

**А.М. Марченко, Г.Н. Пшинко, В.Я. Демченко, В.В. Гончарук**

**ВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ  
ИЗ ОСАДКОВ СТОЧНЫХ ВОД БАКТЕРИЯМИ,  
ОКИСЛЯЮЩИМИ ЭЛЕМЕНТНУЮ СЕРУ**

Институт коллоидной химии и химии воды  
им. А.В. Думанского НАН Украины, г. Киев  
marchenkoolm@gmail.com

*Проведены эксперименты по бактериальному выщелачиванию тяжелых металлов из аэробно стабилизированного избыточного активного ила Бортнической станции аэрации г. Киева при добавлении элементной серы как стимулятора активности тионовых ацидофильных бактерий. Показано, что снижение рН осадков в течение процесса является определяющим фактором эффективности выщелачивания тяжелых металлов.*

**Ключевые слова:** бактериальное выщелачивание, осадок сточных вод, тионовые ацидофильные бактерии, тяжелые металлы, элементная сера.

**Введение.** Реагентные методы выщелачивания тяжелых металлов (ТМ) из осадков сточных вод (ОСВ) гарантированно результативны, но сопровождаются значительной потерей питательных веществ (N, P, K) и достаточно затратны [1, 2]. Бактериальное выщелачивание (био-выщелачивание) ТМ из ОСВ характеризуется гораздо меньшей потерей питательных веществ [2 – 6], однако его до сих пор не удалось выполнить без использования каких-либо реагентов [2, 7]. В работах данного направления обрабатывают аэробно или анаэробно стабилизированный избыточный активный ил, имеющий высокое содержание ТМ, которые необходимо извлекать из твердой фазы ОСВ для его безопасного использования в качестве сельскохозяйственного удобрения [2, 7 – 9].

Принцип извлечения ТМ из ОСВ с помощью бактерий *Acidithiobacillus thiooxidans* [10] аналогичен бактериальному выщелачиванию металлов из руд [11]. Из-за малых концентраций общей серы в анаэробно и аэробно стабилизированных ОСВ [3] необходимо добав-

© А.М. Марченко, Г.Н. Пшинко, В.Я. Демченко, В.В. Гончарук, 2015

ление ее восстановленных форм, наиболее дешевой из которых является элементарная сера. При добавлении последней процесс проходит для всех типов ОСВ [12] и в широком интервале температур (7 – 35°C) [13, 14], но эффективность ее использования не превышает 30% в зависимости от дисперсности реагента [15]. Такой процесс не требует введения кислоты для начального снижения рН ОСВ [12, 16], что обусловлено бактериальной сукцессией, при которой ацидофобные бактерии *Thiobacillus thioparus* ответственны за начальное окисление серы при значениях рН, близких к нейтральным [17].

Процесс биовыщелачивания не только снижает содержание патогенных микроорганизмов за счет уменьшения рН ОСВ [12, 15, 17], но также способствует аэробной стабилизации [2, 4, 5, 7, 17]. В связи с затратностью способа биовыщелачивания с использованием серы его предлагают применять для станций очистки сточных вод небольших городов [17, 18].

Механизм биовыщелачивания с помощью *A. thiooxidans* состоит в окислении бактериями серы до серной кислоты, которая и обуславливает переход ТМ в жидкую фазу [2, 7, 15]. При этом наблюдается снижение рН, являющегося существенным для выщелачивания, и повышение  $E_h$  системы [16, 19]. Подтверждением такого механизма является рост концентрации сульфатов в ОСВ [13, 15, 19] и невысокая эффективность выщелачивания Рb(II) [2, 7] (для  $PbSO_4$  характерна низкая растворимость ( $PP(PbSO_4)=1,66 \cdot 10^{-8}$  [20]). Косвенным подтверждением того, что повышение кислотности – определяющий фактор процесса, является снижение эффективности выщелачивания ТМ при высоком содержании твердых веществ в анаэробно и аэробно стабилизированных ОСВ [5, 16, 19], характеризующихся высокой буферной емкостью [19].

Цель данной работы – изучение процесса биовыщелачивания ТМ из ОСВ при создании селективных условий для бактерий, окисляющих серу, на примере аэробно стабилизированного избыточного активного ила (АСИ) Бортнической станции аэрации г. Киева. Для этого проводили эксперименты по биовыщелачиванию ТМ с использованием инокулята тионовых ацидофильных бактерий из ОСВ с добавлением элементарной серы и исследовали рост бактерий на твердых средах с силикагелем.

**Методика эксперимента.** Методика проведения биовыщелачивания. Использовали АСИ Бортнической станции аэрации г. Киева, являющийся, по данным "Киевводоканала", стабилизированной смесью

уплотненного избыточного активного ила, уплотненного избыточного активного ила и обратной иловой воды с иловых полей. В течение двух месяцев (июль – август) было отобрано пять проб АСИ.

Для определения содержания металлов в жидкой фазе АСИ центрифугировали, полученную жидкую фазу подкисляли азотной кислотой. Для определения концентраций металлов в твердой фазе осадок, образующийся при центрифугировании, подсушивали, растирали, разлагали в СВЧ-печи (нагрев до 175°C) концентрированной азотной кислотой, фильтровали через обеззоленные фильтры "синяя лента". Анализ полученных растворов на содержание токсических металлов проводили методами атомно-абсорбционной спектрометрии (ААС) и масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП–МС). Концентрацию  $Fe_{\text{общ}}$  в жидкой фазе определяли фотоколориметрически с сульфосалициловой кислотой ( $pH \sim 1,5$ ,  $C_{\text{ssal}} \sim 0,01 \text{ M}$ ) [21]. Общую концентрацию металлов вычисляли как сумму концентраций в жидкой и твердой фазах.

Аммонийный азот в исходных пробах АСИ определяли по Кьельдалю, а общий азот – по Йодльбауэру [21]. Общее содержание серы определяли с предварительным окислением проб бромной водой [21]. При определении  $S_{\text{общ}}$  в обработанных осадках проводили декантирование непрореагировавшей элементной серы в аликвотах выщелоченного АСИ перед окислением бромом.

Инокулят тионовых ацидофильных бактерий получали аналогично работам [6, 12 – 14, 16]: создавали селективные условия для бактерий, окисляющих серу, добавляя к осадку 1 объем. % элементной серы ( $S^0$ ). Колбы с таким осадком термостатировали при 28°C на подвесной качалке до снижения pH с 7 до 2. В качестве инокулята использовали АСИ, обработанный 0,3 объем. %  $S_0$ , как описано ниже.

При проведения пяти серий опытов по биовыщелачиванию ТМ из АСИ с добавлением  $S^0$  (табл. 1) осадок помещали в круглые плоскодонные колбы объемом 0,5 дм<sup>3</sup>, добавляли 0,15; 0,3 и 0,5 объем. %  $S^0$  "о.с.ч" (не учитывая необработанную серу инокулята) и 10 объем./объем.% инокулята. Закрывали колбы ватно-марлевыми пробками и термостатировали при 28°C на подвесной качалке. Контролировали pH и  $E_h$  ежедневно. Для опытов серий I и II пересевы и измерения концентраций элементов в жидкой фазе проводили по достижении значения pH 2. Для опытов серии III концентрации ТМ в жидкой фазе измеряли в течение всего процесса. В опытах серии IV для замедления роста

бактерий колбы с веществом помещали в холодильник, затем в морозильную камеру, через несколько часов пробы размораживали. Процедуру "замораживание – оттаивание" проводили ежедневно. В опытах серии V в АСИ добавляли 0,15 объем. % S<sup>0</sup>, но не добавляли инокулят. Контролем служили пробы АСИ без внесения S<sup>0</sup> и инокулята. О протекающих процессах судили по изменению рН, E<sub>h</sub> и эффективности выщелачивания, т.е. части ТМ в жидкой фазе осадков от их общего содержания.

Таблица 1. Схемы постановки опытов по биовыщелачиванию тяжелых металлов из избыточного активного ила

Описание постановки опытов	Серия опытов					Контроль*
	I*	II*	III*	IV**	V*	
Объем АСИ, см <sup>3</sup>	180	180	225	225	200	200
Масса S <sup>0</sup> , г	0,3	0,6	1,25	1,25	0,3	–
Объем инокулята, см <sup>3</sup>	20	20	25	25	–	–
Инокулятом является АСИ	Из опытов серии 2					
Кол-во опытов	3	3	2	2	1	3
Кол-во повторностей каждого опыта	2	2	2	1	1	1

\*Ежедневно добавляли дистиллированную воду, учитывая потери воды при испарении; \*\*колбы замораживали и оттаивали каждые сутки.

*Методика получения силикагеля и культивирования бактерий.* В качестве загустителя для приготовления твердых питательных сред использовали силикагель [22]. В ионообменную колонку загружали 150 г сильнокислотного катионита КУ-2-8 и 50 г среднеосновного анионита ЭДЭ-10П. Регенерацию колонки осуществляли серной кислотой. Готовили раствор жидкого стекла, подкисляли до рН ≈ 13 и пропускали через колонку. Отбор элюента начинали при достижении рН ~ 2 и прекращали при резком повышении рН (≥7). В полученном геле (рН 1,8 – 1,9) примеси анионов заменены на сульфат-ионы.

Для выяснения наличия в АСИ тионовых ацидофильных бактерий получали их накопительную культуру, для чего вносили АСИ в пита-

тельную среду Ваксмана с элементарной серой [23, 24]. В качестве контроля использовали стерилизованную и нестерилизованную среды Ваксмана без внесения АСИ. Пересевали их в среду Летена [25] для проверки наличия железосооксиляющих тионовых бактерий. Микроскопию бактерий выполняли согласно [26]. Проводили посевы на твердые среды Летена [25], Ваксмана с тиосульфатом натрия [23, 24, 27] и среду с глюкозой для *Acidiphilium acidophilum* [23] (ранее название *Thiobacillus acidophilus* [24]). В качестве индикатора закисления среды Ваксмана при ее приготовлении добавляли метиленовый голубой и метиловый оранжевый (при начальном рН 4,2 окраска среды – зеленая, после подкисления вследствие жизнедеятельности бактерий – фиолетовая). Среды разливали в чашки Петри и тиндализовали.

**Результаты и их обсуждение.** Снижение рН и рост  $E_h$  (рис. 1, 2) в экспериментах серий I – IV указывают на окисление  $S^0$  до  $H_2SO_4$ , т.е. на прохождение процесса бактериального выщелачивания ТМ. Подтверждением этому служит повышение концентрации общей серы в жидкой фазе АСИ в 10 раз: с начальной 0,0031 до конечной 0,039 моль/дм<sup>3</sup>. Незначительное изменение рН и  $E_h$  контрольных опытов свидетельствует о необходимости внесения элементарной серы как стимулятора роста тионовых ацидофильных бактерий и источника серной кислоты. Результаты опытов (см. рис. 2, б) серии V указывают на необходимость внесения инокулята рассматриваемых бактерий.

Эффективность выщелачивания ТМ в опытах серий I – III (табл. 2) выше, чем в серии V, для всех металлов, кроме Со и Рb. Степень выщелачивания последнего снижается из-за образования  $PbSO_4$  и других малорастворимых его соединений. Как видно из результатов для серий I – III, степень выщелачивания повышается при увеличении количества добавленной элементарной серы для V, Cr, Со, Ni, Cu, Sr, Cd, Рb, Fe и колеблется для Mn, Ga, As, Rb, Ba, U. Наиболее высокая степень выщелачивания наблюдается для  $Fe_{\text{общ}}$ , концентрация которого в жидкой фазе составляет  $\sim 1,5 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup>.

Из сопоставления графиков изменения концентраций ТМ в жидкой фазе (рис. 3, 4) с графиками изменения рН видно, что в первые сутки процесса снижение рН является основным фактором выщелачивания ТМ. Действительно, изменение рН в опытах серии III происходит быстрее, чем в остальных, а степень выщелачивания наиболее высокая, в то время как изменение  $E_h$  близко к таковому в серии IV, и точно такое, как для серии V и контрольных опытов.

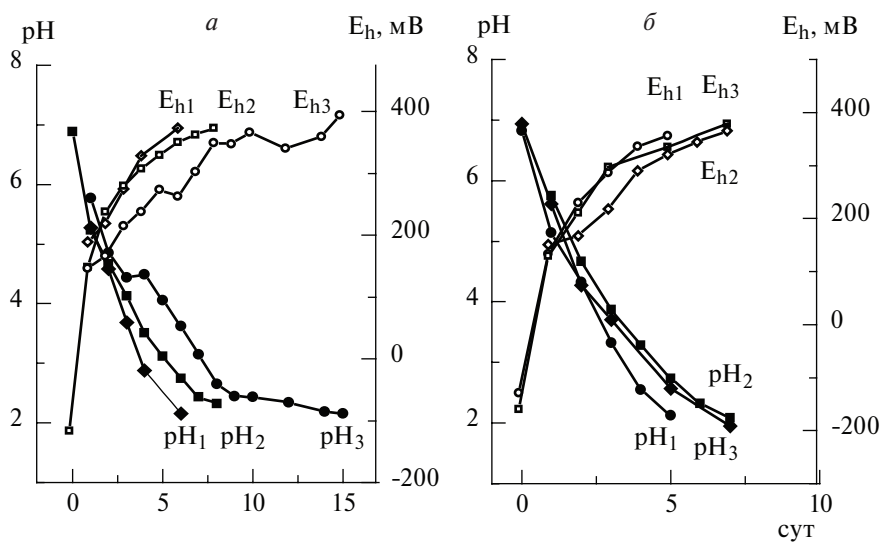


Рис. 1. Изменение  $pH$  и  $E_h$  аэробно стабилизированного ила в опытах серий I (а) и II (б). В индексе указан порядок опыта в серии. Контрольные опыты обозначены индексом К.

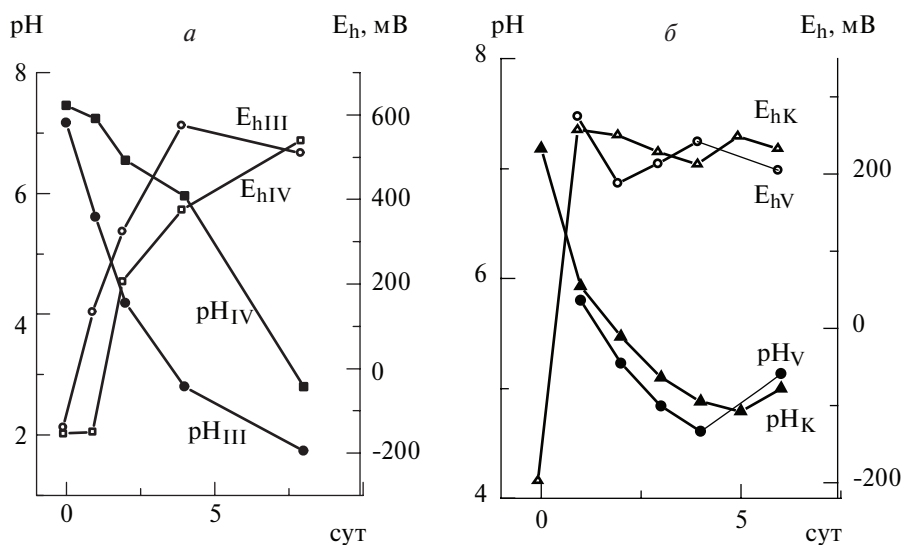


Рис. 2. Изменение  $pH$  и  $E_h$  аэробно стабилизированного ила в опытах серий III, IV (а), а также V и контрольном опыте К (б).

АСИ по окончании опытов серий I и II имел влажность соответственно  $99,0 \pm 0,2$  и  $98,8 \pm 0,2\%$  ( $98,6 \pm 0,3\%$  для исходного АСИ [9]). Зольность

АСИ составляла соответственно  $21,5 \pm 0,6$  и  $18,7 \pm 1,4\%$  ( $27,4 \pm 0,7\%$  для исходного [9]). Такие результаты обусловлены растворением минеральных веществ при уменьшении рН осадка.

Таблица 2. Эффективность биовыщелачивания токсических компонентов

Элемент	Серия опытов				Конт-роль	Элемент	Серия опытов				Конт-роль
	1	2	3	5			1	2	3	5	
V	17	22	22	0,6	0,62	As	34	46	37	14,6	14,4
Cr	4	4,5	7	0,2	0,27	Rb	29	27	28	27,8	22,7
Mn	46	67	56	18,2	13,9	Sr	43	46	57	21,2	16,2
Co	18	18	22	36,2	28,3	Cd	44	78	88	3,4	1,7
Ni	23	22	31	9,4	6,7	Ba	4	3	3	1,1	0,7
Cu	22	20	27	13,4	6,4	Pb	4	3	18	14,9	2,3
Zn	—	—	46	3,5	3,2	U	2,5	1	4	2,2	2,0
Ga	3	3	4	0,7	0,4	Fe	42	61	—	—	0,55

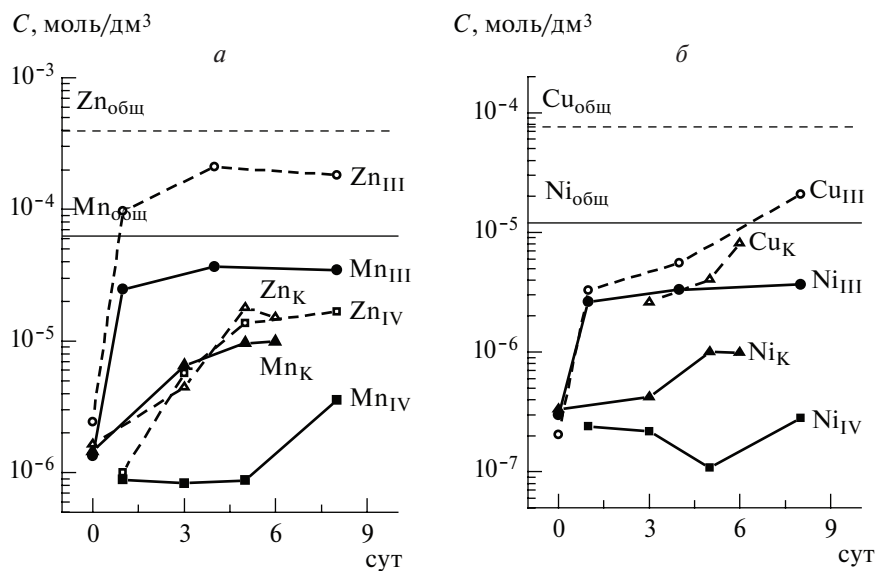


Рис. 3. Изменение концентраций цинка и марганца (а), меди и никеля (б) в жидкой фазе аэробно стабилизированного ила в опытах серий III и IV.

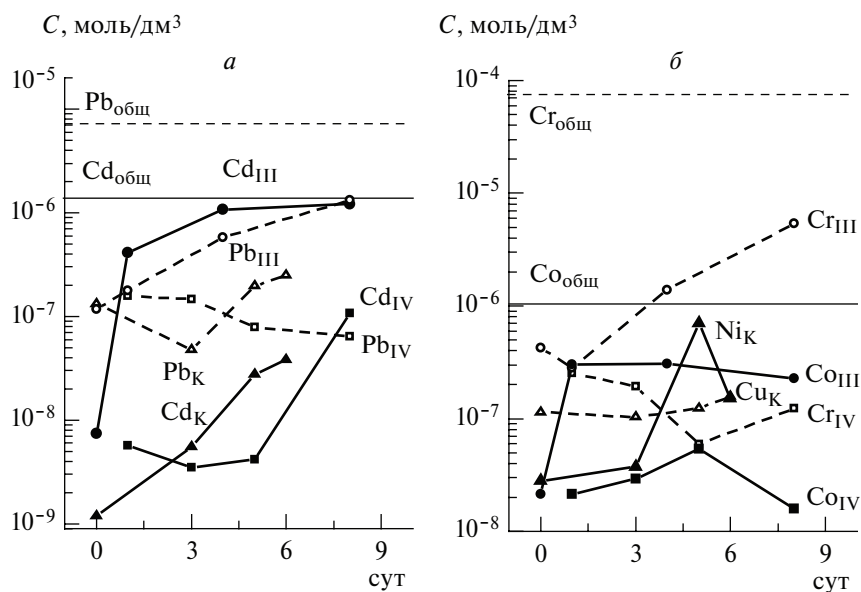


Рис. 4. Изменение концентраций свинца и кадмия (а), хрома и кобальта (б) в жидкой фазе аэробно стабилизированного ила в опытах серий III и IV.

Концентрация аммонийного азота (по Кьельдалю) в выщелоченном осадке составляла  $0,7 \pm 0,2$  г/дм<sup>3</sup>, уменьшаясь с  $0,94 \pm 0,12$  г/дм<sup>3</sup> для исходного, что указывает на валовые потери азота и необходимость их учета в газообразном виде, а не только за счет перехода из твердой фазы в жидкую.

При посевах исходного АСИ в питательную среду Ваксмана ( $pH_{нач}$  4,2) обильный рост тионовых ацидофильных бактерий [28] наблюдался на пятые сутки при  $pH_{кон}$  1,5 ( $E_{п кон}$  = 620 мВ через 12 сут). При посеве накопительной культуры на твердую среду Ваксмана образовывались прозрачные колонии вдоль мазка (наблюдали при увеличении  $\times 60$ ), имеющие в местах обильного роста кремовый цвет и размытые края, а также кристаллы гипса в центре колоний, и этим схожие с колониями *A. thiooxidans* [27]. При посеве колоний на среду с глюкозой рост отсутствовал, из чего заключили, что бактерии являются хемолитоавтотрофами. При окраске по Граму наблюдали ( $\times 1000$ ) грамотрицательные палочки (не более 2 – 3 мкм в длину, тонкие).

**Выводы.** Показано, что бактериальное выщелачивание ТМ из ОСВ при добавлении элементарной серы как стимулятора активности тионовых ацидофильных бактерий происходит путем бактериального окисления элементарной серы с выделением серной кислоты. Вследствие



этого снижается рН осадков, что является определяющим фактором для эффективности выщелачивания ТМ.

**Резюме.** Проведено експерименти з бактеріального вилуговування важких металів з аеробно стабілізованого надлишкового активного мулу Бортницької станції аерації м. Києва при додаванні елементної сірки як стимулятора активності тіонових ацидофільних бактерій. Показано, що зниження рН осадів впродовж процесу визначає ефективність вилуговування важких металів.

*A.M. Marchenko, G.N. Pshinko, V.Ja. Demchenko, V.V. Goncharuk*

## **BIOLEACHING OF HEAVY METALS FROM SEWAGE SLUDGE BY SULFUR-OXIDIZING BACTERIA**

### Summary

Experiments on bioleaching of heavy metals from aerobically digested secondary sludge, produced in Bortnytska sewage treatment plant (Kiev), with addition of elemental sulfur as growth stimulant for acidophilic thiobacilli, were done. It is shown, that lowering of sludge pH during this process determines leaching effect for heavy metals.

### Список использованной литературы

- [1] *Ito A., Umita T., Aizawa J., Takachi T., Morinaga K.* // *Water Res.* – 2000. – **34**. – P. 751 – 758.
- [2] *Babel S., del Mundo Dacera D.* // *Waste Management.* – 2006. – **26**. – P. 988 – 1004.
- [3] *Tyagi R.D., Couillard D., Tran F.* // *Environ. Pollut.* – 1988. – **50**. – P. 295 – 316.
- [4] *Benmoussa H., Tyagi R.D., Campbell P.G.C.* // *Water Res.* – 1997. – **31**. – P. 2638 – 2654.
- [5] *Tyagi R.D., Blais J.F., Meunier N., Benmoussa H.* // *Ibid.* – 1997. – **31**. – P. 105 – 118.
- [6] *Zhang P., Zhu Y., Zhang G., Zou S., Zeng G., Wu Z.* // *Biores. Technol.* – 2009. – **100**. – P. 1394 – 1398.
- [7] *Pathak A., Dastidar M.G., Sreekrishnan T.R.* // *J. Environ. Manag.* – 2009. – **90**. – P. 2343 – 2353.

- [8] Wong L., Henry J.H. // Water Sci. and Technol. – 1984. – 17. – P. 575 – 586.
- [9] Marchenko O.M., Pshinko G.N., Demchenko V.Ja. // J. Water Chem. and Technol. – 37, N4. – С. 375 – 383.
- [10] Waksman S.A., Joffe J.S. // J. Bacteriol. – 1922. – 7. – P. 239 – 256.
- [11] Krebs W., Brombacher C., Bosshard P.P., Bachofen R., Brandl H. // FEMS Microbiol. Rev. – 1997. – 20. – P. 605 – 617.
- [12] Blais J.F., Tyagi R.D., Auclair J.C. // Water Res. – 1993. – 27. – P. 101 – 110.
- [13] Blais J.F., Tyagi R.D., Auclair J.C. // Ibid. – 1993. – 27. – P. 110 – 120.
- [14] Tyagi R.D., Sreekrishnan T.R., Blais J.F., Campbell P.G.C. // Ibid. – 1994. – 28. – P. 2367 – 2375.
- [15] Blais J.F., Tyagi R.D., Auclair J.C., Lavoie M.C. // Ibid. – 1992. – 26. – P. 487 – 495.
- [16] Jain D.K., Tyagi R.D. // Biores. Technol. – 1993. – 45. – P. 33 – 41.
- [17] Blais J., Meunier N., Mercier G., Drogui P., Tyagi R. // J. Environ. Eng. – 2004. – 130. – P. 516 – 525.
- [18] Sreekrishnan T.R., Tyagi R.D. // Proc. Biochem. – 1996. – 31. – P. 31 – 41.
- [19] Sreekrishnan T.R., Tyagi R.D., Blais J.F., Campbell P.G.C. // Water Res. – 1993. – 27. – P. 1641 – 1651.
- [20] Кумок В.Н., Кулешова О.М., Карабин Л.А. Произведения растворимости. – Новосибирск: Наука, 1983. – 266 с.
- [21] Лурье Ю.Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод. – М.: Химия, 1984. – 448 с.
- [22] Kingsbury J.M., Barghoorn E.S. // Appl. Microbiol. – 1954. – 2. – P. 5 – 8.
- [23] Atlas R.M. Handbook of media for environmental microbiology. – [2<sup>nd</sup> ed.] – Boca Raton: CRC Press, 2005. – 664 p.
- [24] *The Prokaryotes*. – [3<sup>rd</sup> ed.] / Ed. M. Dworkin. – Singapore: Springer, 2006. – Vol. 5. – 919 p.
- [25] Leathen W.W., Kinsel N.A., Braley S.A. // J. Bacteriol. – 1956. – 72. – P. 700 – 704.
- [26] Егоров Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии: Учеб. пособ. – М.: Изд-во МГУ, 1995. – 224 с.
- [27] Waksman S.A. // J. Bacteriol. – 1922. – 7. – P. 605 – 608.
- [28] *Определитель бактерий Берджи*: В 2-х т. / Под ред. Дж Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. – М.: Мир, 1997. – Т. 2. – 368 с.

Поступила в редакцию 06.08.2014 г.