

Утилизация и биodeградация отходов

УДК 628.38:615.9

DOI: 10.25514/CHS.2018.2.14120

**ПРОБОПОДГОТОВКА И БИОТЕСТИРОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ
ИЛОВЫХ ОСАДКОВ СТОЧНЫХ ВОД**

А. В. Игнатенко

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

Поступила в редакцию 23.11.2018 г.

Аннотация – Рассмотрены достоинства и недостатки физико-химического и биологического подходов к оценке химической безопасности осадков сточных вод городских очистных сооружений. Представлены результаты пробоподготовки и биотестирования токсичности иловых осадков с помощью теста на выживаемость клеток микроводоросли *E. gracilis*. Проведен анализ токсичности гидрофильных и гидрофобных веществ, выделенных из осадков водной экстракцией, обработкой гексаном и желчью. Предложена последовательная схема термообработки осадков при 20°C, 100°C, 270°C, 550°C для анализа содержания свободных и связанных форм токсичных веществ. Оценка текущей и потенциальной химической опасности осадков сточных вод позволит правильно выбрать способы их детоксикации и переработки.

Ключевые слова: осадки сточных вод, химическая безопасность, токсичность, пробоподготовка, токсичные вещества, тяжелые металлы, биотестирование, тест на выживаемость, клетки *E. gracilis*.

**SAMPLE PREPARATION AND BIOTESTING TOXICITY OF SEWAGE
SLUDGE WASTES**

A. V. Ignatenko

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

Received November 23, 2018

Abstract – Potential benefits and drawbacks of physicochemical and biological approaches for evaluating toxicity of sewage sludge are considered. A procedure for sample preparation and biotesting of sewage sludge toxicity by survival test with *Euglena gracilis* cells has been developed. The toxicity analysis of hydrophobic and hydrophilic substances isolated from sediments by hexane and bile extraction has been carried out. A sequential scheme of water extraction followed by stepwise heat treatment of sewage sludge at 20°C, 100°C, 270°C, and 550°C is proposed for analysis of free and bound forms of heavy metals. The proposed approach for assessment of current and potential chemical hazard of sewage sludge wastes will allow to estimate their safety and select an appropriate procedure for their detoxification and subsequent treatment.

Keywords: sewage sludge, chemical safety, toxicity, sample preparation, toxic substances, heavy metals, biotesting, survival test, *Euglena gracilis* cells.

ВВЕДЕНИЕ

Осадки сточных вод – крупнотоннажный отход городских очистных сооружений, который обладает высокой биологической и энергетической ценностью и одновременно представляет высокую опасность для окружающей среды.

Переработка и использование осадков сточных вод очистных сооружений является актуальной эколого-биотехнологической задачей, решение которой позволяет не только защитить от загрязнений окружающую среду, но и дополнительно получить энергоносители, кормовые добавки, органоминеральные удобрения и др. [1–3].

В связи с существующей практикой объединения бытовых и промышленных сточных вод на городские очистные сооружения поступают стоки с непостоянным химическим составом, которые могут содержать токсичные вещества органической и неорганической природы.

В общей сложности в осадках сточных вод могут одновременно присутствовать сотни наименований различных веществ. Наиболее часто встречаемыми и одними из опасных загрязнителей осадков являются тяжелые металлы. Они не подвергаются химическому разрушению, а переходят из свободного в связанное состояние и обратно, накапливаясь в биоценозах и мигрируя по пищевым цепям, угрожая здоровью человека и животных [4].

На городских очистных сооружениях сложилась парадоксальная ситуация: почти все предприятия, сбрасывающие сточные воды в городскую канализацию, укладываются в нормативные требования по содержанию тяжелых металлов, а в осадках сточных вод очистных сооружений их содержание намного превышает нормативные требования. Такая ситуация не объясняется разовыми залповыми выбросами металлов с предприятий в результате нарушений технологических процессов и связана с сильной аккумулярующей способностью микроорганизмов активного ила, накапливающих данные вещества в десятки тысяч раз больше, чем их содержится в сточных водах [5].

Практика использования осадков сточных вод в качестве удобрений в сельском хозяйстве, широко применявшаяся до середины 1990-х годов, привела к загрязнению почв тяжелыми металлами и показала, что без обработки и без контроля безопасности осадки для этой цели использовать нельзя.

В результате принятия СанПиН 2.17.573 – 96 и других нормативных документов бесконтрольное применение осадков сточных вод в качестве удобрений в РФ было запрещено, и регламентированы требования к их химической и биологической безопасности, допустимые нормы содержания тяжелых металлов и других веществ при использовании осадков в качестве удобрений в сельском хозяйстве, в лесопитомниках и садоводческих хозяйствах, для ремедиации почв [6–8].

В настоящее время в РФ перерабатывается около 10% осадков сточных вод, а в качестве удобрений используют не более 4–6%, в то время как за рубежом – более 30% [9].

Для контроля химической безопасности сточных вод и осадков существует два основных подхода: физико-химический и биологический [10].

Наиболее широко используется физико-химический подход. Он основан на проведении полного химического и минералогического анализа сточных вод и осадков, обнаружении в них отдельных опасных химических веществ и оценки их концентраций инструментальными физико-химическими методами анализа. К основным недостаткам физико-химического подхода относятся: отсутствие сведений о ПДК большинства веществ, высокая трудозатратность и стоимость полного химического и минералогического анализа, необходимость высокой квалификации сотрудников, невозможность проконтролировать опасность всех чужеродных веществ и их комбинаций. Поэтому физико-химический контроль целесообразнее применять не на стадии обнаружения опасных веществ, а на стадии идентификации их природы.

Для гарантированного контроля безопасности осадков очистных сооружений и одновременного снижения стоимости анализа целесообразнее использовать биологический подход, который основан на способности живых организмов реагировать на присутствие любых опасных веществ в различных комбинациях. Данный подход может быть реализован в виде биоиндикации, биотестирования, биосенсорного анализа.

Наиболее часто на практике применяют метод биотестирования, который определяет безопасность среды по изменению интегральных показателей жизнедеятельности отобранных тест-культур в лабораторных условиях, проявляющих высокую чувствительность к опасным ксенобиотикам.

В связи с запретом на использование высших форм живых организмов для контроля химической безопасности веществ, основными тест-организмами служат низшие одноклеточные прокариотические и эукариотические гидробионты (бактерии, микроводоросли, простейшие, ракообразные), не требующие высоких затрат на их содержание [11–13].

Контроль химической безопасности осадков биологическим методом проводится по показателям токсичности, мутагенности, канцерогенности и др. Одним из наиболее часто и широко используемых показателей химической безопасности являются результаты тестов на токсичность [14–16].

О степени опасности различных веществ можно судить по их влиянию на функции жизнедеятельности живых организмов: выживаемость, размножение, дыхание, подвижность и др. По данным EPA (Environmental Protection Agency) США, в настоящее время существует более 100 тест-объектов, и известно около 5000 их тест-реакций на опасные вещества [17].

Биотестирование широко применяется для оценки токсичности сточных вод, однако, оно еще недостаточно часто используется на практике для анализа безопасности осадков, что связано со сложностью процесса пробоподготовки.

Существующие способы пробоподготовки предназначены в основном для оценки безопасности осадков с помощью физико-химического подхода и не подходят для биотестирования из-за использования в них агрессивных сред, нарушающих процессы жизнедеятельности тест-культур.

Для биотестирования токсичности осадков необходимо использовать нейтральные химические реагенты или физические воздействия, способствующие выделению связанных токсичных веществ, но не

оказывающих дополнительного влияния на используемые тест-культуры. Это ограничивает число доступных способов пробоподготовки.

Знание уровня, природы токсичности осадков сточных вод и форм связи веществ в осадках позволит целенаправленно подбирать технологии их детоксикации.

Целью данной работы являлась разработка схемы пробоподготовки и биотестирования химической безопасности иловых осадков сточных вод и определения природы и уровня токсичности их отдельных фракций.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы

Объектом исследования служили осадки сточных вод Минской очистной станции после илоуплотнителей. Для биотестирования использовали трехсуточную культуру клеток микроводоросли *E. gracilis* из коллекции кафедры биотехнологии БГТУ, выращенную на свету в среде Лозино-Лозинского [18].

В работе применяли следующее оборудование: муфельную печь – СНОЛ-1.6 2.5 1/1, термостат суховоздушный ТС-80М-2, спектрофотометр СРЕКОЛ-1300, центрифугу Hettich модель ЕВА-2, микроскоп ЛОМО ЕС Р11, аналитические весы Sartorius CPA225D, дистиллятор А-10, мембранную установку Ключ-М и мембранные фильтры Nerox, ЗАО НПП «Симпекс», цифровую камеру Canon Power Shot A3300 IS, а также программное обеспечение Adobe Photoshop CS3, СВЧ-печь Samsung CE935GR, автоматические дозаторы жидкости АW-2-2000 наконечники пластмассовые для автоматических дозаторов HTL DISPOSABLE TIPS. Измерение рН растворов выполняли на рН-метре Hanna pH 211.

В качестве реагентов служили: этилендиамин N,N,N,N-тетрауксусной кислоты динатриевая соль двухводная (ЭДТА), х.ч.; желчь КРС сухая очищенная по ТУ 10.02.01.112-89 (РФ); ZnSO₄·7H₂O (ос. ч); FeSO₄ (х.ч.); CuSO₄ (х.ч.); K₂Cr₂O₇ (х.ч.); Cr₂O₃ (х.ч.), Cd(CH₃COO)₂·2H₂O (х.ч.); CoCl₂ (х.ч.).

Приготовление водных вытяжек осадков осуществляли с учетом методических рекомендаций [19, 20].

Для получения сырого осадка 1 л иловой смеси помещали в коническую колбу Бунзена, отстаивали в течение 2 ч. Надосадочную жидкость центрифугировали 10 мин при 6000 об/мин и использовали для биотестирования. Нижнюю часть (сырой осадок) сливали и делили на 3 равные части.

Первую часть сырого осадка подвергали водной экстракции при 20°С в течение 2 ч, затем центрифугировали при 6000 об/мин, 10 мин. Надосадочную жидкость и использовали для биотестирования токсичности водной вытяжки. Осадок взвешивали, часть его заливали нагретой дистиллированной водой, а часть 0,1% раствором желчи в соотношении 1 : 10, выдерживали 1 ч на водяной бане при 100°С в закрытых бюксах при перемешивании, после чего фильтровали через бумажный фильтр (белая лента), центрифугировали при 6000 об./мин в течение 10 мин и биотестировали токсичность надосадочной жидкости.

Вторую часть сырого осадка высушивали на воздухе в чашке Петри до постоянной массы при 20°C, 1 сут. и определяли его влажность стандартным гравиметрическим методом [21]. Далее навеску высушенного осадка, в пересчете на абсолютно сухую массу, заливали свежеприготовленной дистиллированной водой в соотношении 1 : 10 и проводили водную экстракцию веществ на магнитной мешалке в закрытых емкостях в течение 2 ч при 20°C, а затем водой и 0,1% желчью при 100°C, как описано выше.

Далее осадок после водной экстракции при 100°C высушивали до постоянной массы в СВЧ печи и помещали в муфельную печь на 1 ч при 270°C.

После охлаждения из части образца готовили водную вытяжку для биотестирования ее токсичности. Оставшуюся часть осадка минерализовали при 550°C, 2 ч, после чего приготавливали водную вытяжку и биотестировали ее токсичность.

Дополнительно проводили минерализацию исходного высушенного ОСВ при 550°C в течение 2 ч с последующим получением водной вытяжки для анализа ее токсичности.

Третью часть сырого осадка сушили в СВЧ-печи до постоянной массы при $f = 2450$ МГц, $P = 600$ Вт и подвергали последовательной водной экстракции и термообработке при 20°C, 100°C, 270°C, 550°C, как описано выше. Полученные водные вытяжки использовали для измерения токсичности проб методом биотестирования.

Высушенный осадок сточных вод использовали также для оценки токсичности гидрофобных веществ. Для этого к 1 ч сухого растертого в фарфоровой ступке осадка добавляли 1 ч гексана и выдерживали смесь в закрытых емкостях в течение 1 ч при встряхивании. Отбирали гексановый экстракт и упаривали его в роторном испарителе под вакуумом в течение 4–24 ч. После этого к сухому экстракту добавляли 10 мл 0,1% раствора желчи, взбалтывали и отбирали образцы для биотестирования их токсичности.

Биотестирование токсичности приготовленных водных вытяжек осуществляли по изменению выживаемости клеток *E. gracilis*. Для этого к 0,5 мл анализируемой вытяжки (рабочий образец) или дистиллированной воды (контрольный образец) добавляли по 0,5 мл тест-культуры клеток и выдерживали в течение 1 сут. при 20°C.

Подсчет числа клеток тест-культуры осуществляли микроскопированием образцов в камере Горяева при увеличении 15×10. Определение количества подвижных и неподвижных клеток микроводоросли проводили видеосъемкой в течение 0,5–1 мин с помощью цифровой фотокамеры. Перед заполнением камеры Горяева образцы разбавляли водой в соотношении 1 : 1 для подсчета живых клеток или этиловым спиртом 1 : 1 для подсчета общего количества убитых клеток.

Подсчитывали клетки в 10 больших квадратах сетки, перемещая их по диагонали. Общее количество подсчитанных клеток было не менее 600. Количество клеток в 1мл суспензии рассчитывали по формуле

$$N = (a \cdot 1000 \cdot n) / (h \cdot S), \quad (1)$$

где N – количество клеток в 1 мл суспензии; a – среднее количество клеток в квадрате сетки, мм^2 ; h – глубина камеры, мм ; S – площадь квадрата сетки, мм^2 ; n – кратность разведения исходной суспензии.

Количество клеток в образцах находилось в интервале $10^2 - 10^3$ кл/мл. Доля живых клеток в контрольной пробе составляла (95–100)%.

Для определения токсичности исследуемых водных вытяжек, рассчитывали процент погибших клеток в тестируемой и контрольной пробах по формуле:

$$T = (N_k - N_t) / N_k \cdot 100\%, \quad (2)$$

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

За результат измерений принимали среднее арифметическое значение трех определений, при $P = 0,95$. Приемлемость результатов оценивали с учетом критерия [19]:

$$|x_{\max} - x_{\min}| / (x_1 + x_2 + x_3) \leq 1,1 \cdot s_r, \quad (3)$$

где x_{\max} , x_{\min} – максимальное и минимальное значения из трех результатов параллельных определений измеряемой величины ($x_1 - x_3$); s_r – среднеквадратичная ошибка среднего значения.

При различии показаний между исследуемой и контрольной пробами, равном 0–10%, осадки считались не загрязненными токсичными веществами. При отличии на 10–20% – считались слабо загрязненными; на 20–50% – средне загрязненными; на 50–100% – сильно загрязненными.

Для идентификации тяжелых металлов среди других токсичных веществ использовали обработку образцов комплексом ЭДТА. Для этого к 2,7 мл контрольной или рабочей проб добавляли по 0,3 мл растворов ЭДТА ($C = 1 \cdot 10^{-3} \text{М}$) и биотестируют их токсичность.

Полученные результаты обрабатывали статистически, используя программное обеспечение Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Оценка возможности использования тест-культуры клеток *E. gracilis* для биотестирования токсичности тяжелых металлов

Для определения степени опасности веществ в токсикологии используются величины: LC_{100} , LC_{50} , LC_{20} , LC_{10} и LC_0 , характеризующие концентрации веществ, вызывающие гибель 100%, 50%, 20%, 10% особей живых организмов и минимальное разведение проб чистой водой, не вызывающее их гибель [22].

На первом этапе работы была проверена возможность использования клеток *E. gracilis* для биотестирования токсичности осадков на модельных растворах тяжелых металлов (рис. 1).

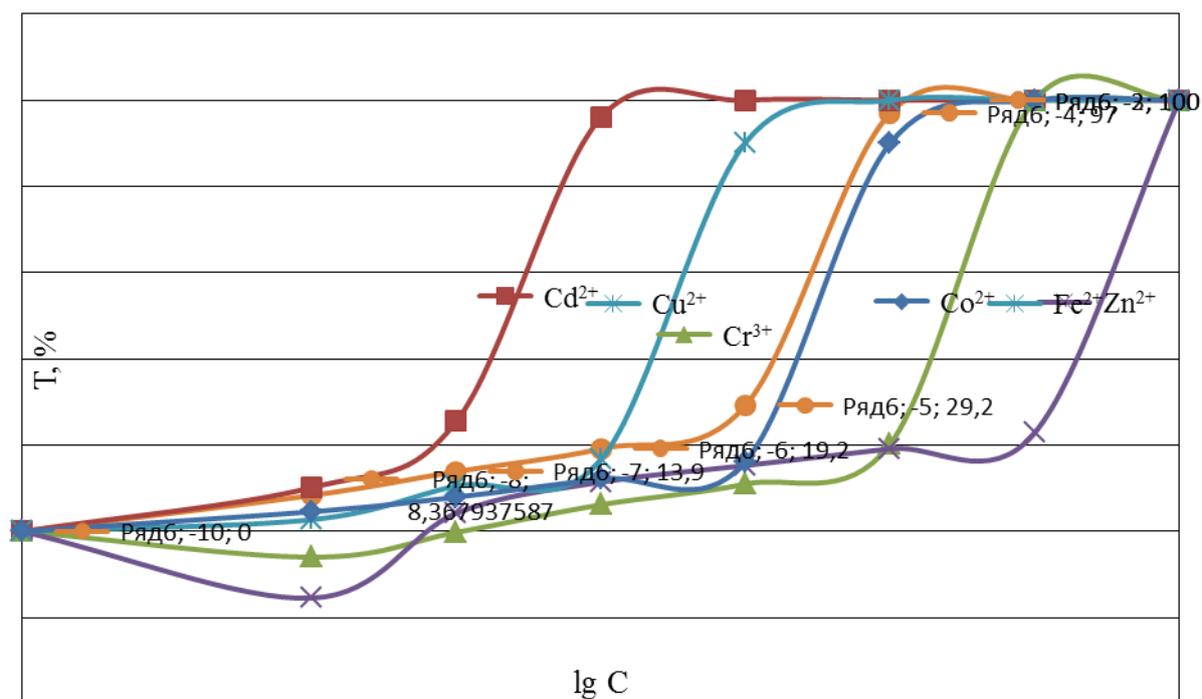
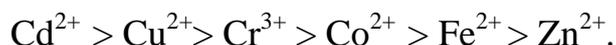


Рис. 1. Биотестирование токсичности ионов Co^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} по выживаемости клеток *E. gracilis*.

На рис. 1 показаны зависимости показателя токсичности от $\lg C$ ионов тяжелых металлов Co^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} для клеток *E. gracilis*. Как видно из рис. 1, зависимости носят нелинейный характер. На них можно выделить 2 области: с низкой и высокой токсичностью.

Пороговой величиной перехода между двумя областями является значение LC_{20} . При концентрации выше LC_{20} наблюдается скачкообразное увеличение токсичности проб в пределах изменения концентрации тяжелых металлов на один порядок, что указывает на однородность тест-культуры.

Как следует из рис. 1, действие тяжелых металлов на клетки *E. gracilis* носит селективный характер. Наибольшую чувствительность клетки микроводоросли проявляли к ионам Cd^{2+} . Остальные ионы тяжелых металлов можно расположить в ряд по степени их влияния на выживаемость клеток *E. gracilis*:



Для отдельных ионов тяжелых металлов (Zn^{2+} , Fe^{2+}) наблюдались отрицательные значения показателя токсичности при концентрациях на уровне $5 \cdot 10^{-9}$ – $5 \cdot 10^{-8}$ М, что указывает на стимулирующее действие низких концентраций данных металлов на размножение тест-культуры клеток.

О чувствительности клеток *E. gracilis* к тяжелым металлам можно судить по достоверно наблюдаемому изменению величины LC_{10} (таблица 1).

Таблица 1. Биотестирование выживаемости клеток *E. gracilis* в присутствии тяжелых металлов и величины их ПДК для водоемов различного назначения

Ионы тяжелых металлов	Значения ПДК для водоемов хозяйственно-питьевого назначения, мг/л	Значения ПДК для водоемов рыбо-хозяйственного назначения, мг/л	Биотестирование выживаемости клеток <i>E. gracilis</i> LC ₁₀ , мг/л
Fe ³⁺	0,3	0,1	0,1
Zn ²⁺	1,0	0,01	0,06
Cr ³⁺	0,5	0,07	0,005
Cd ²⁺	0,001	0,005	0,0005
Co ²⁺	0,1	0,01	0,01
Cu ²⁺	1	0,001	0,001

Полученные результаты указывают на то, что тест-культура клеток *E. gracilis* обладает достаточно высокой чувствительностью к ионам тяжелых металлов. Это позволяет использовать клетки микроводоросли *E. gracilis* и данный метод анализа для выбора режимов пробоподготовки и биотестирования токсичности водных вытяжек осадков сточных вод.

2. Проблемы пробоподготовки осадков сточных вод для биотестирования токсичности водных вытяжек

Иловые осадки сточных вод являются сложной мультикомпонентной системой со своим химическим составом и структурой. Они образуют зооглей, состоящий на 70% из живых организмов и около 30% твердых неорганических веществ, покрытых общей слизистой оболочкой [5].

Ключевым аспектом биотестирования химической безопасности ОСВ является их пробоподготовка. Существуют общие и частные проблемы подготовки проб к анализу.

Общая проблема заключается в том, что нет универсального способа одновременного выделения всех опасных веществ, поскольку они по свойствам относятся к противоположным группам веществ: органические/неорганические, водорастворимые/гидрофобные, свободные/связанные и др.

Для пробоподготовки почв и осадков для физико-химического анализа были предложены схемы: SCE (sequential chemical extraction) [23, 24]; PAT (progressive acidification technique) [25]; SES (simultaneous extraction scheme) [26], каждая из которых имеет свои достоинства и недостатки.

Наиболее широкое применение получила SCE схема. Она основана на геохимическом подходе и последовательном применении реагентов с увеличивающейся агрессивностью воздействия для выделения отдельных форм тяжелых металлов с разной степенью их силы связи с матрицей.

Было выделено шесть основных форм тяжелых металлов в почвах и ОСВ: водорастворимая, обменная; карбонат связанная; связанная с окислами железа и марганца; связанная с органическими веществами и остаточная. В зависимости от

силы связи их еще называют: несвязанная; слабо связанная; адсорбированная, связанная гидроксидными связями; связанная с органическими компонентами; связанная с матрицей.

В 3-х стадийной последовательной схеме (BCR), предложенной European Community Bureau of References выделяются четыре формы тяжелых металлов: обменная; восстанавливаемая; окисляемая; остаточная [27].

Для последовательного выделения различных форм тяжелых металлов из образцов используется ряд экстрагентов, в частности [23]:

- обменная фракция удаляется за счет использования солевых растворов NH_4Ac , MgCl_2 , KNO_3 и др., при $\text{pH} = 7$, $t = 1$ ч, 20°C ;
- карбонат-связанная форма выделяется ацетатом натрия и кислотной экстракцией при $\text{pH} = 5$, $t = 5$ ч, 20°C ;
- тяжелые металлы, адсорбированные на окислах железа и марганца, обычно освобождаются в восстановленных условиях среды: NH_2OH , HCl , $\text{pH} = 2-4$, $t = 6$ ч, 96°C ;
- удаление тяжелых металлов, связанных с органикой и сульфидами, проводят при их окислении H_2O_2 в HNO_3 , $\text{pH} 2,0$, $t = 2-3$ ч, 85°C ;
- для выделения тяжелых металлов из остаточной фазы, включающей наиболее прочно связанные металлы с кристаллической решеткой первичных и вторичных минералов, требуются сильные кислоты, чтобы разрушить их силикатную основу. Для этого используются HF , HNO_3 , HCl , микроволновая обработка при 150°C , 30 мин.

Применение последовательной схемы обработки иловых осадков сточных вод показало [28], что распределение, например, меди по фракциям составило: водорастворимая – 3,2%; обменная – 15,2%; органическая – 39,7%; карбонатная – 16,6%; гидроксидная – 14,2%; остаточная – 11,1%.

Все предложенные за прошедшее время многочисленные модификации SCE схемы [29–32] отличались небольшими вариациями условий экстракции, видом экстрагентов, но сохранили общий принцип процедуры разрушения отдельных фракций и выделения из них тяжелых металлов.

В общем случае, при нахождении токсичного вещества в прочно связанном состоянии, не выделяемом при кипячении, в физико-химическом анализе используют процессы кислотного и щелочного гидролиза. В случае биотестирования они не подходят, так как требуют дополнительной процедуры раскисления, расщелачивания и обессоливания проб.

Основными недостатками всех рассмотренных выше методов выделения тяжелых металлов являются [24]:

- неспецифичность и неселективность используемых экстрагентов, в результате чего при экстракции основной формы выделяются и другие формы тяжелых металлов, поэтому их необходимо дополнять процедурами, повышающими селективность метода экстракции;
- при использовании сильных реагентов, разрушающих матрицу почв и осадков, нарушаются их физические, химические и биологические свойства, протекают процессы реадсорбции и перераспределения тяжелых металлов

между разными фракциями. В результате это ведет к снижению доли 1–3 фракций и увеличению доли 4–5 фракций;

- на пробоподготовку влияют многие факторы: pH, T, O₂, время, концентрации экстрагентов, природа и химический состав веществ и т. д., которые играют важную роль в распределении тяжелых металлов по фракциям, что приводит к плохо воспроизводимым результатам.

Следует добавить, что в геохимическом и физико-химическом подходах не рассматривается роль биологической части осадков и как источника собственных токсичных веществ и как биосорбента тяжелых металлов, участвующего в их связывании и высвобождении.

Предложенные схемы предназначены только для анализа тяжелых металлов и не позволяют оценить общую токсичность осадков, вызванную присутствием других классов токсичных веществ.

Общим недостатком данных схем пробоподготовки является также то, что они предназначены только для физико-химического анализа и не подходят для биотестирования, поскольку в них используются агрессивные для биообъектов реагенты. Поэтому поиск эффективных схем пробоподготовки для оценки химической безопасности почв и осадков сточных вод продолжается.

Метод биотестирования ориентирован на анализ токсичности водорастворимых веществ, которые могут находиться в свободном и связанном состояниях, тогда как водонерастворимые вещества в водной среде находятся преимущественно в связанном состоянии.

На практике возникает потребность в знании: реальной и потенциальной опасности осадков; идентификации природы токсичных веществ и форм их нахождения в осадках для выбора лучшего способа пробоподготовки, детоксикации или переработки осадков сточных вод.

Органические и неорганические вещества в зависимости от размера их частиц могут находиться в водных средах во взвешенном, коллоидном и растворенном состояниях. Изучение распределения тяжелых металлов по фракциям сточных вод на примере Fe²⁺ показало, что на свободную ионную форму приходилось не более 15% от их общего содержания, в то время как основная часть Fe²⁺ находилась в связанном состоянии, причем большую долю (59%) составляла коллоидно-связанная форма [33].

Одна из частных проблем пробоподготовки осадков сточных вод для биотестирования заключается в переводе токсичных веществ из связанного в свободное состояние.

Существующая нормативно-техническая документация рекомендует определять безопасность осадков сточных вод методом биотестирования на основе анализа их водных вытяжек, получаемых при 20°C. При этом не допускается нагрев и сушка осадков, поэтому определение их влажности и безопасности проводятся отдельно на разных образцах [20]. Это связано с тем, что карбонатная форма тяжелых металлов, малорастворимая в воде, при нагревании осадков может распадаться и образовывать бикарбонатную форму, которая хорошо растворима в воде. Это должно привести к увеличению токсичности осадков при их тепловой обработке.

Для проверки возможного влияния термообработки на изменение токсичности осадков сточных вод было проведено измерение индекса токсичности водных вытяжек, полученных из сырых и высушенных до постоянной массы осадков при экстракции водой в течение 1 ч при 20°C и 100°C. Полученные результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2. Изменение токсичности водных вытяжек из сырого и высушенного осадков сточных вод, обработанных при 20°C и 100°C

Виды осадков сточных вод	Экстракция водой, T, °C, 1 ч	Токсичность (%) при 20°C
Сырой осадок	20	21,8 ± 1,7
	100	31,0 ± 1,9
Высушенный осадок	20	22,4 ± 1,6
	100	21,7 ± 1,3

Как видно из табл. 2, токсичность водных вытяжек, полученных из высушенного и влажного осадков при 20°C, была примерно одинакова, в пределах погрешности измерений. Это не подтверждает возможную роль карбонатной составляющей в повышении токсичности осадков при высушивании.

Водная экстракция высушенного осадка при 100°C также не привела к изменению токсичности полученных экстрактов.

Достоверное увеличение индекса токсичности водной вытяжки в 1,5 раза по сравнению с водной экстракцией при 20°C наблюдалось только после обработки сырого осадка при 100°C. Это может быть связано с увеличением количества десорбированных опасных веществ в водной вытяжке при повышении температуры обработки осадков.

Полученные данные указывают на важную роль воды в выходе водорастворимых токсичных веществ из осадков при термообработке.

Любое вещество в осадках сточных вод, в том числе и токсичное, может находиться в свободном и связанном состояниях. Распределение веществ между свободной и связанной формами зависит от их свойств и концентрации, а также от связывающей способности осадков.

Для характеристики связанного состояния П.А. Ребиндер выделил несколько основных форм связи воды с материалами, отличающиеся энергией связи: физико-механическую, физико-химическую и химическую [34]. Учитывая универсальность энергетического подхода, аналогичные формы связи должны действовать и для других веществ при межмолекулярных взаимодействиях [35].

В зависимости от энергии связи (E) веществ с материалом можно выделить:

- 1) несвязанную (свободную) форму веществ, для которой $E = 0$;
- 2) физико-механически связанные вещества, которые удерживаются в капиллярной влаге в макро- и микропорах матрицы, где они наименее прочно

закреплены ($E = 0-10$ кДж/моль) и могут быть легко выделены, как и свободная форма, пробоподготовкой при 20°C ;

3) физико-химически связанные вещества (адсорбированная форма) имеют энергию связи $E = 10-100$ кДж/моль. К различным видам физико-химических взаимодействий относятся: ионные связи ($E = 40-400$ кДж/моль), ионно-дипольные ($E = 4-40$ кДж/моль), диполь-дипольные ($E = 4-40$ кДж/моль), гидрофобные ($E = 4-8,5$ кДж/моль), гидрофильные (водородные связи) ($E = 8-25$ кДж/моль) [36]. Термообработка при 100°C может приводить к выделению физико-химически связанных веществ в свободном состоянии, и в случае их токсичности эта форма связанных веществ, как и формы 1 и 2, представляют реальную опасность;

4) химически связанные вещества со средним значением энергии связи $E = 100-400$ кДж/моль. Данная форма токсичных веществ доступна биологическому высвобождению и способна с течением времени переходить из связанного в свободное состояние, что представляет потенциальную опасность, вызываемую жизнедеятельностью живых организмов;

5) химически связанные вещества с энергией связи $E = 400-1000$ кДж/моль. Эта форма токсичных веществ высвобождается при агрессивных химических воздействиях и недоступна прямому биологическому высвобождению, поэтому она может представлять потенциальную химическую опасность.

Следует отметить, что низкомолекулярные вещества с молекулярной массой до 1500 способны при термообработке переходить из твердого и жидкого в газообразное состояние, что может вызвать их потери. Поэтому для учета вклада летучих форм в токсичность получение водных вытяжек следует проводить при 20°C .

Для оценки вклада связанных форм веществ в токсичность осадков сточных вод в процедуру их пробоподготовки следует также включить получение водных вытяжек при 100°C .

3. Пробоподготовка осадков сточных вод для биотестирования токсичности гидрофобных и гидрофильных веществ

Загрязненные осадки сточных вод редко содержат только один тип токсичных веществ, поэтому наряду с гидрофильными соединениями в них содержатся и гидрофобные токсичные вещества. Для выделения гидрофобных веществ из почв и осадков используют различные органические растворители (гексан, ацетон, петролейный эфир и др.) или их сочетания, однако эти вещества сами токсичны для тест-культур живых организмов, поэтому требуют дополнительной операции их удаления и контроля. В [37] предложен способ экстракции гидрофобных токсичных веществ с использованием природного эмульгатора – желчи.

На данном этапе работы был проведен сравнительный анализ токсичности экстрактов, выделенных при обработке гексаном и желчью из высушенного и сырого осадков. Полученные результаты приведены в табл. 3.

Таблица 3. Характеристика токсичности экстрактов иловых осадков сточных вод, обработанных разными экстрагентами, $t = 1$ ч

№ п.п.	Вид осадка сточных вод	Экстрагент	T, °C	T, %
1	сырой	гексан (1 : 1), желчь 0,1%	20	14,6 ± 0,8
2	высушенный	гексан (1 : 1), желчь 0,1%	20	23,1 ± 0,7
3	сырой	желчь, 0,1%	20	25,6 ± 1,2
4	сырой	желчь, 0,1%	100	35,9 ± 1,4

Обработка гексаном высушенного и сырого осадков показала, что присутствие воды в сыром осадке затрудняет экстракцию гидрофобных веществ и снижает их выход, тогда как предварительное высушивание осадков увеличивало выход гидрофобных веществ, и токсичность проб возрастала в 1,6 раза по сравнению с влажным образцом. В этой связи для анализа осадков сточных вод на присутствие гидрофобных токсичных веществ с применением органических растворителей лучше использовать только высушенные осадки.

Наряду с экстракцией гексаном, осадки одновременно обрабатывали 0,1% водной суспензией желчи, которая не оказывает токсичного действия на тест-культуру при данной концентрации, но позволяет эмульгировать гидрофобные вещества осадков и перевести их в доступную для взаимодействия с клетками форму, а также одновременно экстрагирует водорастворимые вещества.

Как видно из табл. 3, максимальный выход токсичных веществ в водную вытяжку наблюдался при термообработке осадков 0,1% желчью при 100°C. Токсичность полученной вытяжки была выше, чем при обработке гексаном или водой при 100°C (табл. 2).

Достоинством данного варианта, по сравнению с обработкой гексаном, является значительное сокращение длительности пробоподготовки и замена токсичного для клеток реагента, каким является гексан, на природный сурфактант – желчь, используемую в организмах животных при переработке жировых веществ.

Экстракция осадков 0,1% желчью позволяет одновременно выделять и гидрофобные и гидрофильные вещества.

4. Пробоподготовка осадков сточных вод и идентификация тяжелых металлов

Одним из существенных недостатков всех методов биотестирования по сравнению с физико-химическими методами анализа является неселективность определения ими природы токсичности веществ.

Для увеличения селективности методов биотестирования и обнаружения тяжелых металлов среди других токсичных веществ могут быть использованы комплексоны металлов, такие, как органические кислоты [29], ЭДТА [38].

На рис. 2 приведена зависимость изменения индекса токсичности водных растворов ионов хрома для клеток *E. gracilis* в зависимости от соотношения концентраций ЭДТА/ Cr^{6+} в полулогарифмических координатах.

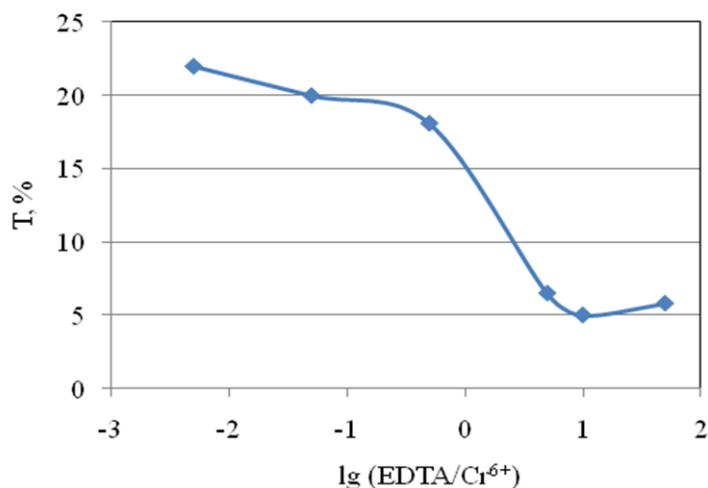


Рис. 2. Изменение индекса токсичности ионов Cr^{6+} ($C = 10^{-4}$ М) для клеток *E. gracilis* в зависимости от соотношения концентраций ЭДТА/ Cr^{6+} в полулогарифмических координатах.

Как видно из рис. 2, увеличение концентрации ЭДТА снижает индекс токсичности ионов Cr^{6+} , особенно быстро в области эквимольных соотношений. Это указывает на то, что токсичность комплекса Cr^{6+} -ЭДТА ниже, чем исходного металла. Комплексон ЭДТА не оказывал токсичного действия на тест-культуру клеток до концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ М.

На рис. 3 приведена оценка влияния ЭДТА на изменение индекса токсичности водных вытяжек из осадков сточных вод.

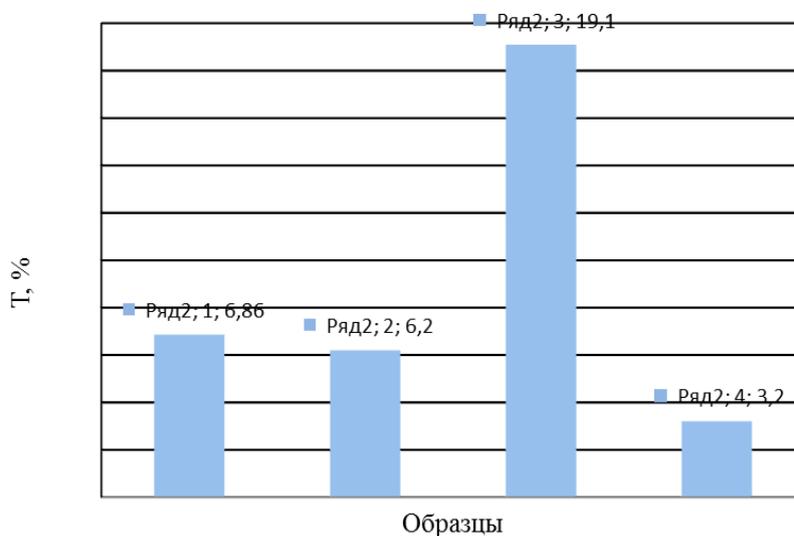


Рис. 3. Изменение токсичности водной вытяжки осадков сточных вод, полученной при 20°C , в присутствии ЭДТА (10^{-4} М) для клеток *E. gracilis*: 1 – исходная вытяжка; 2 – после обработки ЭДТА; 3 – исходная вытяжка с добавкой 10^{-5} М Co^{2+} ; 4 – образец (3), после добавки ЭДТА.

Невысокое значение индекса токсичности водной вытяжки, полученной при 20°C , и незначительное его снижение в присутствии ЭДТА указывают, на

то, что данная фракция осадка слабо загрязнена токсичными веществами и доля тяжелых металлов в ней мала.

Искусственное загрязнение водной вытяжки ионами Co^{2+} (10^{-5} М) показало (рис. 3), что такое загрязнение хорошо обнаруживается и выявляется добавкой ЭДТА.

Это указывает на возможность идентификации тяжелых металлов с помощью ЭДТА и их селективного определения в водных вытяжках осадков.

5. Общая схема пробоподготовки для биотестирования токсичности осадков сточных вод

В работе предложена последовательная схема пробоподготовки для биотестирования токсичности осадков сточных вод (рис. 4). В основу схемы была положена комбинация последовательной термообработки осадков при 20°C , 100°C , 270°C , 550°C и их водной экстракции [39].



Рис. 4. Схема последовательной пробоподготовки для биотестирования токсичности осадков сточных вод.

Получение водной вытяжки экстракцией водой при 20°C . Данный режим использован для биотестирования токсичности свободной формы органических, неорганических и биоорганических веществ – T_{20} . Такой режим

пробоподготовки необходим в случае, если в осадках содержатся летучие и легко разрушаемые органические и неорганические вещества (H_2S , NH_3 , фенолы и др.), а также для учета биоорганических токсикантов и исключения их потерь при сушке и экстракции.

Экстракция осадков водой (или 0,1% желчью) при 100°C. Такая обработка способствует выделению слабо- и среднесвязанных органических и неорганических гидрофильных и гидрофобных веществ и используется в последовательной схеме термообработки для оценки токсичности – T_{100} .

Термообработка при 270°C. Данный режим термообработки был использован для удаления легко разрушаемых азот-, фосфор- и серосодержащих токсичных органических соединений, а также связанных с ними металлов с образованием их нитратов, фосфатов и сульфатов, составляющих уровень токсичности – T_{270} .

Термообработка при 550°C. Этот режим использован для минерализации проб с образованием золы и определения ее токсичности – T_{550} . Минерализация исходного осадка дает возможность определить токсичность его неорганической части – T_{550}^0 , представленной в основном окислами и солями тяжелых металлов.

На рис. 5 приведены результаты анализа токсичности водных вытяжек осадков сточных вод, полученных при их последовательной водной экстракции и термообработке.

Как видно из рис. 5, осадок сточных вод по показателю T_{20} относится к среднему уровню токсичности.

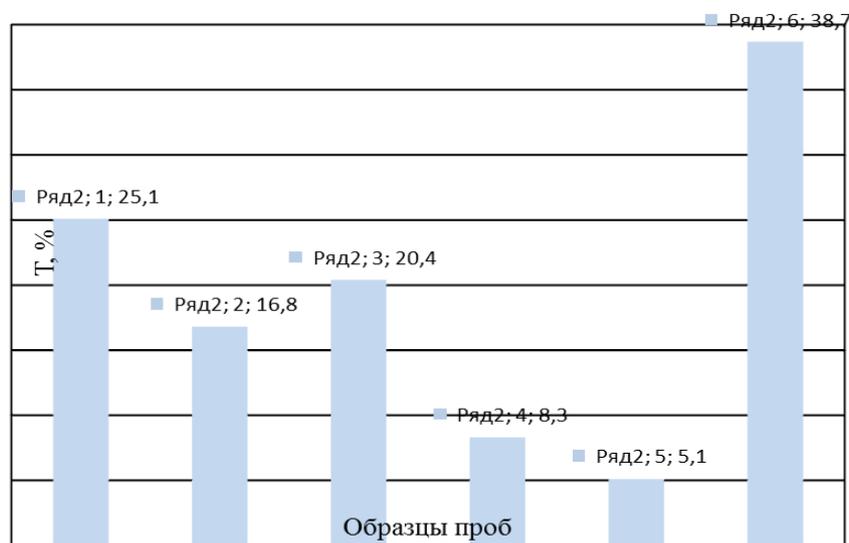


Рис. 5. Изменение уровня токсичности водных вытяжек, полученных по схеме последовательной пробоподготовки для биотестирования осадков сточных вод: 1 – при 20°C; 2 – при 100°C; 3 – в присутствии 0,1% желчи при 100°C; 4 – после (2) и термообработки при 270°C; 5 – после (4) и термообработки при 550°C; 6 – после минерализации высушенного осадка при 550°C.

В процессе биотестирования водных вытяжек, полученных последовательной обработкой и экстракцией осадка сточных вод при 20°C, 100°C, 270°C, 550°C, уровень токсичности проб снижался.

В случае использования желчи вместо воды для экстракции при 100°C токсичность ее вытяжек была выше по сравнению с водой. Это может быть связано с дополнительным выделением гидрофобных веществ, эмульгируемых желчью.

Общий уровень токсичности осадков сточных вод ($T_{\text{общ}}$) определяется токсичностью биоорганических и органических ($T_{\text{орг}}$), неорганических ($T_{\text{н/орг}}$) веществ и в первом приближении характеризуется суммой токсичности всех выделенных фракций осадка в процессе последовательной экстракции.

$$T_{\text{общ}} = T_{\text{орг}} + T_{\text{н/орг}} = T_{20} + T_{100} + T_{270} + T_{550} \quad (4)$$

Величина $T_{\text{н/орг}}$ определяется фракцией б (рис. 5). В этой связи долю $T_{\text{орг}}$ можно найти как разность показателей $T_{\text{общ}}$ и $T_{\text{н/орг}}$.

В случае, приведенном на рис. 5, токсичность анализируемого осадка составила: $T_{\text{общ}} = 55,3 \pm 6,0\%$, $T_{\text{орг}} = 16,6 \pm 3,5\%$, $T_{\text{н/орг}} = 38,7 \pm 2,1\%$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе рассмотрены достоинства и недостатки физико-химического и биологического подходов для оценки уровня безопасности осадков и предложен способ биотестирования уровня токсичности и природы токсичных веществ в осадках сточных вод.

Показано, что тест-культура клеток микроводоросли *E. gracilis* обладает чувствительностью к отдельным токсичным тяжелым металлам на уровне их ПДК и выше, что позволяет использовать ее для биотестирования химической безопасности водных вытяжек осадков сточных вод.

Проведенное исследование пробоподготовки сырых и высушенных иловых осадков для биотестирования их токсичности показало, что водорастворимые токсичные вещества лучше экстрагировать из влажного осадка при 100°C, в то время как для выделения гидрофобных токсичных веществ с помощью органических растворителей осадки необходимо предварительно высушивать. Для одновременной экстракции и гидрофобных и гидрофильных токсичных веществ лучше использовать 0,1% водную суспензию желчи.

При выборе режимов пробоподготовки для биотестирования химической безопасности осадков сточных вод необходимо руководствоваться критериями максимального увеличения выхода токсичных веществ из осадков при условии отсутствия дополнительного влияния на тест-культуру клеток. Для этого лучше подходят безреагентные способы пробоподготовки, а также применение реагентной обработки, не оказывающей дополнительного токсичного действия на тест-культуры.

В работе предложена последовательная схема термообработки и выделения токсичных веществ из осадков сточных вод для биотестирования их химической безопасности. В основу схемы заложен энергетический принцип связи веществ с матрицей осадка, а также принцип различия свойств противоположных групп веществ.

Пробоподготовка осадков к биотестированию включает режим водной экстракции при 20°C для учета летучих, легко разрушающихся при сушке и экстракции органических и неорганических токсичных веществ и теряющих свою активность при нагревании биоорганических токсикантов. Кроме того, в нее входит водная (или водно-желчная) экстракция токсичных веществ из осадков сточных вод при 100°C. Это позволяет определить реальную опасность осадков сточных вод, зависящую от доли токсичных веществ, связанных с матрицей и высвобождаемых при данной термообработке.

Для учета потенциально опасных токсичных веществ используются режимы термообработки при 270°C и 550°C, позволяющие определить токсичные вещества доступные высвобождению в результате жизнедеятельности микроорганизмов или выделяемые при агрессивных химических воздействиях.

ЭДТА-комплексобразование может быть использовано для дополнительной идентификации природы токсичных веществ и определения присутствия среди них тяжелых металлов, что представляет интерес для выбора способа детоксикации осадков сточных вод.

Достоинствами предлагаемой схемы пробоподготовки являются:

- безреагентность (за исключением воды (желчи));
- характеристика реальной опасности осадков, обусловленной токсичными веществами, экстрагируемой водой (или 0,1% желчью) при 20°C и при 100°C;
- относительная селективность разделения веществ в зависимости от их энергии связи с матрицей осадков: при 20°C (подвижные), 100°C – слабо связанные, 270°C – среднесвязанные, 550°C – сильносвязанные.
- учет природы токсичности осадков, вызванной органическими, неорганическими и биоорганическими веществами, содержащимися и аккумулируемыми в биомассе микроорганизмов;
- предотвращение перераспределения тяжелых металлов между различными их формами в осадках в результате последовательного удаления выделяемых фракций тяжелых металлов на каждой стадии пробоподготовки;
- возможность дополнительной идентификации присутствия тяжелых металлов среди выделенных токсичных веществ методом комплексометрии с ЭДТА.

Предложенная схема пробоподготовки и биотестирования токсичности осадков сточных вод позволяет определить общий уровень их токсичности, а также содержание органических/неорганических токсичных веществ, что представляет интерес для выбора способа детоксикации осадков сточных вод.

Список литературы:

1. Панчева Е.С. // Новости теплоснабжения. 2007. № 2. С. 26.
2. Пахненко Е.П. Осадки сточных вод и другие нетрадиционные органические удобрения: учебное пособие. М.: БИНОМ: Лаборатория знаний, 2013. 311 с.
3. Никовская Г.Н., Калиниченко К.В. // Biotechnologia Acta. 2014. V. 7. No. 3. P. 21.

4. *Давыдова С.Л., Тагасов В.И.* Тяжелые металлы как супертоксиканты XXI века. М.: РУДН, 2002. 140 с.
5. *Жмур Н.С.* Технологические и биохимические процессы очистки сточных вод на сооружениях с аэротенками. М.: АКВАРОС, 2003. 512 с.
6. СанПиН 2.1.7.573-96 «2.1.7. Почва. Бытовые и промышленные отходы. Санитарная охрана почвы. Гигиенические требования к использованию сточных вод и их осадков для орошения и удобрения». М.: Стандартинформ, 1997. 28 с.
7. 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.
8. ГОСТ Р 54534-2011 «Ресурсосбережение. Осадки сточных вод. Требования при использовании для рекультивации нарушенных земель». М.: Стандартинформ, 2012.
9. *Чемерис М.С.* Экологические основы утилизации осадков городских сточных вод на примере мегаполиса г. Новосибирска. Автореферат дис... д.б.н., 2006.
10. *Игнатенко А.В.* // Водные ресурсы и климат: материалы докладов V Международного Водного Форума: в 2 ч. Минск: БГТУ, 2017. Ч. 2. С. 151.
11. Методическое руководство по биотестированию воды: РД 118-0290. Под ред. А.Н. Крайнюковой. М., 1991. 48 с.
12. Методические указания. Методические основы биотестирования и определения генетической опасности отходов, поступающих в окружающую среду. РД 64-085-89. Москва, 1990. 45 с.
13. *Жмур Н.С.* Государственный и производственный контроль токсичности вод методами биотестирования в России. М.: МДС, 1997. 168 с.
14. *Бубнов А.Г., Буймова С.А., Гуцин А.А., Извекова Т.В.* Биотестовый анализ – интегральный метод оценки качества окружающей среды. Иваново: ИГХТУ, 2007. 112 с.
15. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование. Под ред. О.П. Мелеховой, Е.И. Егоровой. 3-е изд. М.: Изд. центр «Академия», 2010. 288 с.
16. *Терехова В.А.* // Почвоведение. 2011. № 2. С. 190.
17. *Лотош В.Е.* Переработка отходов природопользования. Екатеринбург: Полиграфист, 2007. С. 364.
18. *Сазановец М.А., Игнатенко А.В.* // Труды БГТУ. Сер. 2. Химия, технология орган. в-в и биотехнология. 2014. № 4. С. 179.
19. Биологические методы контроля. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний. ФР.1.39.2007.03222. М.: Акварос, 2007.
20. *Симаков Ю.Г.* Биотестирование природных и сточных вод. Учебно-практическое пособие для студентов. Модуль 1. М: МГУТУ, 2009. 92 с.
21. ГОСТ 26713-85. Метод определения влаги и сухого остатка. М.: Изд-во стандартов, 1985.
22. *Куценко С.А.* Основы токсикологии. М.: Фолиант, 2004. 570 с.
23. *Tessier A., Campbell P.G.C., Bisson M.* // Analytical Chemistry. 1979. V. 51. No. 7. P. 844.
24. *Veeken A.H.M.* Removal of Heavy Metals from Biowaste. PhD thesis. Wageningen: Wageningen University, The Netherlands, 1998.
25. *Rudd T., Lake D.L., Mehrotra I. et al.* // Sci. Total Environ. 1988. V. 74. P. 149.
26. *Gupta S., Mehrotra I., Singh O.V.* // Environmental Technology. 1990. V. 11. P. 229.
27. *Rauret G., Lopez-Sanchez J., Sahuquillo A. et al.* // J. Environment Monitoring. 1999. V. 1. P. 57.
28. *Зыкова И.В.* Дис. ... д. х. н. С.-Пб., 2008.
29. *Veeken A.H.M., Hamelers H.V.M.* // Water Science and Technology. 1999. V. 40. No. 1. P.129.
30. *Yoshizaki S., Tomida T.* // Environmental Science and Technology. 2000. V. 34. P. 1572.
31. *Bacon J.R., Davidson C.M.* // Analyst. 2008. V. 133. P. 25.
32. *Hass A., Fine P.* // Environmental Science and Technology. 2010. V. 40. P. 365.
33. *Игнатенко А.В.* // Труды БГТУ. Химия, технология орган. веществ и биотехнология. 2015. № 4. С. 262.

34. *Кузнецов А.Е.* Прикладная экобиотехнология: учебное пособие: в 2 т. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. Т. 1. 629 с. Т. 2. 485 с.
35. *Каплан И.Г.* Межмолекулярные взаимодействия. Физическая интерпретация, компьютерные расчеты и модельные потенциалы. Пер. с англ. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. 394 с.
36. *Владимиров Ю.А., Рошупкин Д.И., Потапенко А. Я, Деев А.И.* Биофизика. Учебник. М.: Медицина, 1983. С. 68.
37. Патент 2482478 РФ, 2013.
38. *Lestan D., Luo Chun-ling, Li Xiang-dong* // Environ. Pollut. 2008. V. 153, No. 1. P. 3.
39. *Игнатенко А.В.* // Труды БГТУ. Сер. 2. Химические технологии, биотехнология, геоэкология. Минск: БГТУ. 2017. № 2 (199). С. 10.

References:

1. *Pantskhava E.S.* // Novosti teplosnabzheniya [News of heat supply]. 2007. No. 2. P. 26 [in Russian].
2. *Pakhnenko E.P.* Sewage sludge and other unconventional organic fertilizers. Manual. М.: BINOM: Lab. znaniy, 2013. 311 p. [in Russian].
3. *Nikovskaya G.N., Kalinichenko K.V.* // Biotechnologia Acta. 2014. V. 7. No. 3. P. 21 [in Russian].
4. *Davydova S.L., Tagasov V.I.* Heavy metals as superecotoxicants of the 21st century. М.: RUDN, 2002. 140 p. [in Russian].
5. *Zhmur N.S.* Technological and biochemical processes of wastewater treatment at facilities with aeration tanks. М.: АКВАРОС, 2003. 512 p. [in Russian].
6. Hygienic Requirements for Surface Water Protection, SanPiN 2.1.7.573-96. "2.1.7. Soil. Household and industrial waste. Sanitary protection of soil. Hygienic requirements for use of wastewater and their sludge for irrigation and fertilization". М.: Standardinform, 1997. 28 p. [in Russian].
7. GOST [State Standart] R 17.4.3.07-2001. Protection of environment. Soils. Requirements for properties of sewage sludge when used as fertilizers. М.: Standardinform, 2001.
8. GOST [State Standart] R 54534-2011. Resource Saving. Sewage sludge. Requirements for use for reclamation of disturbed lands. М.: Standardinform, 2012 [in Russian].
9. *Chemeris M.S.* Ecological bases of utilization of urban sewage sludge using as exemplified by megapolis of Novosibirsk. Doct. habil. Thesis synopsis (Biology), 2006 [in Russian].
10. *Ignatenko A.V.* // Water resources and climate: materials of reports of the V International Water Forum: at Part1-2. Minsk: BSTU, 2017. Part 2. P. 151 [in Russian].
11. Methodological manual on water biotesting. RD 118-0290. Ed by A.N. Krayniukova. М., 1991. 48 p. [in Russian].
12. Methodical instructions. Methodological bases of biotesting and determining genetic hazard of waste entering the environment. RD 64-085-89. М., 1990. 45 p. [in Russian].
13. *Zhmur N.S.* State and industrial monitoring of water toxicity using biotesting methods in Russia. М.: MDS, 1997. 168 p. [in Russian].
14. *Bubnov A.G., Buymova S.A., Gushchin A.A., Izvekova T.V.* Biotest analysis -an integral method for assessing environmental quality. Ivanovo: IGKhTU, 2007. 112 p. [in Russian].
15. Biological environmental control: bioindication and biotesting. Ed. by O.P. Melekhova, E.I. Egorova. 3rd ed. М.: Izd. Center Akademia, 2010. 288 p. [in Russian].
16. *Terekhova V.A.* // Pochvovedenie [Soil Science]. 2011. No. 2. P. 190 [in Russian].
17. *Lotosh V.E.* Recycling of environmental waste. Yekaterinburg: Polygraphist, 2007. P. 364 [in Russian].
18. *Sazanovets M.A., Ignatenko A.V.* // Trudy BGTU. Ser. 2. Khimiya, tekhnol. organ. v. i biotekhnol. [Proceedings of BSTU. Ser. Chemistry, technology of organic substances and biotechnology]. 2014. No. 4. P. 179 [in Russian].

19. Biological control methods. Methods for determining toxicity of water and water extracts from soil, sewage sludge and wastes basing on mortality and changes in fertility of daphnias. FR.1.39.2007.03222. M.: Aquaros, 2007 [in Russian].
20. *Simakov Yu.G.* Biotesting of natural and waste waters. Manual for students. Module 1. M.: MGUTU, 2009. 92 p. [in Russian].
21. GOST [State Standart] 26713-85. Method for determination of moisture and dry residue. M.: Izd. standartov, 1985 [in Russian].
22. *Kutsenko S.A.* Fundamentals of toxicology. M.: Foliant, 2004. 570 p. [in Russian].
23. *Tessier A., Campbell P.G.C., Bisson M.* // Analytical Chemistry. 1979. V. 51. No. 7. P. 844.
24. *Veeken A.H.M.* Removal of Heavy Metals from Biowaste. PhD thesis. Wageningen: Wageningen University. The Netherlands, 1998.
25. *Rudd T., Lake D.L., Mehrotra I. et al.* // Sci. Total Environ. 1988. V. 74. P. 149.
26. *Gupta S., Mehrotra I., Singh O.V.* // Environmental Technology. 1990. V. 11. P. 229.
27. *Rauret G., Lopez-Sanchez J., Sahuquillo A. et al.* // J. Environment Monitoring. 1999. V. 1. P. 57.
28. *Zykova I.V.* Doct. habil. Thesis (Chemistry). S.-Pb., 2008 [in Russian].
29. *Veeken A.H.M., Hamelers H.V.M.* // Water Science and Technology. 1999. V. 40. No. 1. P.129.
30. *Yoshizaki S., Tomida T.* // Environmental Science and Technology. 2000. V. 34: P. 1572.
31. *Bacon J.R., Davidson C.M.* // Analyst. 2008. V. 133. P. 25.
32. *Hass A., Fine P.* // Environmental Science and Technology. 2010. V. 40. P. 365.
33. *Ignatenko A.V.* // Trudy BGTU. Ser. 2. Khimiya, tekhnol. organ. v. i biotekhnol. [Proceedings of BSTU. Ser. Chemistry, technology of organic substances and biotechnology]. 2015. No. 4. P. 262 [in Russian].
34. *Kuznetsov A.E.* Applied ecobiotechnology. Manual in 2 vol. M.: BINOM, Lab. znanii, 2010. V. 1. 629 p.; V. 2. 485 p. [in Russian].
35. *Kaplan I.G.* Intermolecular interactions. Physical interpretation, computer calculations and model potentials. M.: BINOM, Lab. znanii, 2012. 394 p. [in Russian].
36. *Vladimirov Yu.A., Roshchupkin D.I., Potapenko A.I., Deev A.I.* Biophysics. Manual. M.: Meditsyna, 1983. P. 68 [in Russian].
37. Patent 2482478, Russian Federation, 2013.
38. *Lestan D., Luo Chun-ling, Li Xiang-dong* // Environ. Pollut. 2008. V. 153, No. 1. P. 3.
39. *Ignatenko A.V.* // Trudy BGTU. Ser. 2. Khim. tekhnol., biotekhnol., geokologiya [Proceedings of BSTU. Ser. 2. Chemical technologies, biotechnology, geocology]. 2017. No. 2 (199). P. 10 [in Russian].