

УДК 579.2

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ (ИХ) ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ЗАГРЯЗНЕННЫХ ВОД

¹Гулиева Г.А., ²Бабаева Э.М.

¹Институт микробиологии НАН, Баку;

²Intertek Azeri LTD MMC Аналитическая лаборатория, e-mail: laboratoriyarskm@rambler.ru

В статье представлены результаты микробиологического исследования сточных вод на различных этапах очистки. Применен метод ионной хроматографии (ИХ) как экспресс- метод детекции патогенов. В результате исследования выявлено наличие патогенов, таких как *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* после механической очистки. Результаты исследования полагают необходимость совершенствования методов очистки сточных вод, используемых в различных целях.

Ключевые слова: патоген, метод ионной хроматографии, анаэробы, сточные воды, кислоты, очистка

THE USE OF ION CHROMATOGRAPHY (ITS) FOR THE MICROBIOLOGICAL MONITORING OF POLLUTED WATERS

¹Guliyeva G.A., ²Babayeva E.M.

¹Institute of Microbiology National Academy of Sciences;

²Baku Intertek Azeri LTD MMC Analytical laboratory, Baku, e-mail: laboratoriyarskm@rambler.ru

It was established the result of microbiological investigation of the sewage of the different stage of clining. It was applied method of ion chromatography as a express- method of the patogen detection. The results of our investigations show the pathogens *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* after mechanical cleaning. The result of investigation believe the nessery of advansing of the method of clining sewage, using for the different aim.

Keywords: pathogen, ion chromatography method, anaerobes, wastewater, acid, sewage

С целью сохранения естественной биологической жизни представляется необходимостью контроль водных ресурсов, так как человек должен быть обеспечен пресной водой, отвечающей требованиям, действующим на данный момент стандартам.

Чрезвычайную опасность представляет микробная загрязненность воды: фекалии человека и фекально-бытовые сточные воды являются основным источником патогенных микроорганизмов, распространяемых водой.

Следует отметить, что поверхностные и грунтовые воды могут быть загрязнены хозяйственно-бытовыми сточными водами наряду с техническими и химическими отходами.

Контроль сточных вод в отношении патогенной микрофлоры показал, что это эффективный эпидемиологический тест для определения заболеваний, преобладающих среди населения в данный момент [2, 4, 13, 14].

Даже в условиях соответствующей эксплуатации обработанные сточные воды содержат определенное количество патогенных бактерий, вирусов и паразитов, что представляет потенциальную опасность для здоровья человека, например при использовании очищенных вод для рекреационных целей [5, 6].

Существуют различные методы санитарно- микробиологического контроля

воды. В основном это трудоемкие и длительные по времени анализы, требующие соответствующей аппаратуры, питательных средств и химреактивов.

Трудность идентификации микроорганизмов в том, что в водном сообществе с обилием органического вещества (сточные воды) число культивируемых видов составляет многие сотни, а доминируют десятки, среди которых обнаруживаются и патогенные агенты [1, 3, 8, 12].

К вышеотмеченному следует добавить немаловажный факт, еще более повышающий актуальность проблемы индикации вирусно-бактериальной флоры и очистки используемых вод – факт существования проблемы биологического терроризма, предполагающего локальное распространение биологических агентов (БА).

Из различных источников следует, что в перечень вероятных биологических агентов входят 34–39 возбудителей инфекционных болезней различной этиологии и токсинов [9, 10].

Вышеотмеченное полагает постоянный контроль за выполнением положений Конвенции о биологическом оружии и его совершенствовании [7].

Возникает необходимость пересмотра тактики эпидемиологического обследования, задачей которого является установление причины появления инфекционных

больных (естественной и искусственной) в сочетании с регулярным мониторингом по изучению спектра вирусно-бактериальной флоры в используемых водах.

В связи с изложенным представляется актуальным разработка экспресс-методов детекции и более продуктивной индикации вирусно-бактериальной флоры из загрязненных вод.

Для экспресс-диагностики патогенов, включая анаэробных возбудителей, особо эффективно применение метода ионной хроматографии, основанного на хроматографическом определении в исследуемом материале специфических продуктов метаболизма бактерий.

С целью выявления спектра патогенов в сточных водах очистных сооружений г. Баку были исследованы пробы сточных вод, отобранных на различных этапах очистки.

Материалы и методы исследования

Исследованы пулы проб сточных вод Зыхской очистной станции после механической, биологической очистки, после хлорирования и пулы проб ила с осадочных площадок станции Говсаны.

Отмеченные исследования проведены с использованием ионной хроматографической системы ICS-2000 производства компании Dionex, предназначенная для проведения ионных анализов [11].

Перед проведением анализа образца проводится калибровка ионной хроматографической системы с использованием растворов стандартов. Сравнением данных, полученных при анализе образца, с данными, полученными от известных стандартов, можно провести идентификацию и количественное определение ионов в образце.

Системы для сбора и обработки данных, обычно это компьютерное программное обеспечение, управляющее прогоном хроматограммы, получает диаграмму зависимости сигнала детектора от времени.

Хроматографическая программа пересчитывает каждый пик на хроматограмме в концентрацию образца и выдает распечатку результатов.

Каждому компоненту смеси образца на хроматограмме соответствует отдельный пик. Время от начала хроматограммы до появления вершины пика называется временем удерживания (Retention- time-tR).

Определение количественного состава смеси проводится путем сопоставления времени удерживания данного компонента и эталона вещества известной структуры.

Совпадение времени удерживания стандартных кислот и кислот из исследуемого образца указывает на их идентичность.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследования проб сточных вод выявили:

при сопоставлении пиков выхода кислот из стандартных образцов с пиками выхода растворов кислот (или иначе- «время удерживания компонентов») из исследуемого образца была установлена идентичность пиков выхода (tR) стандартных (эталонных) растворов кислот (рис. 1) с пиками выхода (tR) аналогичных кислот в образце сточных вод после механической обработки (рис. 2). При этом наличие масляной кислоты не было отмечено. Что касается количественного содержания исследуемых кислот (Amount ppm), то следует отметить значимое уменьшение концентрации продуктов метаболизма с 7,129 до 0,830. Представляет интерес относительное распределение (Rel. Area) детектированных метаболитов в поле между пиками. Наиболее близкие к стандартам по значению были муравьиная и уксусная кислоты с некоторым превалированием последней (56,36–24,34) (табл. 1, 2).

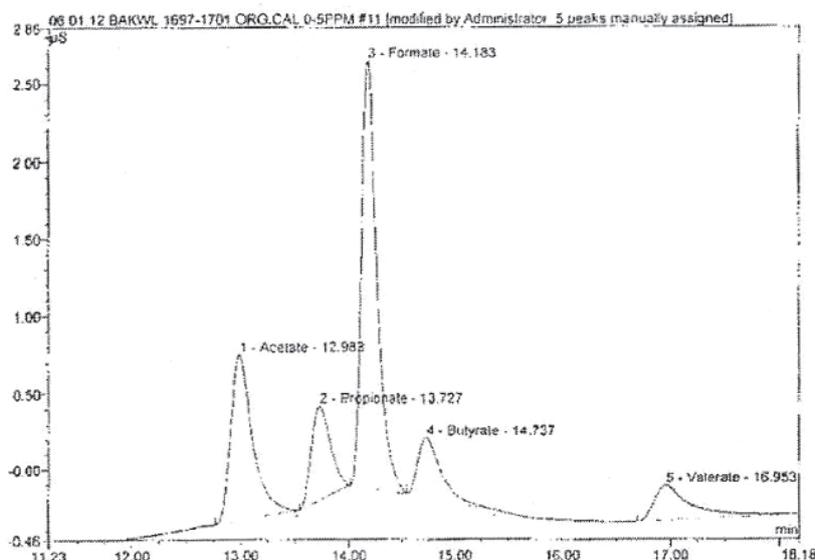


Рис. 1. Пики выхода кислот из контрольных (стандартных) образцов

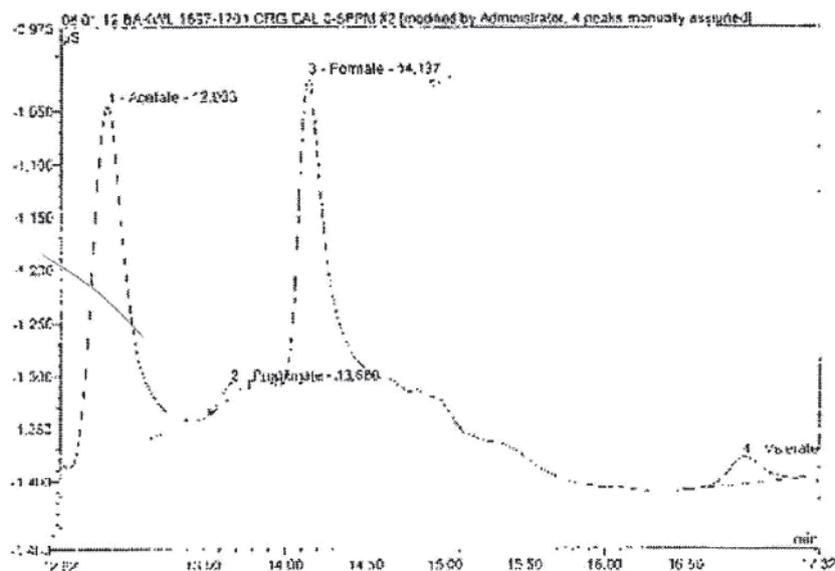


Рис. 2. Пики выхода кислот из исследуемого образца I (проба сточных вод после механической обработки)

Таблица 1

Количественные показатели контрольных (стандартных) образцов

№ п/п	Rel. Time, min	Peak name	Height	Area, $\mu\text{S}\cdot\text{min}$	Rel. Area, %	Amount, ppm	Type
1	12,98	Acetate	1,081	0,252	24,34	1,750	ВМВ [^]
2	13,73	Propionate	0,623	0,127	12,28	1,283	ВМВ [^]
3	14,18	Formate	2,769	0,472	45,63	1,756	ВМВ [^]
4	14,74	Butyrate	0,388	0,096	9,24	1,091	ВМВ [^]
5	16,95	Valerate	0,223	0,088	8,51	1,248	ВМВ [^]
Total:			5,083	1,035	100,00	7,129	

Таблица 2

Количественные показатели детектированных кислот из образца I (проба сточных вод после механической обработки)

№ п/п	Rel. Time, min	Peak name	Height	Area, $\mu\text{S}\cdot\text{min}$	Rel. Area, %	Amount, ppm	Type
1	*2,90	Acetate	0,329	0,080	56,36	0,533	ВМВ [^]
2	*3,7366	Propionate	0,013	0,007	0,17	0,010	ВМВ [^]
3	*1,11	Formate	0,287	0,054	38,16	0,196	ВМВ [^]
4	*8,85	Valerate	0,075	0,008	1,30	0,085	ВМВ [^]
Total:			0,651	0,141	100,00	0,830	

Анализ пиков выхода (tR) метаболитов при изучении пробы сточных вод после биологической обработки выявил выраженное совпадение пиков выхода 3-х кислот: муравьиной, пропионовой и уксусной при отсутствии уже 2-х кислот – валериановой и масляной (рис. 3). Количественные показатели (Amount ppm) выявили уменьшение концентрации метаболитов до 0,522. Относительное распределение метаболитов (Rel. Area) выявило близкие по значению к стандартам наличие муравьиной кислоты (3962–4563) с превалированием уксусной кислоты

(57,28–24,34) (табл. 3). Сравнение пиков выхода (или tR) метаболитов при изучении пробы сточных вод после хлорирования выявило совпадение только 2-х пиков выхода кислот: уксусной и муравьиной (рис. 4).

Количественное содержание отмеченных кислот (Amount ppm) было значимо снижено до 0,076. Относительное распределение метаболитов (Rel. Area) было очень близко по значению к стандарту в следующем соотношении: 56,13–56,36 и 33,87–38,16 соответственно указанным выше кислотам (табл. 4).

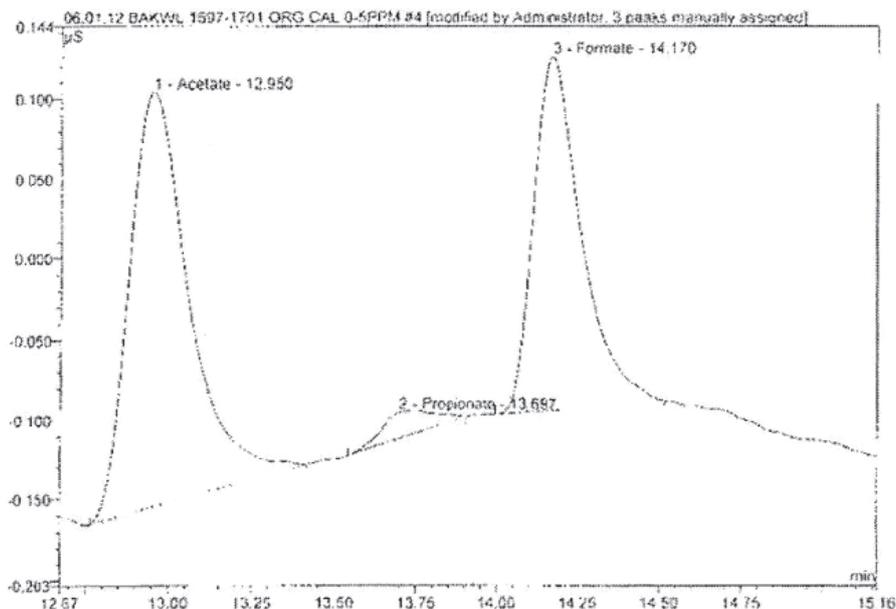


Рис. 3. Пики выхода кислот из исследуемого образца II (проба сточных вод после биологической обработки)

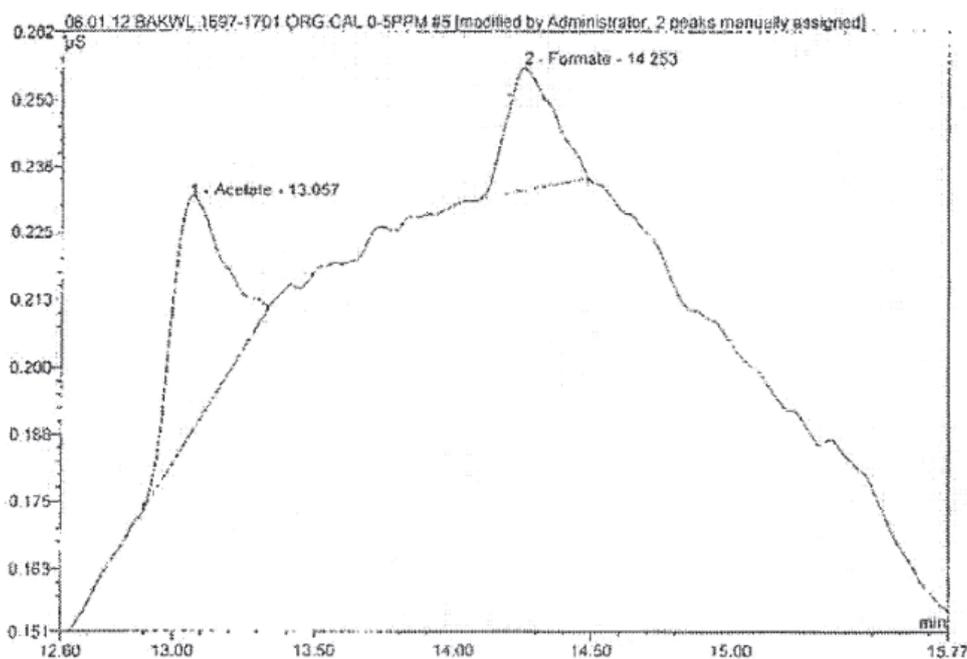


Рис. 4. Пики выхода кислот из исследуемого образца III (проба сточных вод после хлорирования)

Таблица 3

Количественные показатели детектированных кислот из образца II (проба сточных вод после биологической обработки)

№ п/п	Rel. Time, min	Peak name	Height	Area, $\mu\text{S}\cdot\text{min}$	Rel. Area, %	Amount, ppm	Type
1	12,95	Acetate	0,258	0,054	57,28	0,359	BMB [^]
2	13,70	Propionate	0,017	0,003	3,10	0,028	BMB [^]
3	14,17	Formate	0,219	0,037	39,62	0,135	BMB [^]
Total:			0,494	0,094	100,00	0,522	

Таблица 4

Количественные показатели детектированных кислот из образца III (проба сточных вод после хлорирования)

№ п/п	Rel. Time, min	Peak name	Height	Area, $\mu\text{S}\cdot\text{min}$	Rel. Area, %	Amount, ppm	Type
1	13,06	Acetate	0,044	0,009	66,13	0,059	ВМВ^
3	14,25	Formate	0,023	0,005	33,87	0,017	ВМВ^
Total:			0,067	0,014	100,00	0,076	

Исследование активного ила выявило наличие 3-х кислот: уксусной, пропионовой и муравьиной (рис. 5), аналогично спектру кислот детектированных после биологической очистки. В количественном отношении (Amount ppm) следует отметить значение концентрации метаболитов 0,505 близкое по значению полученному

после биологической очистки – 0,522. Что касается относительного распределения (Rel. Area) метаболитов, то было выявлено наиболее значимое распределения муравьиной кислоты (72,92–45,63) и уксусной кислоты (25,06–24,34) с небольшим содержанием пропионовой кислоты (2,02–12,28) (табл. 5).

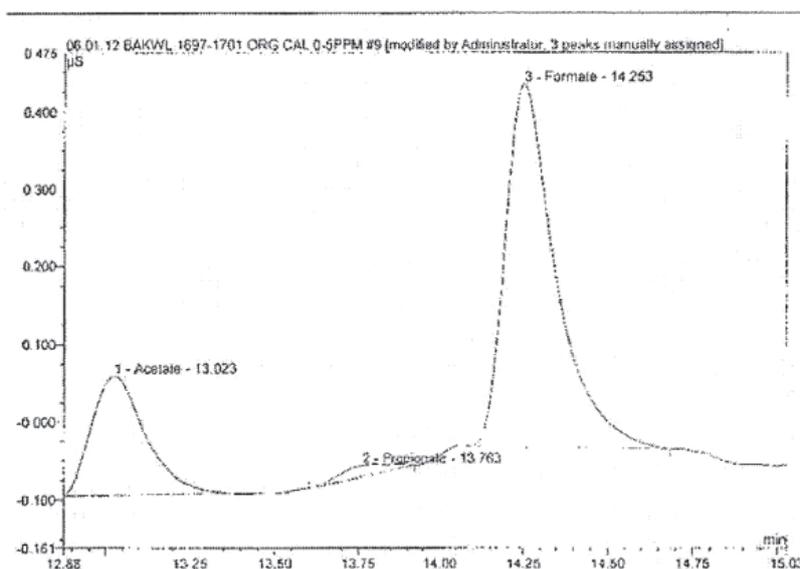


Рис. 5. Пики выхода кислот из исследуемого образца IV (проба – активный ил)

Таблица 5

Количественные показатели детектированных кислот из образца IV (проба – активный ил)

№ п/п	Rel. Time, min	Peak name	Height	Area, $\mu\text{S}\cdot\text{min}$	Rel. Area, %	Amount, ppm	Type
1	13,02	Acetate	0,154	0,028	25,06	0,186	ВМВ^
2	13,76	Propionate	0,013	0,002	2,02	0,021	ВМВ^
3	14,25	Formate	0,467	0,082	72,92	0,297	ВМВ^
Total:			0,634	0,112	100,00	0,505	

Резюмируя полученные данные следует отметить: отсутствие масляной кислоты после механической очистки, отсутствие валериановой и масляной кислот – после биологической очистки, отсутствие пропионовой, масляной, валериановой кислот – после хлорирования. В активном иле определены 3 кислоты: уксусная, пропионовая и муравьиная как и в пробе сточных вод после биологической очистки, что связано

по-видимому, с тем, что иловые отложения складываются после биологической обработки.

Следует отметить, что обнаружение масляной и валериановой кислот в образцах говорит о наличии облигатных анаэробных бактерий.

Наличие же в образцах уксусной, пропионовой и муравьиной кислот говорит о присутствии факультативных анаэробов,

таких как *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*.

Таким образом, следует вывод, что после механической очистки сточных вод отмечено наличие метаболитов облигатно-анаэробных бактерий и их отсутствие после биологической очистки.

После хлорирования отмечено отсутствие облигатных анаэробных бактерий.

В активном иле метаболиты анаэробных бактерий не выявлены. Но во всех образцах и после всех видов очистки сточных вод отмечено наличие факультативных анаэробов, в том числе и в активном иле.

Но наименьший спектр метаболитов отмеченных патогенов детектирован после хлорирования.

Вышеотмеченные полагают необходимость поиска более совершенных методов очистки сточных вод, спускаемых в море и используемых в ирригационных целях.

Список литературы

1. Заварзин Г.А., Колотилова Н.Н. Введение в природо-ведческую микробиологию. – М., 2001
2. Казанцева В.А. и соавт. Методические указания по выделению цитопатогенных энтеровирусов из сточных вод. – М., 1965. Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР.
3. Кокушкин А.М. и др. // Матер. научн конф. посв. 275-летию Российск акад. наук. – Саратов, 1999
4. Садыхова Ф.Э., Мамедли Ф.М. и соавт. К индикации энтеровирусов из сточных вод / Azərbaycan Respublikası Səhiyyə Nazirliyi Gəncə Şəhər Səhiyyə İdarəsi Ə.Əliyev ad. Azərbaycan Dövlət Həkimləri Təkmilləşdirmə İnstitutunun 70 illiyinə həsr olunmuş səyyar Elmi- Praktik Konfransın Materiallarının Toplusu. Elmi əsərlərin məcmuəsi. – Gəncə, 2005. – С. 167–172
5. Садыхова Ф.Э. Распространение энтеровирусов в г. Баку, установленное при вирусологическом обследовании сточных вод и организованного контингента здоровых детей: дис. ... канд. мед. наук. – Баку, 1971.
6. Садыхова Ф.Э., Насирова Э.Ш., Гулиева Г.А., Шихалиева Ш.Т., Мейбалиев Ф.Т., Дадашев А.Э. К вопросу циркуляции энтеровирусов среди населения Азербайджана в постликвидационный по полиомиелиту период (2008-2010 годы) // Azərbaycan Respublikası Səhiyyə Nazirliyi Ə.Əliyev ad. Azərbaycan Dövlət Həkimləri Təkmilləşdirmə İnstitutu. Əziz Məmmədkərim oğlu Əliyevin 115 illiyinə həsr olunmuş elmi konfransın məcmuəsi. – Bakı, 2012. – С. 165–169.
7. Усиление Конвенции по биологическому оружию путем выработки мер по укреплению доверия / под ред. Э. Гайслера. – Оксфорд, 1990. – 152 с.
8. Чиров П.А., Белонович Г.А. Фундаментальные и прикладные аспекты функциональных водных систем // Матер. Всероссийск. научн.-конф. – Саратов, 2001
9. Biological Warfare and Terrorism. Medical issues and response/ satellite Broadcast. –September 26–28, 2000.
10. Centers for Disease Control and Prevention, Critical biological Agents for Public Health Preparedness: Summary of Selection Process and Recommendations. Unpublished report. – October 16, 1999
11. Dionex Ионная хроматографическая система İCS-2000. Инструкция по эксплуатации 2003 Dionex Corporation. Документ №031857 Издание №01 Март 2003 Moore B. Monthly Bull. – Ministry Health. 1948. – №7. – 241 с
12. Jannasch H.W., Eimhjetten K., Wirsen C.O., Farmanfarmalan A. // Science. – 1971. – №171. – 672 с.
13. Moore B. Monthly Bull. – Ministry Health. – 1948. – №7. – 241 с.
14. Riordan I. Isolation of enteroviruses from sewage before and after vaccine administration // J bio. and med. – 1962. – v.34. – P. 512–521.