

## “РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ПРИМЕНЕНИЯ РЕАКТИВА НЕССЛЕРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЫРОЙ БИОМАССЫ”

**Чулиев Худоёр Шухратович**  
*независимый исследователь*

*Аннотация: Это статья посвящена определению сырой биомассы и количества микроорганизмов, жизнедеятельность которых осуществляется в биореакторах, участвующих в производственных процессах завода ГМЗ-3, комплекса “БИОКС” НГМК, расположенного в г. Учкудук НГМК. В научной литературе приведено большое количество сведений по изучению количества биомассы и микроорганизмов, к которым относится микроскопический метод учета, метод жидкого разведения по Мак-Креди, метод учета колоний микроорганизмов в чашках Петри и др., однако, все эти методы трудоемки и требуют расхода дефицитных реактивов и длительного времени (от 2 до 15 дней). На производстве, при непрерывном производственном процессе для определения биомассы микроорганизмов требуется в весьма ограниченное, короткое время проведения анализов в пределах 2-4 часов, при которых необходим количественный учет микроорганизмов.*

*Целью этой статьи является изучение на базе ГМЗ-3, комплекса “БИОКС”, с применением реактива Несслера создать методику количественного экспресс метода учета сырой биомассы микроорганизмов.*

**Ключевые слова:** биомасса, микроорганизм, биореактор, реактив, микроорганизм, микроскопический метод, анализ, комплекс, реактив Несслера, опыт, биотехнология, сельского хозяйства, физико-химические параметры, технологическое значение.

### ВВЕДЕНИЕ

Мировой опыт многих стран свидетельствует о том, что подъем в национальной экономике начинается с гидрометаллургической промышленности, в частности развития золотопромышленного комплекса, где применяются экономически эффективные методы биотехнологии, где принимают участие различные виды микроорганизмов. сельского хозяйства.

В частности, в республике Узбекистан функционирует такое предприятие в г. Учкудук, на заводе ГМЗ-3 НГМК. Комплекс «БИОКС»



предназначен для выщелачивания золота из сульфидных руд с применением тионовых ацидофильных микроорганизмов.

Как установлено многочисленными исследованиями, процессы бактериального окисления и выщелачивания могут протекать активно только при создании благоприятных для жизнедеятельности бактерий условий среды обитания. Все основные параметры, определяющие эти условия можно разделить на три большие группы – физико-химические, биологические и технологические параметры. В частности, в группу биологических параметров относится изучение адаптационных свойств культуры, концентрация биомассы, активность биомассы и использование сообщества культур.

Практика бактериального выщелачивания золотомышьяковых концентратов показала, что наиболее интенсивно процесс идет при температуре 40° С, когда помимо мезофильных бактерий *A.ferrooxidans*, *A.thiooxidans* и *Leptospirillum ferrooxidans* присутствуют умеренные термофилы, которые принимают участие в окислении сульфидов при температуре 40...45° С.

Для нормального роста и развития бактерий требуется наличие в среде минеральных солей (биогенов), и в первую очередь соединений азота и фосфора, которые используются бактериями в энергетическом метаболизме.

При бактериальном выщелачивании с использованием культуры *A.ferrooxidans*, применяется среда Сильвермана и Лундгрена, называемая - среда 9К, в состав которой входят, в г/л:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 3,0 г; КСl - 0,1 г;  $\text{K}_3\text{PO}_4$  - 0,5 г;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,5 г;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  - 0,01 г;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 44,2 г.

Иногда вместо  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  используют соль Мора  $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (63г/л), в этом случае  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  в среду не добавляют. При таком составе, содержание  $\text{Fe}^{2+}$  в среде составляет около 9 г/л. Иногда используют среду 9К/2, в которой содержание  $\text{Fe}^{2+}$  уменьшается в 2 раза, или 9К/4, в которой количество  $\text{Fe}^{2+}$  уменьшается в 4 раза (табл. 2.3.3.).

При бактериальном выщелачивании сульфидсодержащих концентратов железо не подается, а вместо солей азота и фосфора применяются удобрения типа аммофоса (0,5 г/л). Если же в концентратах содержится фосфор, например в виде апатита, то соли фосфора можно в среду не подавать [31].

Очень важное технологическое значение имеет тот факт, что приобретенные адаптивные свойства бактерий, т.е. их повышенная устойчивость к ингибирующим ионам происходит только за счет



мутагенных изменений при реализации возможностей их организмов при изменении среды обитания, но без изменения их генотипа.

Процесс адаптации довольно длительный. В промышленных условиях он обычно совмещается с заполнением емкостей выщелачиваемой пульпы при Т:Ж = 1:4, 1:5 в присутствии  $Fe^{2+}$ , питательных солей, температуре 32-35<sup>0</sup>С, при высокой степени аэрации. Активность культуры по мере ее адаптации контролируется степенью окисления  $Fe^{2+}$ , повышением концентрации общего железа, изменением величины рН и ОВП, и обязательно скоростью подачи пульпы. Последнее тесным образом связано со скоростью роста бактерий и концентрацией биомассы.

Так, концентрация клеток при окислении закисного железа увеличивается с  $10^3$ - $10^4$  до  $10^8$  кл/мл при увеличении D с 0 до 0,04 ч<sup>-1</sup> и остается постоянной до D, равной 0,08 ч<sup>-1</sup>. При дальнейшем увеличении скорости разбавления (выше 0,08- 0,09 ч<sup>-1</sup>) концентрация клеток уменьшается за счет их вымывания. При этом достигается скорость окисления железа 0,6 г/л\*ч. Максимальная удельная скорость роста биомассы  $V_m$  в этих условиях достигает 0,15 ч<sup>-1</sup>. Получение более высоких скоростей окисления железа, значительно превышающих 0,6 г/л\*ч, в условиях одностадиального хеMOSTатного культивирования практически невозможно.

Для определения биомассы в технологических процессах выщелачивания применяется экспресс метод, основанный на центрифугировании, по которому количество клеток пересчитывается по формуле:

$$x = m * 3,8 * 10^9 \quad (2)$$

где x - количество клеток в мл;

m - масса бактерий, г/л по сырому весу.

Применяемые методы концентрирования клеток позволяют повысить их концентрацию до 3-5 г/л и более, или  $10^{10}$ -  $10^{11}$  кл/мл.

При бактериальном окислении закисного железа, использование иммобилизованной биомассы на твердом носителе позволяет в 2-3 раза уменьшить время окисления.

Степень изученности проблемы. Среди параметров, определяющих эффективность бактериального выщелачивания чановым методом, особое значение приобретают такие специфичные для этого процесса параметры, как плотность выщелачиваемой пульпы, крупность и способ подготовки продукта к выщелачиванию, способ перемешивания и аэрации, схема выщелачивания, методы переработки оборотных растворов, требования к



продуктам выщелачивания и т.п. Эти параметры определяют, прежде всего, технологическую схему, режим процесса и его аппаратное оформление.

Создание оптимальных условий для жизнедеятельности микроорганизмов в плотной пульпе возможно только при постоянной смене раствора.

Все вышеуказанные методы определения количества сырой биомассы не позволяют в короткое время провести количественный учет микроорганизмов и поэтому предложено применение реактива Несслера для учета сырой биомассы. Для проведения качественного и количественного анализа применяются различные типы реактивов. В широком смысле реактивами или реагентами называют вообще все вещества, употребляемые в химической лабораторной практике для воспроизведения различных химических превращений или реакций. В более тесном значении под этим названием подразумевают обыкновенные вещества, составленные из двух или более веществ и их растворы, употребляемые при химическом анализе для определения качественного и количественного состава веществ, их свойств или химической функции и химического строения. Большинство реактивов контролируют по двум-трем характеристикам, некоторые, например, применяемые в биологических и спектральных исследованиях – более чем по 20 определяемым факторам.

Один из таких реактивов - реактив Несслера представляет собой щелочной раствор комплексной соли калия тетраиодатамеркурата (II) дигидрата  $K_2[HgJ_4]$  в КОН. При взаимодействии с  $NH_3$  и гуанидинами образует красно-коричневый осадок, с органическими восстановителями (например, с первичными и вторичными спиртами, альдегидами) – осадок металлической ртути. Применяется для обнаружения различных соединений а также для колориметрического определения небольших количеств (около  $10^{-3}\%$  по объему) аммиака. Если прибавить к капле разбавленного раствора соли аммония 1-2 капли раствора реактива Несслера.

При проведении анализов на присутствие ионов аммония в биокеке с рН 2,1 было обнаружено нехарактерное для реактива Несслера образование черного осадка с появлением обособленных, прозрачных, желатиноподобных соединений светло-коричневого цвета, налипших на стенки пробирки. Эти соединения легко отмывались от минеральных частиц. Анализ нингидрином или биуретовым методом показал присутствие свободных аминокислот. В биокеке во всех вариантах с низким рН было



отмечено появление черного осадка и наличие органических белковых соединений.

Цель исследования: с учетом применения реактива Несслера для обнаружения ионов аммония, а также для обнаружения органических белковых соединений, которые денатурируясь, выпадают отдельно от минеральных частиц в виде желатиноподобных прозрачных веществ светлороманевого цвета, было решено применить его для определения биомассы микроорганизмов.

### **ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ:**

1. Создание лабораторных установок по имитации биореакторов и подбор необходимых соотношений Т:Ж для максимального получения биомассы микроорганизмов;

2. Наблюдение за активностью микроорганизмов в составе жидкой фазы применением метода микроскопирования;

3. Подбор доз и концентраций реактива Несслера для выделения сырой биомассы микроорганизмов;

4. Разработка оптимальной методики применения реактива Несслера для учета сырой биомассы микроорганизмов.

Научная и практическая значимость результатов исследования: Научной значимостью работы является использование реактива Несслера для определения сырой биомассы тионовых, ацидофильных микроорганизмов в пульпе сульфидных концентратов методом отстаивания и выделения жидкой фазы.

Практической значимостью полученных результатов является разработка нового метода применения реактива Несслера для определения сырой биомассы тионовых микроорганизмов в реакторах БИОКС.

Экономическая эффективность или значимость работы.

Основными экономически эффективными или значимыми результатами полученными, при выполнении данной научно-исследовательской работы являются следующие:

1. В результате применения реактива Несслера будут определены основные параметры учета сырой биомассы микроорганизмов с целью определения активности микроорганизмов и последующим принятием решений для увеличения биомассы;

2. Высокая концентрация биомассы микроорганизмов позволяет увеличить степень окисления сульфидных минералов – пирита и арсенопирита, позволяющие увеличить степень выщелачивания золота с последующим сорбционным извлечением.



Объект и предмет исследования. Объектом исследования является пульпу сульфидных концентратов из реакторов БИОКС НГМК для последующего изучения сырой биомассы в его составе с применением реактива Несслера.

Методы исследования. Физико-химические методы анализа, Фурье ИК-спектроскопический, а также физико-механические методы исследования и испытаний, а также микроскопический количественный анализ микроорганизмов.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Характеристика флотоконцентратов пульпы из реакторов БИОКС;
- Роль микрофлоры пульпы при выщелачивании сульфидов в реакторах БИОКС;
- Подбор доз и концентраций реактива Несслера для максимального выпадения сырой биомассы в осадок для последующего измерения его массы;
- Разработка способа применения реактива Несслера для экспресс учета сырой биомассы микроорганизмов;
- Перспективы применения нового метода определения сырой биомассы тионовых микроорганизмов с применением реактива Несслера

### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Положение о санитарной лаборатории на промышленном предприятии (типовое № 832-69). - М., 1969.
2. Инструкция по методическому руководству ведомственными лабораториями контроля и качества вод. - М., 1979.
3. Правила охраны поверхностных вод от загрязнения сточными водами (№ 1166-74). - М., 1974.
4. Лурье Ю.Ю., Рыбникова А.И. Химический анализ производственных сточных вод. - М., 1974.
5. Рекомендации по методам производства анализов на сооружениях биохимической очистки промышленных сточных вод. - М., 1970.
6. Методика технологического контроля работы очистных сооружений городских канализаций. - М., 1977.
7. Унифицированные методы исследования качества воды. - М., 1975.
8. Лейте В. Определение органических загрязнений питьевых и сточных вод. - М., 1975.



9. Руководство по химическому и технологическому анализу воды. - М., 1973.
10. Коган С.Г. Биохимическая очистка сточных вод свинооткормочных комбинатов. Автореф. канд. дис. - Л., 1974.
11. Унифицированные методы анализа сточных вод. - М., 1971.
12. Гурьянова Е.М., Новикова Л.С., Бахрах И.М. Методы определения органических веществ в сточных водах от свиноферм. - В кн.: Сборник трудов ЛИСИ, 1973.
13. Преображенская А.С., Сорокина Н.И. Сравнительная оценка модифицированных методов определения растворенного кислорода и БПК в фенольных сточных водах ШПЗ в присутствии большого количества нитритов. - В кн.: Методические материалы и научные сообщения. ВНИИ железнодорож. гигиены, 1971, вып. 36.
14. Общесоюзные нормы технологического проектирования систем удаления обработки, обеззараживания, хранения и утилизации навоза и помета. - М., 1979.
15. Arial I., Humenik F and al. Bod analysis of swine waste as affected by feed additives Intern simposium on livestock wastes proceeding. - USA, Columlus, ohio 1971.

