

УДК 628.35+546.135+546.766

**Г.Ф. Смирнова, В.С. Подгорский, Ф.В. Мучник**

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев МСП, Д03680, Украина*

## **ВОССТАНОВЛЕНИЕ ХЛОРАТОВ ACINETOBACTER THERMOTOLERANTICUS C-1 В ПРИСУТСТВИИ ХРОМАТ-ИОНОВ**

*Скорость восстановления хлоратов *A. thermotoleranticus* C-1 достигала 59,6–63,7 мг/л в час и практически не зависела от концентрации хлоратов в широком диапазоне. При совместном присутствии в среде хлоратов и хроматов скорость хлорат-восстановления зависела от концентрации хроматов и сохранялась на неизменном уровне при содержании хроматов до 5 мг/л. При концентрации  $\text{CrO}_4^{2-}$  10,0 мг/л восстановление хлоратов *A. thermotoleranticus* C-1 незначительно замедлялось. Повышение содержания  $\text{CrO}_4^{2-}$  до 20,0–30,0 мг/л снижало скорость хлоратредукции с 63,7 до 18,3–5,8 мг/л в час, а наличие 50,0 мг/л хроматов являлось ингибирующей концентрацией для хлоратредукции и приводило к необратимой утрате способности *A. thermotoleranticus* C-1 восстанавливать хлораты. Одновременно с восстановлением хлоратов происходила и редукция хроматов. Скорость восстановления хроматов *A. thermotoleranticus* C-1 при содержании их в среде 3–20 мг/л составляла 0,5–0,37 мг/л в час и значительно снижалась при повышении концентрации хромат-ионов. Наличие хлоратов не влияло на восстановление хроматов *A. thermotoleranticus* C-1.*

*Ключевые слова:* *Acinetobacter thermotoleranticus* C-1, хлораты, хроматы, хлоратредукция, хроматредукция.

Около половины вырабатываемых в мире соединений пятивалентного хлора используются при изготовлении зажигательных смесей, например, в производстве спичек. При этом в результате подготовки зажигательных смесей, после промывки шаровых мельниц и другого технологического оборудования образуются сточные воды, в состав которых, как правило, входят (мг/л):  $\text{ClO}_3^-$  – 731,0–1350,0;  $\text{Zn}^{2+}$  – 3,7–33,8;  $\text{Cr}^{6+}$  – 5,4–27,5;  $\text{Fe}^{3+}$  – 8,0–19,9;  $\text{Sb}^{3+}$  – 3,3–22,0. ХСК (химическое содержание кислорода) таких стоков составляет 224,0–430,0; БПК<sub>5</sub> (биохимическое потребление кислорода) – 95,4–120,0; pH колеблется в пределах 6,8–7,2, т.е. в промышленном стоке присутствуют токсические компоненты, и наиболее опасные из них – хлораты и хроматы. Сброс таких стоков на муниципальные очистные сооружения без предварительного обезвреживания запрещен. Наиболее часто для очистки стоков производства

© Г.Ф. Смирнова, В.С. Подгорский, Ф.В. Мучник, 2010

зажигательных смесей используют реагентный способ, основанный на взаимодействии токсических компонентов с двухвалентным железом в присутствии кальцинированной соды или извести. Сущность метода заключается в восстановлении  $\text{Cr}^{6+}$  в  $\text{Cr}^{3+}$  двухвалентным железом и последующим осаждением гидроксидов металлов щелочными агентами. Эффективность очистки вод от хрома и металлов достигает 90 %. [1]. Однако, при таком способе обработки стоков не удаляются одни из наиболее концентрированных загрязнителей – хлораты – чрезвычайно устойчивые в растворах и взрывоопасные в сухом виде соединения, которые остаются в жидкой фазе и сливаются в канализационную сеть без обезвреживания. Единственным способом нейтрализации стоков, содержащих этот токсикант, является биохимический, осуществляемый с помощью хлорат-восстанавливающих бактерий [11].

Влияние  $\text{Cr}^{6+}$  на биологическую нейтрализацию различных сточных вод (гальванических цехов, бытовых сточных вод, стоков резинового производства и т.п.) изучалось достаточно широко. Полученные результаты свидетельствуют об отрицательном влиянии  $\text{Cr}^{6+}$  на эффективность биологической обработки стоков. Токсическое воздействие хроматов на бактериальные системы многообразно и зависит от множества факторов [2,7].

Целью данной работы было исследовать характер восстановления хлоратов шт. *Acinetobacter thermotolerantus* C-1 при наличии в среде хроматов.

**Материалы и методы.** Объектом исследования являлся штамм хлоратвосстанавливающих бактерий *A. thermotolerantus* C-1, описанный нами ранее [6]. Штамм выращивали на основной среде, разработанной нами, состоящей из (г/л):  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} - 1,0$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1,0$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,1$ ;  $\text{NH}_4\text{Cl} - 2,0$ ;  $\text{KClO}_3 - 2,0$ ; мясоептонный бульон (МПБ) – 10 об.%; водопроводная вода – до 1 л., на агаризованной основной среде или на мясоептонном агаре (МПА). Отношение штамма к шестивалентному хрому изучали в несколько этапов:

– устойчивость к различным концентрациям  $\text{Cr}^{6+}$  проверяли при посеве 2-х суточной культуры *A. thermotolerantus* C-1, выращенной на МПА, на агаризованную (с добавлением 1.5 % агар-агара) основную среду, куда вместо хлората калия вносили  $\text{K}_2\text{CrO}_4 - 0,005-0,17$  г/л, чтобы концентрация  $\text{CrO}_4^{2-}$  в среде составила 3,0, 10,0, 20,0, 30,0, 50,0, 75,0 и 100,0 мг/л и отмечали появление видимого роста на поверхности среды;

– способность восстанавливать хроматы и зависимость этого процесса от концентрации последних изучали при посеве 1 мл смыва 2-х суточной культуры *A. thermotolerantus* C-1, выращенной на МПА, плотностью  $10^7$  кл/мл в жидкую основную питательную среду, куда вместо хлората калия вносили  $\text{K}_2\text{CrO}_4 - 0,005-0,17$  г/л, чтобы концентрация  $\text{CrO}_4^{2-}$  в среде составила 3,0, 10,0, 20,0, 30,0, 50,0, 75,0 и 100,0 мг/л. Результаты учитывали по концентрации хроматов;

– способность *A. thermotolerantus* C-1 использовать хроматы как акцептор электронов изучали при посеве 1 мл смыва 2-х суточной культуры *A. thermotolerantus* C-1, выращенной на МПА, плотностью  $10^7$  кл/мл в жидкую основную питательную среду, куда вместо хлората калия вносили  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  в концентрации 30,0 мг/л. Опыт учитывали по концентрации хромат-иона и росту биомассы;

– влияние концентрации хромат-ионов на скорость восстановления хлоратов штаммом *A. thermotolerantus* C-1 исследовали в жидкой минеральной основной среде, куда в зависимости от схемы опыта, наряду с хлоратами дополнительно вносили 3,0, 5,0, 20,0, 30,0, 50,0 мг/л хромат-ионов.

Опыты в жидкой среде проводили в пробирках объемом 20 мл, заполненных средой и закрытых резиновыми пробками для ограничения доступа воздуха, при 34 °С. Инокулятом (1 мл) служил смыв 2-х суточной культуры *A. thermotolerantus* C-1, выращенной на МПА, плотностью  $10^7$  кл/мл. По окончании опыта определяли концентрацию хроматов и хлоратов.

Концентрацию хлоратов определяли перманганатометрическим титрованием [3]. Концентрацию хромат-ионов определяли колориметрически с дифенилкарбазидом [10].

Скорость восстановления хлоратов и хроматов определяли из соотношения.

$$V = (C_0 - C) / t \text{ мг/л·час, где:}$$

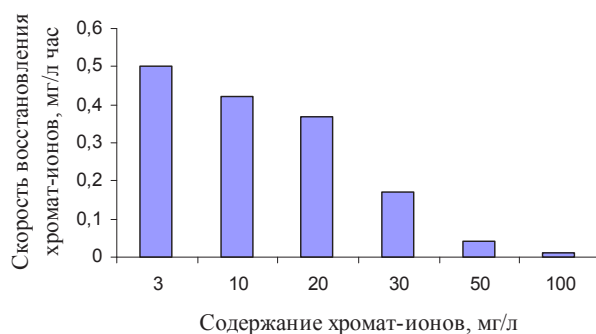
$C_0$  – начальная концентрация  $\text{CrO}_4^{2-}$  ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ), мг/л;

$C$  – концентрация хлорат-(хромат)-иона в конце опыта, мг/л;

$t$  – продолжительность опыта, час.

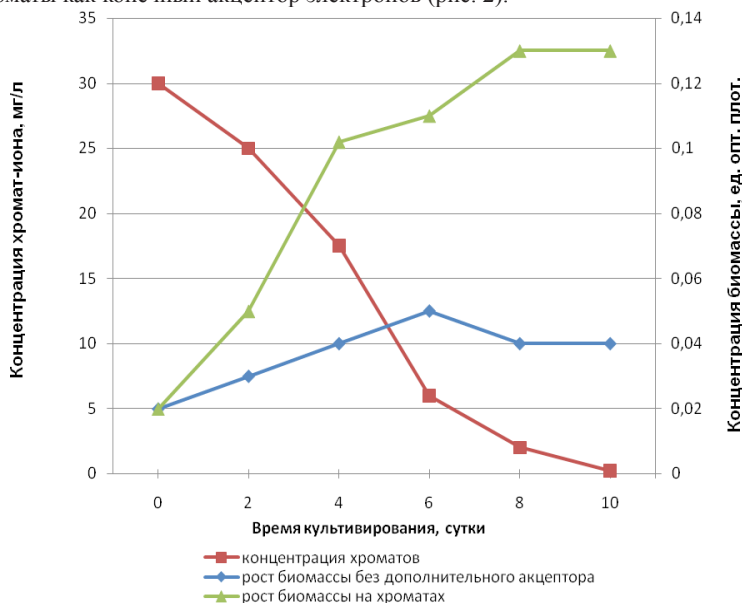
Концентрацию биомассы определяли нефелометрически [2]. .

**Результаты и их обсуждение.** Изучение влияния состава сточных вод производства спичек на восстановление хлоратов культурой *A. thermotolerantus* C-1 показало, что присутствие в стоках шестивалентного хрома и ионов цинка значительно тормозило хлоратредукцию, и только взаимодействие этих компонентов друг с другом и другими составляющими стоков снижало этот отрицательный эффект [5]. Потому на первом этапе мы изучили устойчивость культуры *A. thermotolerantus* C-1 к хроматам, их влияние на рост и возможность восстановления хроматов как единственного акцептора электронов в среде. Установлено, что резистентность штамма к хроматам зависела от концентрации их в среде, а также от способа культивирования. На агаризованной питательной среде время появления бактериального роста на поверхности среды при концентрации  $\text{CrO}_4^{2-}$  3,0–30,0 мг/л составило 2–4 суток, при 50,0–100,0 мг/л – 5–9 суток. Угнетающее действие хроматов при выращивании в жидкой питательной среде проявлялось сильнее (рис. 1). В этом случае скорость восстановления хромат-иона при концентрации 3–20 мг/л составила 0,5–0,37 мг/л·час, и понижалась в 2–2,3 раза при 30 мг/л. В среде с 50 мг/л спустя 2 недели еще обнаруживался шестивалентный хром. При 100 мг/л количество его не отличалось от контрольного образца без посева за весь период наблюдения (более 3-х месяцев).



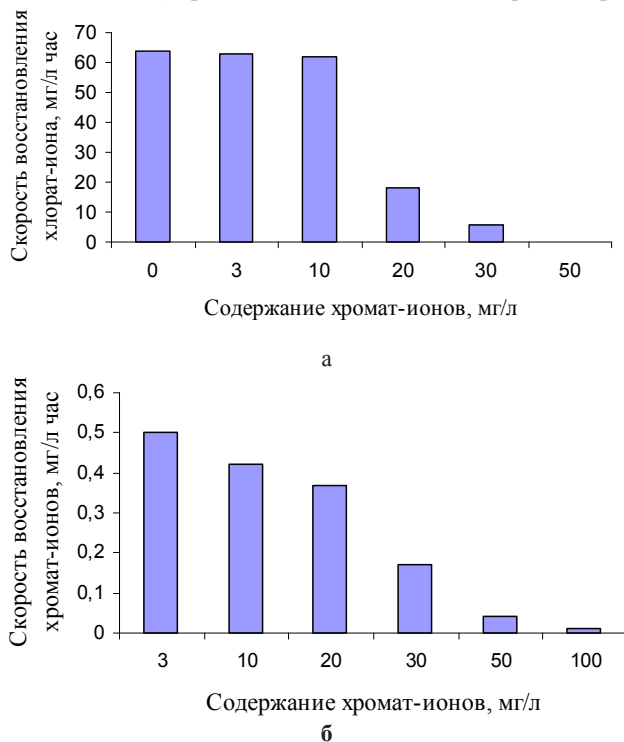
**Рис. 1.** Влияние концентрации  $\text{CrO}_4^{2-}$  на скорость его восстановления *Acinetobacter thermotolerantus* C-1

При культивировании *A. thermotolerantus* C-1 на жидкой минеральной среде с 30 мг/л хромата наряду со снижением количества шестивалентного хрома в среде наблюдался рост биомассы, который превосходил рост биомассы на среде без дополнительного внесения акцептора электронов. Это дает основание предположить, что данный микроорганизм использует хроматы как конечный акцептор электронов (рис. 2).



**Рис. 2.** Рост *Acinetobacter thermotolerantus* C-1 на хроматах как акцепторе электронов

*A. thermotolerantus* C-1 является активным хлоратредуктором, при выращивании на питательной среде с хлоратами скорость их восстановления достигала 59,6–63,7 мг/л в час и практически не зависела от концентрации хлоратов в широком диапазоне [4]. При совместном присутствии в среде хлоратов и хроматов скорость хлорат-восстановления зависела от концентрации хроматов и сохранялась на высоком уровне при содержании последних в среде до 5 мг/л. При повышении концентрации до 20,0–30,0 мг/л скорость хлоратредукции снижалась до 18,1–5,8 мг/л в час. Внесение в среду 50 мг/л хроматов полностью и необратимо угнетало этот процесс. Наряду с восстановлением хлоратов происходила редукция хроматов, которая не отличалась от восстановления их в среде, где присутствовали только хроматы, т.е. наличие в среде хлорат-ионов не влияло на хроматредукцию. Восстановление высоких концентраций хроматов (50,0 мг/л) происходило с минимальной скоростью (рис. 3).



**Рис. 3. Восстановление *Acinetobacter thermotolerantus* C-1**

**хлоратов (а) и хроматов(б) при совместном нахождении их в среде**

Сравнивая эти результаты с данными, полученными нами ранее [5], можно сделать вывод о том, что в условиях реальных стоков культура была более устойчива к токсическому действию хроматов, чем при культивировании на синтетической питательной среде. На оптимизированном стоке при содержании наряду с хлоратами хроматов (15мг/л) и ионов двухвалентного цинка (13,0 мг/л), который также ингибировал хлоратредукцию, скорость восстановления хлоратов достигала 55,5 мг/л в час. Причиной этому является наличие в сточных водах трехвалентного железа. Самостоятельное взаимодействие хроматов с трехвалентным железом, а также эффект сочетанного взаимодействия хроматов, цинка и железа значительно снижал ингибирующее воздействие хроматов на микробный метаболизм [5]. Подобное явление отмечали и другие исследователи [8, 9].

Таким образом, наличие хроматов в среде ингибировало восстановление хлоратов культурой *A. thermotolerantus* C-1, степень этого угнетения зависела от концентрации хроматов. Содержание их в среде 10,0 мг/л практически не влияло на хлоратредукцию. При повышении концентрации до 20,0–30,0 мг/л скорость хлоратредукции снижалась до 18,1–5,8 мг/л в час. Внесение в среду 50 мг/л хроматов полностью и необратимо угнетало восстановление хлорат-ионов.

Наряду с восстановлением хлоратов происходила и хроматредукция, скорость которой зависела только от концентрации хроматов. Хлораты на этот процесс влияния не оказывали.

Исходя из полученных данных можно сделать вывод о том, что при высоких концентрациях хроматов в среде (например, при непредвиденных залповых выбросах), для сохранения активной хлоратредукции стоки необходимо разводить. Для этого можно использовать очищенную сточную воду.

**Г.Ф. Смирнова, В.С. Підгорський, Ф.В. Мучник**

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ*

## **ВІДНОВЛЕННЯ ХЛОРАТІВ *ACINETOBACTER THERMOTOLERANTICUS* C-1 В ПРИСУТНОСТІ ХРОМАТ-ІОНІВ**

### **Резюме**

Швидкість відновлення хлоратів *A. thermotoleranticus* C-1 становила 59,6–63,7 мг/л за годину и практично не залежала від концентрації хлоратів у широкому діапазоні. При одночасному знаходженні у середовищі хлоратів і хроматів швидкість відновлення хлоратів залежала від концентрації хроматів і зберігалась на незмінному рівні при вмісті хроматів до 5 мг/л. При концентрації  $\text{CrO}_4^{2-}$  10,0 мг/л відновлення хлоратів *A. thermotoleranticus* C-1 несуттєво уповільнювалось. Підвищення вмісту  $\text{CrO}_4^{2-}$  до 20,0–30,0 мг/л знижувало швидкість відновлення хлоратів з 63,7 до 18,3–5,8 мг/л за год., а наявність 50,0 мг/л хроматів повністю інгібувало хлоратредукцію і призводило до повної втрати здатності *A. thermotoleranticus* C-1 відновлювати хлорати. Одночасно з відновленням хлоратів відбувалась і редукція хроматів. Швидкість відновлення хроматів *A. thermotoleranticus* C-1 при вмісті їх в середовищі 3–20 мг/л складала 0,5–0,37 мг/л за годину і значно знижувалась при підвищенні концентрації хромат-іонів. Наявність хлоратів не впливала на відновлення хроматів *A. thermotoleranticus* C-1.

Ключові слова: *Acinetobacter thermotoleranticus* C-1, хлорати, хромати, хлоратредукція, хроматредукція.

**G.F. Smirnova, V.S. Podgorsky, F.V. Muchnyk**

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

## **REDUCTION OF CHLORATES BY *ACINETOBACTER THERMOTOLERANTICUS* C-1 IN THE PRESENCE OF CHROMATE IONS**

### **Summary**

The rate of chlorate reduction by *A. thermotoleranticus* C-1 reached 59.6–63.7 mg/l an hour and did not practically depend on chlorate concentration in a broad range. Chlorate and chromate being jointly present in the medium, the rate of chlorate-reduction depended on chromate concentration and remained at the same level when content of chromate reached 5mg/l. Under  $\text{CrO}_4^{2-}$  of 10.0 mg/l the reduction of chlorate by *A. thermotoleranticus* became inconsiderably slower. The increase of  $\text{CrO}_4^{2-}$  content to 20.0–30.0 mg/l decreased the chlorate reduction rate from 63.7 to 18.3–5.8 mg/l an hour, and availability of 50.0 mg/l of chromate was the inhibiting concentration for chlorate destruction and led to irreversible loss of the capacity of *A. thermotoleranticus* C-1 to reduce chlorate. The reduction of chromate proceeded simultaneously with that of chlorate. The rate of chromate reduction by *A. thermotoleranticus* C-1 under their content in the medium of 3–20 mg/l was 0.5–0.37 mg/l an hour and decreased considerably with the increase of concentration of chromate-ions. Availability of chlorate had no effect on reduction of chromate by *A. thermotoleranticus* C-1.

The paper is presented in Russian.

**Keywords:** *Acinetobacter thermotoleranticus* C-1, chlorate, chromate, chlorate-reduction, chromate-reduction.

**The author's address:** Smirnova G.F., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Биологическая очистка хромсодержащих промышленных сточных вод: /Под ред. Е.И Квасникова, Н.С. Серпокрылова – Киев: Наукова думка, 1990. – 109 с.
2. Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхардта. – Т. 1, 3 – М.: Мир, 1983. – 800 с.
3. Пётрашень В.И. Объемный анализ – М.: Гостхимиздат, 1946. – 227с.
4. Смирнова Г.Ф. Оптимизация условий культивирования бактерий *Acinetobacter thermotoleranticus* C-1 для очистки сточных вод производства зажигательных смесей // Микробиол. журн. – 2006. – 68, № 4, – С. 27–34.

5. Смирнова Г.Ф. Влияние компонентов сточных вод на хлорат-восстанавливающую активность *Acinetobacter thermotoleranticus* С-1 // Химия и технология воды. – 2009. – **31**, № 5. – С. 595–601.
6. Степанюк В.В., Смирнова Г.Ф. Клошников Т.М. и др. Новый вид рода *Acinetobacter* – *A. thermotoleranticus* sp.nov. // Микробиология. – 1992. – **61**, № 3. – С. 490–500.
7. Chen, Jin M. Hao Oliver J. Microbial Chromium (VI) reduction // Environ. Sci. and Technol. – 1998. – **28**, № 3. – P. 219–251.
8. Gokcay C.F, Yetis U. Effect of chromium (VI) on activated sludge. // Water Res. – 1991. – **25**, N 1. – P. 65–71.
9. Mazierski J. Effect of chromium (VI) on the growth rate of denitrifying bacteria // Water Res. – 1994. – **28**, N 9. – P. 1981–1987.
10. Pilkington E.S., Smith P.R. Spectrophotometric determination of chromium in ilmenite // Anal. Chim. Acta – 1965. – 39. – P. 321–328.
11. Van Ginkel, C.G., Plugge, C.M. and Stroo, C.A. Reduction of chlorate with various energy substrates and inocula under anaerobic conditions. // Chemosphere. – 1995. – 31. – P. 4057–4066.

Отримано 14.04.2009