

УДК 543.3:535.379

ОЧИСТКА ВОДЫ ОТ ВЫСОКОТОКСИЧНЫХ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ РОДА PSEUDOMONAS

*Е. Г. Горшкова, Т. В. Гудзенко, О. В. Волювач,
Т. О. Беляева, И. П. Конуп*

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова

Експериментально підтверджена висока ефективність очистки водних розчинів від високотоксичних іонів важких металів [Pb (II), Zn (II)] іммобілізованими клітинами непатогенних бактерій Pseudomonas fluorescens ONU328, Pseudomonas maltophilia ONU329, Pseudomonas ceracia ONU327. Ступінь очистки води від Cr (VI) після автоклавування сягає 99,93% при використанні як мікробіологічного реагенту бактеріальної суспензії на основі асоціації штамів P. fluorescens ONU328 : P. maltophilia ONU329 : P. ceracia ONU327, приготовленої в об'ємному співвідношенні - 1: 1 : 1

Экспериментально подтверждена высокая эффективность очистки водных растворов от высокотоксичных ионов тяжелых металлов [Pb (II), Zn (II)] иммобилизованными в присутствии клетками непатогенных бактерий Pseudomonas fluorescens ONU328, Pseudomonas maltophilia ONU329, Pseudomonas ceracia ONU327. Степень очистки воды от Cr (VI) после автоклавирования достигает 99,93% при использовании в качестве микробиологического реагента бактериальной суспензии на основе ассоциации штаммов P. fluorescens ONU328 : P. maltophilia ONU329 : P. ceracia ONU327, приготовленной в объемном соотношении – 1:1:1

Experimentally confirmed high efficiency purification of aqueous solutions of highly toxic heavy metal ions [Pb (II), Zn (II)] immobilized cells of non-pathogenic bacteria Pseudomonas fluorescens ONU328, Pseudomonas maltophilia ONU329, Pseudomonas ceracia ONU327. The degree of water purification from Cr (VI) after autoclaving reaches 99.93% when using a microbiological reactant as a bacterial suspension on the basis of the association of strains P. fluorescens ONU328 : P. maltophilia ONU329 : P. ceracia ONU327, prepared in a volume ratio - 1: 1 : 1

Вступление

Ионы тяжелых металлов образуют группу высокотоксичных загрязнителей окружающей среды. В природные водоемы с промышленными сточными водами металлургии поступает большое количество ионов тяжелых металлов (ИТМ), которые представляют реальную опасность для здоровья человека и становятся существенной помехой в жизнедеятельности большинства микробионтов.

Постановка задач исследования

Повышение требований к качеству воды и допустимых концентраций загрязнений в промышленных сточных водах, сбрасываемых в водоемы, заставляет на сегодняшний день совершенствовать существующие или искать новые, экологически чистые и экономически выгодные способы извлечения из них ионов тяжелых металлов. К таким методам, которые успешно применяются для решения этой проблемы и являются достаточно эффективными, можно отнести флотацию, сорбцию ионов тяжелых металлов на различных не модифицированных и химически модифицированных сорбентах и их сорбцию, аккумуляцию микроорганизмами.

Достигнутый уровень техники в данной области характеризуется следующими примерами:

Известен "Флотационный способ извлечения ионов тяжелых металлов в виде осадков" [1, 2], который заключается в том, что в воду, загрязненную катионами или анионами тяжелых металлов вводят флотационный собиратель – соответственно анионное или катионное поверхностно - активное вещество (ПАВ). Пропускают под давлением снизу флотационной системы, оснащенной соответствующим фильтром, пузырьки воздуха. Образовавшуюся пену, содержащую малорастворимый продукт взаимодействия ИТМ с поверхностно-активными ионами, механически собирают и направляют в отстойники для разрушения пены.

Недостатками способа являются: необходимость регулирования значений pH среды и оптимального расхода реагента для эффективного проведения процесса очистки воды от ИТМ; вода очищается до требований, предъявляемых к технической воде второй категории по ГОСТ 9.314-90; использование в качестве органического осадителя ИТМ не менее токсичных для окружающей среды ионогенных ПАВ (в частности, катионных ПАВ в случае осаждения анионных форм тяжелых металлов), поэтому возникает необходимость дополнительного контроля за остаточной их концентрации после очистки. В случае обесточивания процесс очистки воды становится невозможным.

Известен способ [3], согласно которому очистку сточных вод и технологических растворов от ионов свинца осуществляют адсорбционным способом, при этом как адсорбенты используют осадочные породы с содержанием кальцита и доломита от 5 до 30 %.

Недостатком известного способа являются: слишком высокая продолжительность процесса обработки воды, включая дальнейшую стадию регенерации адсорбента. Кроме того, в известном способе остаточная концентрация ионов свинца в воде после очистки выше предельно-допустимой концентрации.

Для очистки промышленных металлосодержащих сточных вод часто применяют природные материалы, которые хорошо зарекомендовали себя как ионообменные материалы и сорбенты [4]. Особое внимание привлекают также химически модифицированные сорбенты с улучшенными адсорбционными свойствами в отношении анионных форм тяжелых металлов [5].

Существенным недостатком этого способа является то, что он не обеспечивает глубокую очистку воды от таких катионов тяжелых металлов, как цинк, кадмий и др. Недостатком сорбции анионов тяжелых металлов, в частности хромат-ионов на природных немодифицированных и химически модифицированных (например, композит силикагель-полианилин) сорбентах также является неглубокая очистка воды от этих высокотоксичных ионов. Степень очистки воды от Cr (VI) увеличивается с 25–40% (на разных природных немодифицированных сорбентах) до 95% в случае химической модификации поверхности сорбента. Состояние равновесия при адсорбции хромат-ионов ($pH_{\text{опт}} 2$) длится очень долго (~24 часа) и осуществляется по ионообменному механизму.

Известен способ анаэробной очистки воды от Cr (VI) при периодическом культивировании микроорганизмов и создании окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) среды на уровне (-140) мВ [6]. Суть способа заключается в том, что в биореактор вносят питательный раствор, биомассу микроорганизмов и Cr (VI) в концентрации 20 мг/дм³. С помощью инертного газа удаляют кислород из раствора и создают ОВП (-140) мВ. Полная редукция шестивалентного хрома происходит в течение 10 часов.

Недостаткам такого способа являются: низкая начальная концентрация Cr (VI) в растворе; необходимость использования инертного газа для создания низкого окислительно-восстановительного потенциала; длительность процесса очистки.

Известен способ биологической очистки воды от Cr (VI) в аэробных условиях [7]. Способ базируется на том, что очистку воды от шестивалентного хрома осуществляют иммобилизованными в

биокаталитические мембраны микроорганизмами. Процесс протекает при окислительно-восстановительном потенциале 250–270 мВ. Реализация известного способа обеспечивает полную очистку воды от Cr (VI) только при концентрации ниже 20 мг/дм³. Восстановление Cr (VI) с концентрацией 40 мг/дм³ происходит в течение 80 час. Остаточная концентрация Cr (VI) с обеих сторон биокаталитической мембраны составляет 1 мг/дм³. Степень очистки составляет 97,5%.

Основными недостатками известного способа являются длительность процесса очистки (80 суток) и недостижение концентрации Cr (VI) до норм предельно-допустимой концентрации (ПДК = 0,05 мг/дм³) для сброса обработанной воды в канализационную систему.

Цель исследования – разработка способа глубокой очистки водных растворов от некоторых высокотоксичных ионов тяжелых металлов [свинец, цинк, хром (VI)] с использованием непатогенных микробиологических реагентов полифункционального действия и экологически безопасных химических реагентов до концентраций, соответствующих их предельно-допустимой концентрации для сброса в канализацию. Для достижения поставленной цели не обходимо было решить следующие задачи: - выделить из разных загрязненных сред микроорганизмы, отобрать среди них непатогенные с высокой метал-резистентной способностью; - исследовать способность отобранных биохимически-активных штаммов микроорганизмов сорбировать ионы тяжелых металлов [свинец, цинк, хром (VI)] из концентрированных растворов; - оценить адсорбционно-аккумулирующую способность свободных и иммобилизованных клеток микроорганизмов; - предложить наиболее эффективный микробиологический реагент с полифункциональным действием для глубокой очистки воды от ионов тяжелых металлов.

Методика проведения экспериментов

В качестве микробиологических реагентов использовали бактериальные суспензии на основе отдельных штаммов бактерий рода *Pseudomonas*: *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329 (выделенные из морской воды), *P. ceracia* ONU327 (выделенный из почвы), и их ассоциацию, приготовленную в объемном соотношении *P. fluorescens* ONU328 : *P. maltophilia* ONU329 : *P. ceracia* ONU327 – 1:1:1. Все использованные штаммы бактерий рода *Pseudomonas* являются непатогенными и на сегодняшний день находятся на хранении в музейной коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии, вирусологии и биотехнологии ОНУ имени И.И. Мечникова.

Исследования по извлечению некоторых ионов тяжелых металлов [свинец, цинк, хром (VI)] из индивидуальных водных растворов с использованием непатогенных бактерий рода *Pseudomonas* проводили в Биотехнологическом научно-учебном центре Одесского национального университета имени И.И. Мечникова (ОНУ).

Культуры бактерий предварительно наращивали на питательной среде следующего состава (г/дм³): КН₂РO₄ – 1,5; Na₂НРO₄ – 3; NaCl – 5; NH₄Cl – 1; пептон – 10; глюкоза – 2; дрожжевой экстракт – 5. Наращивание биомассы осуществляли при рН 7,0–7,2 и температуре 28 °С в течение 48 ч до достижения плотности культур не менее 5 г/дм³ по сухой биомассе. Приготовленную бактериальную суспензию смешивали с загрязненной ИТМ модельной водой (1:1 по объему) и вводили свежеприготовленные растворы Н₂О₂ и СаСl₂.

Остаточное содержание ИТМ в водных растворах после очистки определяли атомно-абсорбционным методом на пламенном атомно-абсорбционном спектрофотометре "Сатурн" в пламени смеси "воздух – пропан – бутан" [8].

Эффективность очистки воды от ИТМ оценивали по степени очистки (α , %), рассчитанной по уравнению:

$$\alpha = [(C_0 - C) / C_0] \cdot 100\%,$$

где C_0 и C – исходная и остаточная концентрации ИТМ в воде.

Достоверность различий между средними значениями определяли по критерию Стьюдента на уровне значимости не менее 95% ($p \leq 0,05$). Обработку данных осуществляли с использованием программы «Microsoft Office Excel 2003».

Результаты исследований

Результаты по очистке модельных водных растворов от свинца, цинка и шестивалентного хрома свободными и иммобилизованными клетками непатогенных бактерий рода *Pseudomonas*: *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. ceracia* ONU327 и их ассоциацией представлены в таблице 1. Из полученных экспериментальных данных видно, что все использованные штаммы бактерий рода *Pseudomonas* обнаруживают резистентность по отношению к ионам тяжелых металлов, особенно находящихся в катионной форме. Высокая степень очистки воды 99,58% и 84,00% достигалась при детоксикации ионов Pb (II) и Zn (II) свободными клетками бактерий *P. ceracia* ONU327. Следует отметить, что при микробиологической обработке воды (в отсутствии перекиси водорода и

хлорида кальція) бактеріальними суспензіями, приготовленими из отдельных штаммов *P. maltophilia* ONU329, *P. ceracia* ONU327, а также из ассоциации штаммов *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. ceracia* ONU327 (в объемном соотношении 1:1:1), остаточная концентрация Pb (II) в воде с 60 мг/дм³ уменьшалась до 0,25±0,03 и 2,8±0,15 мг/дм³. Более токсичный для микроорганизмов шестивалентный хром в значительно меньшей степени сорбировался свободными клетками бактерий рода *Pseudomonas*. При использовании штамма *P. fluorescens* ONU328 концентрация Cr (VI) в модельном растворе уменьшалась с 70 мг/дм³ до 40,3±5,88 мг/дм³, что соответствовало степени очистки воды от Cr (VI) 42,43%. При микробиологической очистке воды от ИТМ в отсутствии химических реагентов агрегация бактерий протекала медленно (от 60 до 90 мин) и происходила под действием полисахаридных комплексов их клеточных стенок.

Под действием химических реагентов существенно ускорялся (до 15–20 мин) процесс образования в воде бактериальных агрегатов. При этом резко увеличивалась общая адсорбционная емкость системы и, соответственно, эффективность очистки воды от ИТМ, особенно от Zn (II). Степень очистки воды от Zn (II) варьировала от 95,00 до 99,85% при использовании иммобилизованных в присутствии H₂O₂ и CaCl₂ клеток *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. ceracia* ONU327 и их ассоциации. Наиболее эффективным биосорбентом и биоаккумулятором ионов цинка является штамм *P. maltophilia* ONU329. При выделении ионов цинка из водного раствора в составе биофлокул, сформированных из клеток *P. maltophilia* ONU329 (в присутствии химреагентов), остаточная его концентрация в растворе была ниже (0,03±0,005 мг/дм³) предельно-допустимой концентрации для сброса обработанной воды в канализацию.

Предложенным выше способом степень очистки воды от Cr (VI) увеличивалась на 35% в случае введения в качестве микробиологического реагента бактериальной суспензии на основе отдельного штамма *P. maltophilia* ONU329. Эффективность очистки, особенно от Cr (VI), существенно повышалась при обработке воды иммобилизованными клетками бактерий рода *Pseudomonas* после автоклавирования (20 мин).

Как видно из данных табл. 1, разработанный способ очистки воды от ИТМ с использованием иммобилизованных клеток бактерий *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. ceracia* ONU327 с последующим автоклавированием (в случае шестивалентного хрома) является достаточно эффективным: степень извлечения ИТМ [Pb (II), Zn (II), Cr (VI)] из водных растворов достигает 99,50–99,95%. Использование в разработанном способе ассоциации штаммов бактерий рода *Pseudomonas* (1:1:1 в объемном соотношении) обеспечивало эффективную очистку воды и от

наиболее ядовитого для микроорганизмов тяжелого металла, находящегося в анионной форме – Cr (VI): степень извлечения хрома достигала 99,93% при его остаточной концентрации в растворе $0,05 \pm 0,002$ мг/дм³. После очистки остаточная концентрация Pb (II) и Zn (II) в воде составляла соответственно 0,03 и 0,03–0,1 мг/дм³ (в залежності від використаного мікробіологічного реагенту).

Таблица 1 Результаты по очистке модельных водных растворов от Pb (II), Zn (II), Cr (VI) в присутствии бактерий рода *Pseudomonas*

Штамм	Остаточная концентрация ИТМ, мг/дм ³			Степень очистки (α) воды от ИТМ, %		
	Pb	Zn	Cr	Pb	Zn	Cr
<i>свободными клетками бактерий рода Pseudomonas</i>						
<i>P. fluorescens</i> ONU328	4,1± 0,65	9,3± 0,8	40,3± 5,88	93,17	53,50	42,43
<i>P. maltophilia</i> ONU329	2,8± 0,15	12,2± 1,2	65,0± 8,50	95,33	39,00	7,14
<i>P. ceracia</i> ONU327	0,25± 0,03	3,2± 0,50	65,0± 8,50	99,58	84,00	7,14
Ассоциация (1:1:1)	1,3± 0,07	11,0± 1,20	63,3± 7,40	97,83	45,00	9,57
<i>иммобилизованными клетками бактерий рода Pseudomonas</i>						
<i>P. fluorescens</i> ONU328	0,05± 0,002	0,08± 0,004	40,3± 5,77	99,92	99,60	42,43
<i>P. maltophilia</i> ONU329	0,05± 0,002	0,03± 0,005	40,3± 6,75	99,92	99,85	42,43
<i>P. ceracia</i> ONU327	0,03± 0,003	1,0± 0,12	60,0± 8,50	99,95	95,00	14,29
Ассоциация (1:1:1)	0,2± 0,03	0,5± 0,07	56,7± 8,10	99,67	97,50	19,00
<i>иммобилизованными клетками бактерий рода Pseudomonas</i> <i>после автоклавирования (20 мин)</i>						
<i>P. fluorescens</i> ONU328	0,03± 0,002	0,03± 0,004	27,0± 1,20	99,95	99,85	61,43
<i>P. maltophilia</i> ONU329	0,03± 0,002	0,03± 0,005	12,6± 0,70	99,95	99,85	82,00
<i>P. ceracia</i> ONU327	0,03± 0,003	0,1± 0,005	4,9± 0,70	99,95	99,50	93,00
Ассоциация (1:1:1)	0,03± 0,001	0,1± 0,002	0,05± 0,002	99,95	99,50	99,93

Примечание: исходные концентрации ИТМ в индивидуальных модельных водных растворах (мг/дм³): Pb (II) – 60; Zn (II) – 20; Cr (VI) – 70; pH среды 6,8–7,2.

Выводы

Таким образом, предложенный новый способ позволяет при введении специально подобранных микробиологических реагентов в присутствии 3% раствора перекиси водорода и 10% раствора хлорида кальция и последующей стерилизации очищать воду, загрязненную ИТМ до значений концентраций значительно меньших ПДК, предназначенных для сброса обработанной воды в канализацию. Очищенную воду можно повторно использовать в замкнутом технологическом процессе.

В разработанном способе очистки металлосодержащих растворов и сточных вод рекомендуем в качестве более эффективного микробиологического реагента, который одновременно выполняет функции сорбента и аккумулятора ионов тяжелых металлов, находящихся в разных формах, использовать ассоциацию штаммов непатогенных бактерий *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329 и *P. cerasica* ONU327 (взятых в объемном соотношении 1:1:1). Это делает процесс очистки воды от тяжелых металлов экологически безопасным для работающих на соответствующем производстве.

Кроме того, использованные в качестве микробиологических реагентов микроорганизмы, как нами дополнительно было доказано [9, 10] обладают полифункциональным действием в отношении различных поллютантов, включая поллютанты органической природы (нефтепродукты, ПАВ). Обнаруженное открывает перспективы их широкого использования в биотехнологии очистки окружающей среды от различных органических и неорганических загрязнений.

Литература

1. Гольман А. М. Ионная флотация [Текст] / А. М. Гольман. – М: Недра, 1982. – 143 с.
2. Скрылев, Л. Д., Сазонова, В. Ф. Коллоидно-химические основы защиты окружающей среды от ионов тяжелых металлов. Ионная флотация [Текст] / Л. Д. Скрылев, В. Ф. Сазонова. – К.: УМКВО, 1992. – 215 с.
3. Патент України № 4234, МПК C02F 1/42, C02F 1/62. Спосіб сорбційної очистки стічних вод і технологічних розчинів від іонів свинцю / Г. А. Кроїк, В. А. Білецька, Н. В. Білоус, Т. І. Шомко, Н. Є. Яцечко; Заявник і патентовласник Дніпропетровський нац. ун-т. - опубл. 17.01.2005, Бюл. № 15.
4. Тарасевич, Ю. И. Адсорбция на глинистых минералах [Текст] / Ю. И. Тарасевич, Ф. Д. Овчаренко. – К.: Наук. думка, 1975. – 351 с.
5. Рябченко, К. В. Адсорбційні властивості силікагелю in situ іммобілізованим поліаніліном щодо аніонних форм Cr (VI), Mo (VI) та V (V) [Текст] / К. В. Рябченко, Е. С. Яновська, В. А. Тьортих, О. Ю. Кичкирук // Вопросы химии и химической технологии. – 2011, № 6. – С. 167 – 172.

6. Гвоздяк, П. И. Восстановление шестивалентного хрома коллек- ционными штаммами бактерий [Текст] / П. И. Гвоздяк, Н. Ф. Могилович, А. Ф. Рильський, Н. И. Грищенко [Текст] // Микробиология – 1986. – 55, № 6. – С. 962 – 965.

7. Дмитренко, Г. Н. Использование мембранного биореактора для восстановления шестивалентного хрома [Текст] / Г. Н. Дмитренко, В. В. Коновалова, П. И. Гвоздяк // Химия и технология воды. – 2001. – 23, № 5. – С. 552 – 562.

8. Сафронова, Н. С. Комплекс аналитических методов для определения содержания и форм существования тяжелых металлов в природных водных объектах [Текст] / Н. С. Сафронова, Е. В. Веницианов, Е. Ю. Ершова // Водные ресурсы. – 1997. – 24, № 4. – С. 477 – 485.

9. Гудзенко, Т. В. Нафтоокиснювальна активність деяких штамів бактерій роду *Pseudomonas* [Текст] / Т. В. Гудзенко, О. В. Волювач, Т. О. Беляєва, І. В. Пузирьова, Г. В. Лісютин, О. Г. Горшкова, В. О. Іваниця // Мікробіологія і біотехнологія. – 2013, № 4. – С. 72 – 80.

10. Гудзенко, Т. В. Видалення броміду гексадецилпіридинію із водних розчинів з бактеріями роду *Pseudomonas* за їх взаємодії з глинистим мінералом та хітозаном [Текст] / Т. В. Гудзенко, О. В. Волювач, Т. О. Беляєва, О. Г. Горшкова, І. В. Пузирьова, В. О. Іваниця // Мікробіологія і біотехнологія. – 2014, № 1 (25). – С. 72 – 78.