

Г.Ф. Смирнова, В.С. Подгорский

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

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ХРОМАТОВ *PSEUDOMONAS* SP. ШТ. 10 В ПРИСУТСТВИИ НЕКОТОРЫХ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И АЛЬТЕРНАТИВНЫХ АКЦЕПТОРОВ ЭЛЕКТРОНОВ

Pseudomonas sp шт. 10 восстанавливает хроматы со скоростью 0,54 мг/л·ч. Наличие в среде Cd^{2+} и Zn^{2+} практически не влияет на скорость процесса или слегка повышает ее. Присутствие никеля и меди в ионной форме замедляет редукцию хромата в 2,4 и 4,2 раз, соответственно. Перевод этих металлов в гидроксидную форму значительно снижает их негативное влияние. Железо (III) как в ионной, так и в гидроксидной форме ингибирует восстановление хромата *Pseudomonas sp шт. 10*. Совместное присутствие всех изученных металлов снижает их отрицательное влияние на редукцию хромата, т. е., эти металлы можно нейтрализовать совместно без значительного снижения эффективности процесса при условии отвода меди по отдельному трубопроводу. Наличие альтернативных акцепторов электронов угнетает восстановление хроматов. Степень ингибирования зависит от концентрации и времени контакта. Сильнее всего на редукцию хроматов влияют сульфаты и кислородные анионы хлора–хлораты и перхлораты.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Pseudomonas sp шт. 10*, восстановление хроматов, тяжелые металлы, ионная и гидроксидная форма металлов, альтернативные акцепторы электронов, сульфаты, хлораты, перхлораты.

Изучение закономерностей превращения металлов под влиянием деятельности микроорганизмов имеет не только научное, но и большое практическое значение для понимания геохимических особенностей миграции металлов, а также для разработки и совершенствования технологии очистки промышленных сточных вод от их ионов [2].

Основным источником поступления тяжелых металлов в водоемы через сети водоотведения являются технологические сточные воды и отработанные растворы электролитов. При этом наиболее широкий спектр загрязнения по составу и концентрациям дают сточные воды гальванических производств. В этих водах кроме токсичных ионов шестивалентного хрома, содержатся ионы других тяжелых металлов, количество которых в стоках колеблется от 1 мг до 1 г/л [4]. В малых концентрациях эти элементы могут быть трансформированы некоторыми микроорганизмами и таким образом удалены из среды. Определенные группы микроорганизмов способны использовать те или иные соединения тяжелых металлов в нетоксичных концентрациях в качестве источника энергии или конечного акцептора электронов. Низкие концентрации могут стимулировать рост микроорганизмов [5]. В промышленных сточных водах ионы тяжелых металлов практически не встречаются изолированно, а присутствуют в разнообразных комбинациях. Это оказывает влияние на суммарный эффект токсичности. При этом реальная токсичность металлов может оказаться больше или меньше их индивидуальной токсичности. Степень токсичности любого соединения зависит от того, находится оно в растворе в виде свободного иона или в виде недиссоциированной соли. Показано, что тяжелый металл, находящийся в растворах в виде свободного иона, более токсичен для микроорганизмов, чем в виде гидроксида [1,5,7].

Практика обезвреживания сточных вод гальванических производств не предполагает локальной очистки стоков с различных участков производства. Как правило, формируется один общезаводской сток со смешанным непостоянным составом. В реальных стоках наряду с хроматами присутствуют тяжелые металлы и другие кислородсодержащие анионы. Эти соединения могут использоваться хроматвосстанавливающими бактериями как альтернативные акцепторы электронов, что может сильно влиять на скорость обезвреживания шестивалентного хрома.

Целью работы было изучить влияние альтернативных акцепторов электронов и тяжелых металлов на скорость восстановления хроматов *Pseudomonas sp. 10*, а также разработать рекомендации по предварительной подготовке сточных вод, подаваемых на очистку.

© Г.Ф. Смирнова, В.С. Подгорский, 2013

Материалы и методы. Объектом исследования была хроматредуцирующая бактерия *Pseudomonas* sp. 10, изолированная из ила третьей секции станции биохимической очистки завода «Радар» на среде следующего состава (г/л): $\text{NH}_4\text{Cl} - 2,0$; $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 1,0$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1,0$; $\text{MgSO}_4 - 0,2$; $\text{NaCl} - 0,1$; $\text{CaCl}_2 - 0,02$; МПБ – 5 % от объема среды, хроматы вносились в виде K_2CrO_4 в концентрации 0,2 г/л. Выращивали в условиях ограниченного доступа воздуха под резиновыми пробками. Получение чистой культуры проводили на МПА с 0,2 г/л хроматов. Чистую культуру хранили на такой же жидкой или агаризованной среде, содержащей не менее 0,1 г /л K_2CrO_4 . Для выяснения влияния формы нахождения тяжелых металлов на скорость восстановления хроматов, культуру высевали на основную среду, куда наряду с хроматами (50мг/л) вносились соли тяжелых металлов: $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, CdCl_2 ; $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; ZnSO_4 , растворенные в дистиллированной воде до конечной концентрации их в среде 30 мг/л по катиону. Контролем служило восстановление хроматов на среде только с хроматом. Источником органического питания был МПБ (10 об.%). Опыты проводили при pH 6,5 и 7,5.

Восстановление хроматов при одновременном присутствии всех наиболее часто встречающихся в гальванических стоках тяжелых металлов изучали с помощью полного факторного эксперимента (ПФЭ)²³. [3]. Факторами, определяющими процесс, были выбраны следующие: $X_1 - \text{Ni}^{2+}$; $X_2 - \text{Cu}^{2+}$; $X_3 - \text{Fe}^{3+}$; $X_4 - \text{Cd}^{2+}$; $X_5 - \text{Zn}^{2+}$. Значение уровней и интервалов варьирования приведено в табл. 1.

Таблица 1

Уровни и интервал варьирования факторов, мг/л

Уровень варьирования	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5
Нулевой	20	20	20	20	20
Верхний +	39	39	39	39	39
Нижний –	1	1	1	1	1
Интервал варьирования	19	19	19	19	19

Влияние кислородсодержащих анионов (КА) $-\text{SO}_4^{2-}$, NO_3^- , ClO_3^- , ClO_4^- на скорость восстановления хроматов изучаемой культурой проверяли на жидкой минеральной среде с 10 об.% МПБ. В среду, наряду с хроматами, вносили по одному из вышеперечисленных анионов в концентрации от 15 до 120 мг/л. Учет опыта проводили на 24 и 48 ч роста. Во всех опытах посевным служил 1 мл (плотностью $10^5 - 10^6$ кл/мл) суспензии клеток, выращенных на МПА и смывых минеральной средой без внесения какого-либо акцептора. Культуры выращивали на жидкой минеральной среде под резиновыми пробками при 34°C. О восстановлении хроматов судили по снижению концентрации шестивалентного хрома, определяемого колориметрически с дифенилкарбазидом (ДФК) [8]. Скорость восстановления хромата определяли по формуле $(C_0 - C_t)/t$, мг/л·ч. Контролем служило восстановление хроматов на среде без добавок солей тяжелых металлов и альтернативных акцепторов. Источником углеродного питания во всех опытах был МПБ в количестве 10 об.%. Все опыты проводили в трех повторностях. Статистическую обработку вели согласно Максимуму [3].

Результаты и их обсуждение. Показано, что на среде с чистыми хроматами скорость восстановления их культурой *Pseudomonas* sp шт. 10 составляла 0,54 мг/л·ч. Дополнительное внесение в среду тяжелых металлов по-разному влияло на процесс восстановления. Цинк и кадмий в обеих формах не влияли на скорость восстановления, медь и никель в форме свободного иона сильно тормозили редукцию, тогда как перевод этих металлов в гидроксидную форму значительно слабее воздействовал на восстановление шестивалентного хрома, т.е. перед подачей в биореактор никель- и медьсодержащие стоки целесообразно подщелачивать. Трехвалентное железо угнетало восстановление хроматов находясь как в ионной, так и в гидроксидной форме (рис. 1).

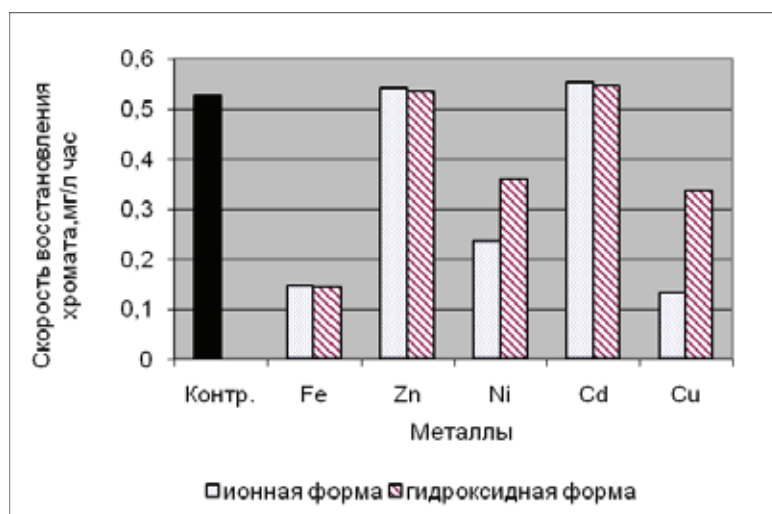


Рис. 1. Восстановление хромата в присутствии различных металлов

В практике эксплуатации систем водоотведения гальванических цехов разделить металл-содержащие сточные воды на отдельные потоки сложно в техническом и экономическом отношениях, поэтому они чаще всего отводятся на очистку по общему трубопроводу. Это может оказать влияние на суммарный эффект токсичности, т.е. реальная токсичность металлов может оказаться больше или меньше индивидуальной [7]. Изучение совместного влияния тяжелых металлов, чаще всего содержащихся в гальванических стоках проводили методом ПФЭ 2⁵. При математической обработке результатов реализации факторного эксперимента получено уравнение регрессии, адекватно описывающее процесс восстановления хроматов культурой *Pseudomonas* sp. 10 при наличии в среде нескольких тяжелых металлов:

$$Y = 3,35 - 3,18 X_2 + 2,85 X_3 - 1,53 X_1 X_2 - 0,74 X_1 X_4 + 1,7 X_1 X_5 - 2,73 X_2 X_3 + 0,412 X_2 X_5 + 1,16 X_4 X_5 + 1,84 X_1 X_3 X_5$$

Анализ полученного уравнения позволяет сделать вывод о том, что при наличии в стоке нескольких металлов ингибирующее действие отдельных металлов снижается. В пределах интервала варьирования статистически незначимо на процесс влияют X_1 (никель), X_4 (кадмий), X_5 (цинк), но их влияние весьма существенно в эффектах взаимодействия. За счет взаимодействия никеля с цинком и железом снимается его ингибирующее влияние на процесс восстановления. Во взаимодействии с сопутствующими металлами практически исчезает ингибирующее влияние железа, т.е. можно сделать вывод, что кадмий, никель, цинк и железо можно отправлять на очистку по общему трубопроводу, без снижения эффективности очистки. Отрицательно сказывается наличие меди в среде ($-3,18 X_2$), а также ее взаимодействие с железом ($-2,73 X_2 X_3$), и только совместно с цинком медь оказывает незначительное положительное воздействие ($+0,412 X_2 X_5$), следовательно, очистку медь- и хромсодержащих вод необходимо проводить отдельно.

Помимо тяжелых металлов в сточных водах часто присутствуют кислородсодержащие анионы, которые могут использоваться культурой *Pseudomonas* sp. 10 как альтернативные акцепторы электронов. Как показали наши исследования, наличие в среде дополнительного акцептора электронов, как правило, угнетает восстановление хроматов (табл. 2). Степень угнетения зависит от вида дополнительного аниона, его концентрации и продолжительности совместного культивирования. Сильнее всего хроматредукцию ингибировали сульфаты, что не удивительно, поскольку сульфаты и хроматы поступают в клетку по сульфаттранспортной системе т.е. имеет место конкуренция за транспортную систему [6]. Далее по силе воздействия стоят хлораты и перхлораты, что можно объяснить, вероятно, образованием токсичных интермедиатов восстановления этих анионов – хлоритов, которые при концентрации около 15 мг/л токсичны для большинства микроорганизмов. Меньше всего на процесс редукции влияют нитраты. Следует отметить, что при увеличении времени культивирования на средах

с невысокими количествами дополнительных акцепторов скорость восстановления хроматов довольно быстро приближается к контрольным величинам. Увеличение концентрации дополнительного акцептора, а также время культивирования на таких средах замедляет время реабилитации культуры.

Таблица 2

Восстановление хроматов в присутствии альтернативных акцепторов электронов

Конц. дополн. КСА, мг/л	Время культивир., ч	Скорость восстановления Cr ⁶⁺ мг/л ч в присутствии:				Контроль (без дополнит. НКСА)
		SO ₄ ²⁻	NO ₃ ⁻	ClO ₃ ⁻	ClO ₄ ⁻	
15,0	24	0,448(84%)	0,538 (101%)	0,698 (131%)	0,361 (68%)	0,531
	48	0,33 (100%)	0,33 (100%)	0,33 (100%)	0,316(96%)	0,33
30,0	24	0,323(82%)	0,379 (96%)	0,372 (94)	0,324(82%)	0,393
	48	0,33 (100%)	0,323(98%)	0,33 (100%)	0,307(93%)	0,33
60,0	24	0,269(52%)	0,313 (60%)	0,255(49%)	0,223(43%)	0,518
	48	0,317 (96%)	0,305 (92%)	0,327(99%)	0,281(85%)	0,33
90,0	24	0,122(27%)	0,316 (70%)	0,108(24%)	0,095(21%)	0,450
	48	0,304 (92%)	0,298 (90%)	0,309(93%)	0,264(80%)	0,33
120,0	24	0,015(3%)	0,174 (36%)	0,045 (9,3%)	0,074(15%)	0,483
	48	0,287(86%)	0,273(73%)	0,303 (92%)	0,250(76%)	0,33

Примечание: в скобках приведен % от скорости восстановления хрома в контрольном опыте.

Таким образом, наличие в сточных водах тяжелых металлов и дополнительных акцепторов электронов угнетает редукцию хроматов культурой *Pseudomonas* sp. 10. Сильнее всего на этот процесс влияет железо как в ионной, так и в гидроксидной форме, снижая скорость восстановления до 0,146 мг/л·ч, медь в ионной форме (0,132 мг/л·ч), а также сульфаты (0,015 мг/л·ч) и кислородные анионы хлора – хлораты и перхлораты – (0,045 и 0,074 мг/л·ч) при концентрации этих анионов 120 мг/л. Подобное явление необходимо учитывать при проектировании очистных сооружений, предусматривая дополнительный объем биореактора для достижения запланированных параметров очистки.

Г.Ф. Смирнова, В.С. Підгорський

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

**ВІДНОВЛЕННЯ ХРОМАТІВ *PSEUDOMONAS* SP. ШТ. 10
У ПРИСУТНОСТІ ДЕЯКИХ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ ТА АЛЬТЕРНАТИВНИХ
АКЦЕПТОРІВ ЕЛЕКТРОНІВ**

Резюме

Pseudomonas sp. шт. 10 відновлює хромати зі швидкістю 0,54 мг/л·год. Наявність у середовищі Cd²⁺ і Zn²⁺ практично не впливає на швидкість цього процесу або дещо підвищує її. Присутність у середовищі нікелю та міді у іонній формі гальмує редукцію хромату у 2,4 і 4,2 рази, відповідно. Переведення цих металів у гідроксидну форму значно зменшує їх негативний вплив. Залізо (III) як у іонній, так і в гідроксидній формі пригнічує відновлення хромату *Pseudomonas* sp. шт. 10. Спільне знаходження всіх досліджуваних металів зменшує їх негативний вплив на редукцію хромату, тобто, ці метали можна знешкоджувати одночасно без зниження ефективності очистки за умови відводу міді окремим трубопроводом. Наявність альтернативних акцепторів електронів пригнічує відновлення хроматів. Ступінь інгібування залежить від концентрації альтернативного акцептора та тривалості контакту. Найсильніше редукцію хроматів гальмують сульфати та кисневі аніони хлору – хлорати і перхлорати.

Ключові слова: *Pseudomonas* sp. шт. 10, відновлення хроматів, важкі метали, іонна і гідроксидна форма металів, альтернативні акцептори електронів, сульфати, хлорати, перхлорати.

G.F. Smirnova, V.S. Pidgorskyi

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

**CHROMATE REDUCTION BY *PSEUDOMONAS* SP. STR. 10
IN THE PRESENCE OF SOME HEAVY METALS AND ALTERNATIVE
ACCEPTORS OF ELECTRONS**

S u m m a r y

Pseudomonas sp. str. 10 reduces chromate with a rate of 0.54 mg / L · h. The availability of Cd²⁺ and Zn²⁺ in the medium has no noticeable effect on the rate or slightly increases it. The presence of nickel and copper in the ionic form in the medium resulted in a decrease of chromate reduction rate 2.4 and 4.2 times, respectively. Change of these metals into hydroxide form significantly lowers their negative influence. Iron (III) both in ionic and hydroxide form inhibits the reduction of chromate by *Pseudomonas* sp. 10. Joint presence of all studied metals decreases their negative impact on chromate reduction, therefore these metals may be neutralized together without a significant lowering of the process efficacy on condition that copper-containing drain will be cleaned separately. The presence of alternative acceptors of electrons inhibited the reduction of chromate. Sulfate and oxyanions of chlorine – chlorate and perchlorate have the highest inhibitory effect on chromate reduction.

The paper is presented in Russian.

K e y w o r d s: *Pseudomonas* sp. str. 10, chromate reduction, heavy metals, ionic and hydroxide forms of metal, alternative acceptors of electrons, sulfate, chlorate, perchlorate.

T h e a u t h o r ' s a d d r e s s: Smirnova G.F., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Грушко Я.М. Вредные неорганические соединения в промышленных сточных водах. – Л.: Химия, 1979. – 161с.
2. Квасников Е.И. и др. Биологическая очистка хромсодержащих промышленных сточных вод. – Киев: Наук. думка, 1990. – 109с.
3. Максимов В.Н. Многофакторный эксперимент в биологии. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1980. – 280 с.
4. Перепелиця О.П. Екологія та ендоекологія елементів – Київ: Екокім, 2006. – 735 с.
5. Smirnova G.F., Podgorskyi V.S., Murchuk F.V. Восстановление хлоратов *Acinetobacter thermotoleranticus* C-1 в присутствии некоторых тяжелых металлов // Микробиол. журн. – 2012. – 74, №5 – С. 43–47.
6. Cervantes C., Campos-Garsia J., Devars S., Gutierrez-Corona F., Loza-Tavera H., Torres-Guzman J.C., Moreno-Sanchez R. Interactions of chromium with microorganisms and plants// FEMS Microbiol. – 2001 – 25, N 3. – P.335–347.
7. Nies D.H. Microbial heavy-metal resistance // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1999 – 51, N 6. – P. 730–750.
8. Pilkington E.S., Smith P.R. Spectrophotometric determination of chromium in ilmenite // Anal. Chim. Acta. – 1965. – 39.– P. 321–328.
9. Piotrowska-Segeď Z., Cycon M., Kozdroj J. Metal-tolerant bacteria occurring in heavily-polluted and mine spoil // Appl. Soil Ecol. – 2005. – 28, N 3. – P. 237–246.

Отримано 26.11.2012