

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 ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

*Влияние тяжелых металлов на *Acinetobacter thermotoleranticus* C-1 изучалось по скорости восстановления хлоратов и росту биомассы. Установлено, что в форме свободного иона Fe^{3+} стимулирует и восстановление хлоратов *A. thermotoleranticus* C-1 и рост биомассы. Cd^{2+} , Pb^{2+} и Mn^{2+} практически не влияют на скорость процесса или слегка повышают ее, Cu^{2+} и Zn^{2+} снижают скорость редукции ClO_3^- в 2,5-3 раза. При этом рост биомассы тормозится слабее, чем скорость восстановления. Никель и кобальт в концентрации 10 мг/л оказывают значительное ингибирующее действие на восстановление хлоратов. Металлы в форме гидроксид-иона оказались менее токсичными для шт. C-1, чем их ионные формы. Совместное действие свободного иона, гидроксида металла и количества органического питания оказывает более сильное (стимулирующее или угнетающее) влияние на процесс, чем каждый из факторов в отдельности.*

*Ключевые слова: *Acinetobacter thermotoleranticus* C-1, восстановление хлоратов, тяжелые металлы, ионная и гидроксидная форма металлов.*

Микробное дыхание с хлоратами или перхлоратами в качестве акцептора электронов в анаэробных условиях известно почти столетие. Высокий окислительно-восстановительный потенциал этих соединений ($ClO_4^-/Cl^- = 1,287$ V; $ClO_3^-/Cl^- = 1,03$ V) делает их идеальными акцепторами в микробном метаболизме [7].

Соединения хлора высшей валентности попадают в окружающую среду преимущественно в результате хозяйственной деятельности человека как дезинфицирующие вещества, отбеливатели, гербициды, взрывчатые соединения и т.п. Оксиданионы хлора используются более чем в 150 отраслях промышленности. Не смотря на то, что кислородные соединения хлора высшей валентности – мощнейшие окислители, при обычных условиях они чрезвычайно устойчивы из-за очень высокой энергии активации, необходимой для их восстановления. Эти соединения практически не сорбируются почвой, осадками, и при отсутствии какого-либо биологического взаимодействия долго сохраняются в окружающей среде. На мобильность кислородных соединений хлора сильно влияет водный режим. Возможность очистки окружающей среды от загрязнения этими токсикантами связывают исключительно с микробной деятельностью.

Как известно, в промышленных сточных водах загрязняющие вещества не встречаются изолировано, а присутствуют в различных комбинациях, что влияет на суммарный эффект токсичности их для бактерий. В предыдущих работах мы показали, что наличие в сточных водах шестивалентного хрома и ионов Zn^{2+} тормозит хлоратовосстановление культурой *A.thermotoleranticus* C-1, в то же время наличие в среде трехвалентного железа значительно стимулирует процесс восстановления хлоратов [4]. Особенности восстановления хлоратов в присутствии хроматов было детально изучено нами в предыдущих исследованиях [5].

Целью данной работы было изучить особенности восстановления хлоратов культурой *A.thermotoleranticus* C-1 при наличии в среде ряда тяжелых металлов, а также выяснить, в каком виде – свободных или гидроксид-ионов – металлы оказывают наибольшее влияние на хлоратредукцию.

Материалы и методы. Объектом исследования был штамм хлоратовосстанавливающих бактерий *A. thermotoleranticus* C-1, описанный нами ранее [6]. Штамм выращивали на разработанной нами основной среде, состоящей из (г/л): $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ – 1,0; KH_2PO_4 – 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,1; NH_4Cl – 2,0; $KClO_3$ – 2,0; Na - лимоннокислый 3-х зам. – 1,0; водопроводная вода – до 1 л. Влияние тяжелых металлов на хлоратредукцию изучали в несколько этапов:

– Для выяснения влияния концентрации тяжелых металлов на восстановление хлоратов *A. thermotoleranticus* C-1, культуру высевали на основную среду, куда вносились соли тяже-

лых металлов: $Fe_2(SO_4)_3$, $CdCl_2$, $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$, $Pb(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$; $NiCl_2 \cdot 6H_2O$; $ZnSO_4$, $MnCl_2 \cdot 3H_2O$, растворенные в дистиллированной воде до конечной концентрации их в среде 30 мг/л по катиону.

Влияние концентрации и формы присутствия металла на скорость восстановления хлоратов изучали методом полного факторного эксперимента (ПФЭ) типа 2^3 . Факторами, которые предположительно могут оказывать влияние на процесс, были выбраны следующие (табл. 1): X_1 – концентрация органического вещества, %; X_2 , X_3 – соответственно, концентрация свободного и гидроксид-иона металла, мг/л.

Таблица 1

Значение уровней и интервал варьирования факторов

Уровень варьирования факторов	X_1	X_2	X_3
Нулевой	100	30	300
Верхний +	190	59	500
Нижний -	10	1	100
Интервал варьирования	90	29	200

*Примечание: за 100 % была взята концентрация цитрата в основной среде

Параметром оптимизации процесса Y являлась средняя скорость восстановления ClO_3^- мг/л • час (V), которую определяли из соотношения

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

C_0 – начальная концентрация ClO_3^- , мг/л; C – концентрация хлорат-иона в конце опыта, мг/л.

Математическую обработку результатов факторных экспериментов проводили согласно [1,2]. Концентрацию хлоратов определяли перманганатометрическим титрованием [3]. Биомассу определяли нефелометрически.

Результаты и обсуждение. Полученные данные свидетельствуют о том, что наличие в среде тяжелых металлов может как стимулировать, так и угнетать восстановление хлоратов. Fe^{3+} стимулирует и восстановление хлоратов *A. thermotoleranticus* C-1 и рост биомассы, кадмий, свинец и Mn^{2+} практически не влияют на скорость процесса или слегка стимулируют его, Cu^{2+} и Zn^{2+} в использованных количествах увеличивают время полного восстановления ClO_3^- в 2,5–3 раза, при этом рост биомассы тормозится слабее, чем скорость восстановления хлоратов (рис. 1). Наличие в среде 30 мг/л Ni^{2+} или Co^{2+} полностью ингибирует процесс восстановления хлоратов, которое возобновлялось лишь после снижения концентрации этих металлов до 5 мг/л, однако проходило со значительно меньшей скоростью, чем в контроле (рис. 2).

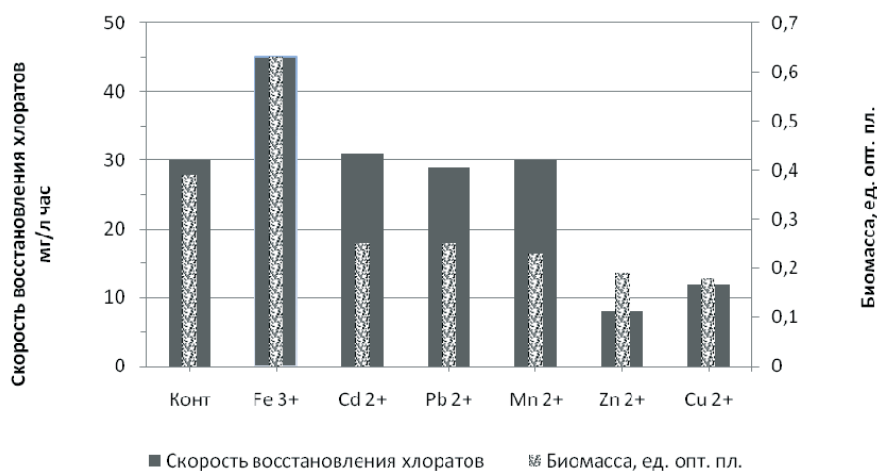


Рис. 1. Скорость восстановления хлоратов и рост биомассы *A. thermotoleranticus* C-1 в присутствии тяжелых металлов.

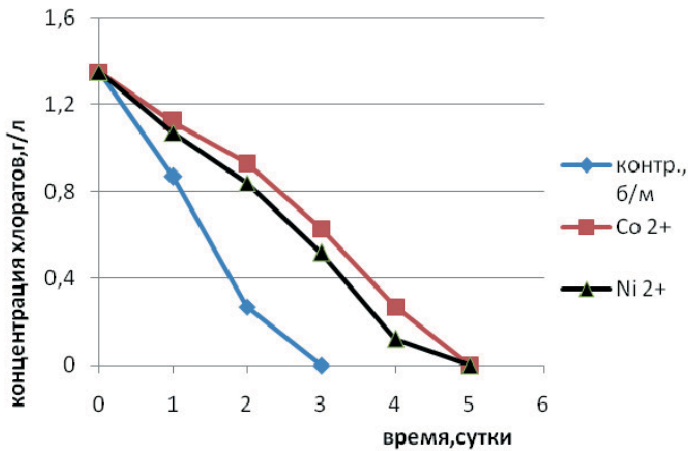


Рис. 2. Восстановление хлоратов в присутствии Co^{2+} и Ni^{2+} (5 мг/л)

Известно, что металл в форме гидроксида является менее токсичным по сравнению с его ионной формой [8]. Для изучения этого вопроса были реализованы факторные эксперименты, где факторами являлись концентрации ионной и гидроксидной форм изучаемых металлов, а также концентрация органического питания. В результате реализации ПФЭ 2^3 получены экспериментальные значения скоростей биохимического восстановления хлоратов при наличии в среде металлов в форме гидроксид- или свободного иона. Определение величины и математической значимости коэффициентов позволило получить уравнения регрессии, адекватно описывающие процесс восстановления хлоратов при следующих условиях.

В присутствии Fe^{3+} восстановление хлоратов описывается уравнением

$$Y = 0,552 + 0,295 X_2 + 0,084 X_1 X_2 - 0,134 X_1 X_3 + 0,276 X_2 X_3.$$

Согласно полученному уравнению можно сделать вывод о том, что наиболее положительное влияние на процесс оказывают: железо в форме свободного иона (+0,295 X_2), его взаимодействие с гидроксидом железа (+0,276 $X_2 X_3$), а также взаимодействие железа в форме свободного иона и органического питания (+0,084 $X_1 X_2$). Поэтому для повышения скорости восстановления хлоратов необходимо одновременно увеличить концентрацию железа в форме свободного иона и концентрацию органического питания. При повышении в составе стоков содержания гидроксида железа целесообразно уменьшить концентрации источника углерода (-0,134 $X_1 X_3$).

Как показали наши предыдущие исследования, цинк оказывает значительное отрицательное влияние на хлоратредукцию [4]. Уравнение регрессии, описывающее процесс восстановления хлоратов при наличии в среде цинка, имеет вид

$$Y = 0,043 + 0,153 X_1 - 0,016 X_2 - 0,194 X_1 X_2 - 0,007 X_1 X_3 - 0,051 X_2 X_3 - 0,04 X_1 X_2 X_3 + 0,123 X_1^2 - 0,158 X_2^2 - 0,148 X_3^2 - 0,245 X_1^2 X_2 - 0,85 X_1^2 X_3.$$

Анализ уравнения показывает, что для увеличения скорости процесса желательно повысить концентрацию питательных веществ, снизить содержания цинка как в свободном виде, так и в виде гидроксид-иона. Это вызовет меньший отрицательный эффект (взаимодействие $X_1 X_2$; $X_1 X_3$; $X_2 X_3 X_1^2 X_2$; $X_1^2 X_3$) на скорость процесса, чем положительный эффект от всех факторов (коэффициенты при факторах X_1 ; X_2^2 ; $X_2^2 X_3$). Следовательно, попадание цинка в любой форме в хлоратсодержащий сток тормозит процесс восстановления ClO_3^- .

Уравнение регрессии, адекватно описывающее процесс восстановления хлоратов при наличии в среде кадмия, имеет следующий вид:

$$Y = 0,0083 X_1 + 0,094 X_2 + 0,008 X_3 + 0,0064 X_1 X_2 + 0,052 X_1 X_3 + 0,0183 X_2 X_3 + 0,0075 X_1 X_2 X_3 - 0,0091 X_1 X_2 X_3 - 0,0489 X_1^2 X_2 - 0,073 X_1^2 X_3.$$

Анализ коэффициентов уравнения регрессии свидетельствует о том, что наличие кадмия в сточной воде и в форме свободного, и в форме гидроксид-иона практически не оказывает влияния на скорость восстановления хлоратов, поскольку увеличение X_1 , X_2 и X_3 , вызывающее повышение скорости процесса, влечет за собой примерно такое же уменьшение, судя по

величине коефіцієнтів при взаємодії $X_1^2X_2$ і $X_1^2X_3$. Таким образом, стоки, содержащие кадмий, могут быть направлены в биореактор по нейтрализации хлоратов без предварительной обработки.

Процесс восстановления хлоратов при наличии в среде никеля описывается уравнением $Y = 0,034 - 0,03X_2 - 0,1X_1X_2 - 0,109X_1X_3 + 0,03X_2X_3 + 0,115 X_1X_2X_3 + 0,054X_1^2 + 0,061X_2^2 + 0,014X_3^2 + 0,132X_3^2X_1 - 0,111X_2X_3^2 - 0,012X_2^2X_3$.

Анализируя полученные данные, можно сказать, что никель в форме гидроксид-иона менее токсичен для хлоратовосстанавливающих бактерий, чем Ni^{2+} . Наибольшее отрицательное влияние на процесс очистки от хлоратов оказывает никель в форме свободного иона, концентрацию которого для достижения максимальной эффективности процесса необходимо уменьшать. При этом скорость очистки вод будет увеличиваться при одновременном уменьшении органического питания или $Ni(OH)_2$ (эффект взаимодействия $X_1X_2X_3$) или при увеличении X_1 и X_3 (эффект взаимодействия $X_3^2X_1$, X_2X_3). Следовательно, при попадании Ni^{2+} в сток, содержащий хлораты, его необходимо перевести в гидроксидную форму.

Уравнение, описывающее процесс восстановления хлоратов при наличии в среде меди, имеет вид:

$Y = 0,0432 - 0,0231X_1 - 0,0456X_2 - 0,184X_3 - 0,072X_1X_2 + 0,0096X_1X_3 - 0,0096X_2X_3 + 0,0658X_1X_2X_3$.

Анализ уравнения показывает, что наименьшее отрицательное влияние на процесс восстановления хлоратов оказывает присутствие в среде $Cu(OH)_2$. Для повышения скорости процесса необходимо снизить количество меди в ионной форме. Следовательно, перед подачей в биореактор сточной воды, содержащей примеси меди, ее необходимо подщелочить для перевода ионов меди в гидроксидную форму, либо вообще не направлять стоки, содержащие медь, в общий биореактор.

Таким образом, установлено, что при концентрации 30 мг/л Fe^{3+} стимулирует и восстановление хлоратов *A. thermotolerantus* C-1, и рост биомассы; кадмий, свинец и Mn^{2+} практически не влияют на скорость процесса или слегка увеличивают ее, Cu^{2+} и Zn^{2+} увеличивают время полного восстановления ClO_3^- в 2,5–3 раза, при этом рост биомассы тормозится слабее, чем скорость восстановления. Никель и кобальт в указанном количестве оказывают ингибирующее влияние на восстановление хлоратов. Металлы в форме гидроксид-иона оказались менее токсичными для шт. C-1, чем их ионные формы. Совместное действие свободного иона, гидроксида металла для каждого из металлов и количества органического питания оказывает более сильное (стимулирующее или угнетающее) влияние на процесс, чем каждый из этих факторов в отдельности.

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 У ПРИСУТНОСТІ ДЕЯКИХ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

Резюме

Вплив важких металів на *Acinetobacter thermotolerantus* C-1 вивчався за швидкістю відновлення хлоратів і росту біомаси. Встановлено, що при концентрації 30 мг/л Fe^{3+} у формі вільного іона стимулює і відновлення хлоратів *A. thermotolerantus* C-1, і ріст біомаси, Cd^{2+} Pb^{2+} і Mn^{2+} практично не впливають на швидкість процесу або злегка стимулюють його. Cu^{2+} і Zn^{2+} знижують швидкість редукції ClO_3^- в 2,5-3 рази. При цьому зростання біомаси гальмується слабкіше, ніж швидкість відновлення. Нікель і кобальт у вказаній кількості повністю інгібують процес відновлення. Метали у формі гідроксид-іона виявилися менш токсичними для шт. C-1, ніж їхні іонні форми. Спільна дія вільного іона, гідроксиду металу і кількість органічного живлення виявляє істотніший (стимулюючий або пригноблюючий) вплив на процес, ніж кожен з цих чинників окремо.

Ключові слова: *Acinetobacter thermotolerantus* C-1, відновлення хлоратів, важкі метали, іонна і гідроксидна форма металів.

**REDUCTION OF CHLORATE IN THE PRESENCE OF HEAVY METALS
BY ACINETOBACTER THERMOTOLERANTICUS C- 1**

S u m m a r y

Influence of heavy metals on *Acinetobacter thermotoleranticus* C- 1 was studied by the rate of chlorate reduction and biomass growth. It was established that Fe_3^+ in a form of free ion at concentration of 30 mg/l also stimulates both the reduction of chlorate by *A. thermotoleranticus* C- 1 and the growth of biomass, Cd^{2+} Pb^{2+} and Mn^{2+} do not practically affect the process velocity or stimulate it a little, Cu^{2+} and Zn^{2+} lower the reduction rate of ClO_3^- 2.5-3 times, under these conditions the biomass growth is inhibited more weakly than the reduction rate.

Nickel and cobalt in the mentioned amount inhibit completely the process of reduction. Metals in the form of hydroxide-ion proved to be less toxic for str. C-1, than their ion forms. General influence of a free ion, metal hydroxide and the amount of organic nutrition takes more considerable (stimulating or inhibiting) influence on the process, than each of these factors itself.

The paper is presented in Russian.

Key words: *Acinetobacter thermotoleranticus* C- 1, reduction of chlorate, heavy metals, ion and hydroxide form of metals.

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. Воробьев Ф.П., Голобородько Н.К., Мануйлов А.М. Математическое планирование эксперимента в биологии и медицине. – Харьков : Вища школа, 1977. – 143с.
2. Максимов В.Н. Многофакторный эксперимент в биологии. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1980. – 280 с
3. Петрашень В.И. Объемный анализ. – М.: Наука, 1946. – 227с
4. Смирнова Г.Ф. Влияние состава сточных вод на скорость их обезвреживания культурой *Acinetobacter thermotoleranticus* C-1// Химия и технология воды. – 2009. – **31**, №5. – С.595–601
5. Смирнова Г.Ф., Подгорский В.С., Мучник Ф.В. Восстановление хлоратов культурой *Acinetobacter thermotoleranticus* C-1 в присутствии хроматов // Микробиол. Журн. – 2010. – **72**, №5 – С.14–19
6. Степанюк В.В., Смирнова Г.Ф. Ключникова Т.М. и др. Новый вид рода *Acinetobacter* – *A. thermotoleranticus* sp.nov. //Микробиология. – 1992. – **61**, № 3. – С. 490 – 500.
7. Coates, J. D., Michaelidou U. S., O'Connor S. M., Bruce R. A., Achenbach L.A. The Diverse Microbiology of (Per)chlorate reduction : Perchlorate in the Environment / Ed. by E. D. Urbansky. – New York : Kluwer Academic/ Plenum, 2000. – P. 257–270
8. Nies D.H. Microbial heavy-metal resistance // Appl Microbiol Biotechnol. – 1999. – **51**, N6.– P.730–750.

Отримано 17.05.2011