для увеличения выхода биогаза / В.Ф.Миронов [и др.] // Заявка на патент РФ № 200722891 от 18.06.2007. Решение о выдаче патента на изобретение от 12.09.2008.
2. *Селивановская, С.Ю.* Воздействие компоста на геохимический фон почв и растения лесных питомников / С.Ю. Селивановская, В.З. Латыпова, Л.А.Артамонова // Экологическая химия. – 2002. - Т. 3. - № 11. – С. 201–209.
3. *Алексеева, А.С.* Влияние применения нетрадиционных органических удобрений на накопление тяжелых металлов и биологическую активность дерново-подзолистых супесчаных почв: Дис. ... канд. биол. наук / А.С. Алексеева. – М., 2002. – 145 с.
4. *Миндубаев, А.З.* Сукцессия микрофлоры активного ила в процессе метанового брожения / А.З. Миндубаев [и др.] // Тез. докл. науч.-практ. конф. «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии». - Казань, 15 – 16 сентября 2008 г. – С. 83 – 84.
5. *Коломбет, Л.В.* Экспресс-оценка антигрибного, рострегулирующего и фитотоксического действия протравителей семян / Л.В. Коломбет, М.С. Соколов // Агрехимия. – 2006. - № 8. - С.52-56.

© **К. В. Холин** - асп., мл. науч. сотр. ИОФХ имени А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, kholin06@mail.ru; **А. З. Миндубаев** - канд. хим. наук, ст. науч. сотр. ИОФХ имени А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, mindubaev@iorg.knc.ru; **Э. И. Галеева** - асс. каф. физики КГТУ; **С. Т. Минзанова** - канд. техн. наук, доц., ст. науч. сотр. ИОФХ имени А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, minzanova@iorg.knc.ru; **А. Д. Волошина** - мл. науч. сотр. ИОФХ имени А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, zobov@iorg.knc.ru; **Д. Е. Бело-стоцкий** - студ. КГУ, mindubaev@iorg.knc.ru; **В. В. Зобов** - д-р биол. наук, вед. науч. сотр. ИОФХ имени А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, zobov@iorg.knc.ru; **В. Ф. Миронов** - чл.-корр. РАН, д-р хим. наук, зав. лаб. ИОФХ имени А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, mirovov@iorg.knc.ru; **А. И. Коновалов** - акад. РАН, д-р хим. наук, зав. отделом ИОФХ имени А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, konovalov@knc.ru; **Ф. К. Алимова** - д-р биол. наук, проф., зав. каф. биохимии КГУ, farida_alimova@hotmail.com; **Е. С. Нефедьев** – д-р хим. наук, проф., зав. каф. физики КГТУ.