

ПОШИРЕННЯ ХРОМРЕЗИСТЕНТНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ У СТИЧНИХ ВОДАХ

К.В. Шоляк, Т.Б. Перетятко, С.П. Гудзь

Львівський національний університет імені Івана Франка

Проведено мікробіологічні дослідження стічних вод м. Львова. Показано кількісний вміст хромрезистентних мікроорганізмів серед різних фізіологічних груп. Визначено концентрацію шестивалентного хрому в стічних водах у процесі їх очищення. Встановлено закономірності поширення хромрезистентних мікроорганізмів різних фізіологічних груп на різних етапах очистки стічних вод. Визначено найстійкіші до шестивалентного хрому (Cr (VI)) мікроорганізми. За стійкістю до Cr (VI) мікроорганізми можна розташувати в такій послідовності: сульфатвідновлювальні бактерії, целюлозоруйнівні мікроорганізми, дріжджі, нітрифікатори, азотфіксатори, актиноміцети. Виділено чисті культури сульфатвідновлювальних бактерій, здатних до детоксикації водного середовища від Cr (VI).

Ключові слова: *стічні води, Cr (VI), хромрезистентні мікроорганізми.*

Забруднення навколишнього природного середовища іонами важких металів спричиняє серйозну екологічну небезпеку. Здебільшого метали не піддаються біодеградації і, поступово накопичуються у різних компонентах екосистем, беруть участь у біологічному кругообігу хімічних елементів, зумовлюючи отруєння макро- та мікроорганізмів. Одним із найбільш токсичних важких металів є хром [1].

У природі хром існує у вигляді двох основних форм: малотоксичній тривалентній (Cr (III)) і високотоксичній шестивалентній (Cr (VI)). У невеликих кількостях Cr (VI) бере участь в обміні речовин, зокрема у перетворенні глюкози і ліпідів, стабілізації третинної структури білків та конформації ДНК і РНК. За підвищених концентрацій він порушує роботу дихальної системи, виявляє мутагенну і канцерогенну дію на організм людини і тварин, пришвидшує апоптоз [2].

Завдяки своїм властивостям Cr (VI) широко використовується у різних галузях промисловості [1]. Неконтрольовані його викиди спричиняють забруднення ґрунтів і вод. Значні кількості Cr (VI) потрапляють у навколишнє природне середовище із стічними водами гальванічних, фарбу-

вальних цехів, текстильних підприємств, шкіряних заводів і підприємств хімічної промисловості [3].

Найбільш перспективним способом очищення довкілля від отруйного Cr (VI) вважається біологічний з використанням мікроорганізмів. Однак для більшості з них Cr (VI) виявляє токсичну дію, внаслідок чого виникає необхідність пошуку резистентних до підвищених концентрацій Cr (VI) форм. Найчастіше стійкі до підвищених концентрацій Cr (VI) бактерії трапляються серед сульфатвідновлювальних бактерій. Ці організми можуть знешкоджувати Cr (VI) двома шляхами: по-перше, сірководень, що утворюється в процесі дисиміляційної сульфатредукції, взаємодіючи з важкими металами, осаджує їх у нерозчинні сульфіди, по-друге, ці бактерії можуть використовувати Cr (VI) як акцептор електронів і відновлювати його до малотоксичного Cr (III) [4].

Метою роботи було дослідити розповсюдження хромрезистентних мікроорганізмів серед представників різних фізіологічних груп мікроорганізмів у стічних водах м. Львова і виділити культури бактерій, стійкі до підвищених концентрацій Cr (VI).

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктом дослідження були мікроорганізми, виділені зі стічних вод м. Львова на різних етапах її очистки. Фізіологічні групи мікроорганізмів виділяли шляхом висіву проб на селективні середовища. Для виділення сапрофітних бактерій використовували середовище м'ясо-пептонного агару (МПА), мікроскопічних грибів і дріжджів – сусло-агар, целюлозоруйнівальних мікроорганізмів – середовище Гетченсона, сульфатвідновлювальних бактерій – середовище Постгейта В, олігонітрофілів – середовище Ешбі, нітрифікаторів – середовище Виноградського, актиноміцетів – середовище Чапека, грибів, що засвоюють легкодоступні вуглеводи, – середовище Ваксмана, для мікроорганізмів, що використовують мінеральні форми азоту, – крохмально-аміачне середовище [5, 6]. До цих середовищ вносили 1 мМ Cr (VI) у формі $K_2Cr_2O_7$. Резистентними вважали мікроорганізми, що росли при концентрації Cr (VI) 1 мМ.

Мікроорганізми вирощували на чашках Петрі, що містили 20–30 мл агаризованого селективного середовища у термостаті при температурі 30°C за aerobicних умов [7]. Сульфатвідновлювальні бактерії вирощували при температурі 30°C за anaerobicних умов у пробірках об'ємом 25 мл [8].

Кількість колоній визначали методом Коха [7]. Для культивування сульфатвідновлювальних бактерій використовували середовище Постгейта С [8].

Вміст Cr (VI) у культуральній рідині визначали спектрофотометрично після осадження клітин центрифугуванням при 8000 об./хв упродовж 10 хв. Метод ґрунтується на взаємодії Cr (VI) з дифенілкарбазидом у кислому середовищі з утворенням комплексної сполуки рожевого кольору, з максимумом поглинання при 540 нм. Реакційна суміш мала такий склад: 1 мл культуральної рідини, 0,1 мл 1 н розчину сульфатної кислоти, 0,1 мл 1% розчину дифенілкарбазиду в 96% етиловому спирті [9].

Cr (III) визначали фотометрично ($\lambda = 540$ нм, кювета 10 мм) з використанням хромазурулу S. У розрахунку на 5 мл реак-

ційної суміші в пробірку вносили 1 мл 0,2% додецилсульфату натрію (SDS); 0,5 мл 1М ацетатного буферу (pH 3,5); 0,5 мл 0,006% хромазурулу S, 0,5 мл проби до об'єму 4 мл доводили дистильованою водою. Пробірки поміщали на 30 хв у киплячу водяну баню. Після охолодження додавали 1 мл 1М H_2SO_4 і, у разі потреби, воду до загального об'єму 5 мл. Концентрацію хрому визначали за калібрувальною кривою [10].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Промислові і побутові стічні води Львова, що впадають у р. Полтву, підлягають очищенню на очисних спорудах. Однак ефективність біоремедіаційних процесів очисних споруд знижується через наявність у водах токсичних для мікроорганізмів іонів важких металів, зокрема Cr (VI), що спричиняє інгібування росту мікроорганізмів активного мулу і відповідно зниження ефективності очистки. Дослідження засвідчили, що концентрація іонів Cr (VI) у стічних водах р. Полтви у 10 разів перевищує ГДК, що згідно з нормами Євросоюзу становить 0,5 мг/л (таблиця).

Кількісний склад мікроорганізмів у стічних водах на різних етапах її очистки істотно відрізняється (рис. 1).

У первинному відстійнику за чисельністю переважали нітрифікувальні, азотфіксувальні бактерії, а також гриби. У вторинному відстійнику, крім вищезгаданих груп мікроорганізмів, виявлено відносно велику кількість целюлозоруйнівних бактерій. В аеротенку великий відсоток складають нітрифікувальні та азотфіксувальні бактерії. В активному мулі виявлено підви-

Концентрація іонів Cr (VI) на різних етапах очистки стічних вод

Зона відбору проби	Концентрація Cr (VI), мг/л
Первинний відстійник	5,72±0,22
Аеротенк	5,09±0,19
Активний мул	4,99±0,17
Вторинний відстійник	4,78±0,21

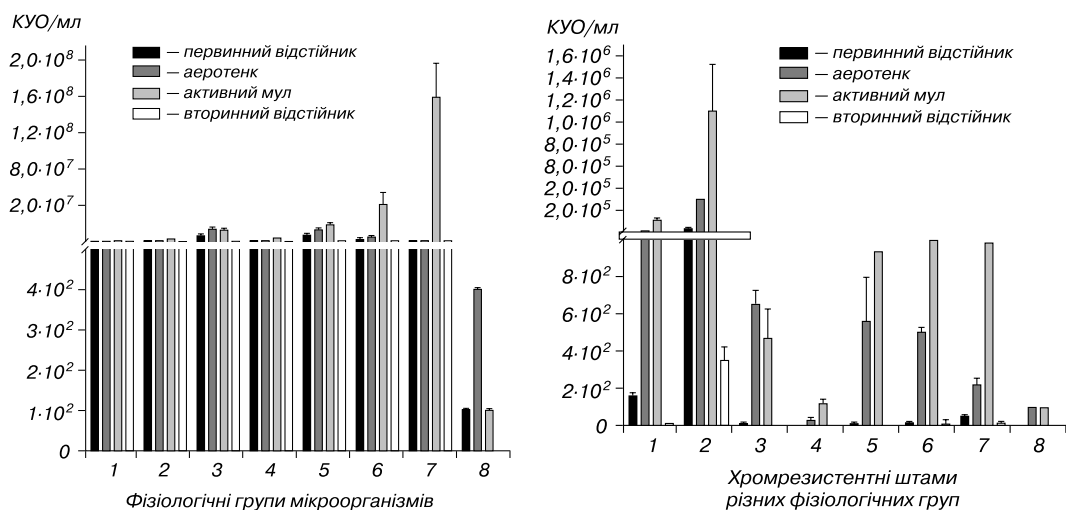


Рис. 1. Зміна чисельності мікроорганізмів різних фізіологічних груп: 1 – дріжджі; 2 – целюлозоруйнівні мікроорганізми; 3 – нітрифікувальні бактерії; 4 – актиноміцети; 5 – азотфіксувальні мікроорганізми; 6 – гриби, що засвоюють легкодоступні вуглеводи; 7 – мікроорганізми, що використовують мінеральні форми азоту; 8 – сульфатвідновлювальні бактерії на різних етапах очищення

шені кількості мікроорганізмів, що використовують мінеральні форми азоту.

Кількість хромрезистентних мікроорганізмів залежно від рівня очищення води збільшується відносно загальної кількості мікроорганізмів.

За стійкістю до Cr (VI) сапрофітні мікроорганізми розташовувались в такій послідовності: сульфатвідновлювальні бактерії, целюлозоруйнівні мікроорганізми, дріжджі, нітрифікатори, азотфіксатори, актиноміцети.

Найвищий відсоток стійких до Cr (VI) мікроорганізмів виявлено серед сульфатвідновлювальних бактерій (рис. 2).

Зростання відсотка хромрезистентних мікроорганізмів спостерігається на фоні зниження загальної кількості сульфатвідновлювальних бактерій у зонах відбору проб. Оскільки ця група мікроорганізмів характеризується підвищеною стійкістю до шестивалентного хрому,

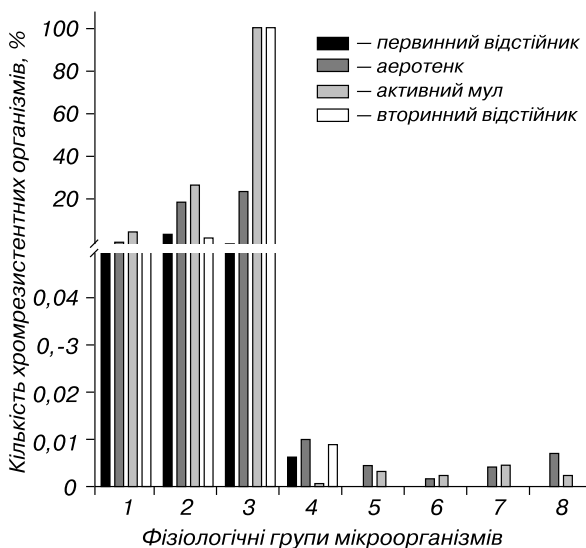


Рис. 2. Відсотковий вміст хромрезистентних мікроорганізмів серед різних фізіологічних груп: 1 – дріжджі; 2 – целюлозоруйнівні мікроорганізми; 3 – сульфатвідновлювальні бактерії; 4 – мікроорганізми, що використовують мінеральні форми азоту; 5 – нітрифікувальні бактерії; 6 – актиноміцети; 7 – азотфіксувальні мікроорганізми; 8 – гриби, що засвоюють легкодоступні вуглеводи

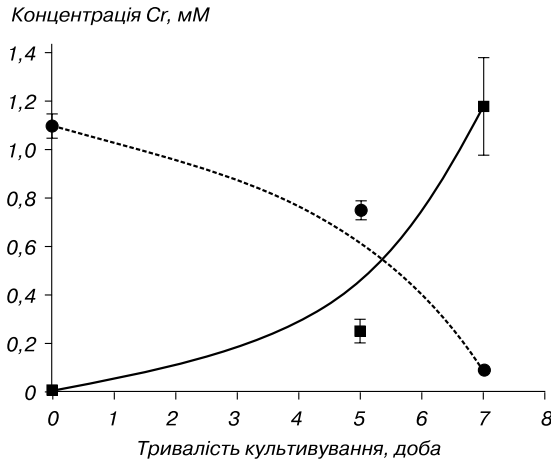


Рис. 3. Динаміка перетворення Cr (VI) (---) у Cr (III) (—) культурою виділених хромрезистентних сульфатвідновлювальних бактерій

виділено чисті культури сульфатвідновлювальних бактерій, які відновлюють Cr (VI) до Cr (III). Упродовж семи діб культивування у середовищі Постгейта С виділені сульфатвідновлювальні бактерії повністю відновлювали токсичний Cr (VI) до малотоксичного Cr (III) – (рис. 3).

Це свідчить про важливу роль хромрезистентних штамів сульфатвідновлювальних бактерій у перетворенні сполук хрому та можливість їх використання для біоремедіації навколишнього природного середовища.

ВИСНОВКИ

Досліджено кількісний і якісний склад мікроорганізмів різних фізіологічних груп у стічних водах м. Львова. Показано, що на різних етапах очищення ці показники істотно змінюються. Досліджено наявність у стічних водах стійких до хрому мікроорганізмів серед різних фізіологічних груп. Найбільшу кількість резистентних до Cr (VI)

штамів виявлено серед сульфатвідновлювальних бактерій. Серед нітрифікувальних, азотфіксувальних бактерій та актиноміцетів хромрезистентні форми трапляються рідко.

Встановлено, що виділені хромрезистентні культури сульфатвідновлювальних бактерій детоксикують Cr (VI) і відновлюють його до Cr (III).

ЛІТЕРАТУРА

1. Лаврухина А.К. Аналитическая химия хрома / А.К. Лаврухина, Л.В. Юкина. – М.: Изд-во Наука, 1979. – 221 с.
2. Anderson R.A. Chromium, Glucose Intolerance, and Diabetes / R.A. Anderson // Journal of the American College of Nutrition. – 1998. – Vol. 17. – No. 6. – P. 548–555.
3. Barnhart J. Occurrences, uses and properties of chromium / J. Barnhart // Regulatory Toxicology and Pharmacology. – 1997. – Vol. 7. – No. 26. – P. 3–7.
4. Перетятко Т.Б. Відновлення сполук шестивалентного хрому сульфатвідновлювальними бактеріями / Т.Б. Перетятко, С.П. Гудзь // Біологічні Студії / Studia Biologica. – 2010. – Т. 4. – № 2. – С. 39–48.
5. Герхардт Ф. Методы общей бактериологии / Ф. Герхардт; пер. с англ. – М.: Мир, 1983. – Т. 1. – 536 с.
6. Антипчук А.Ф. Водна мікробіологія: навчальний посібник / А.Ф. Антипчук, І.Ю. Кіреєва. – К.: Кондор, 2005. – 256 с.
7. Егоров Н.С. Руководство по практическим занятиям по микробиологии: Учеб. пособие / Н.С. Егоров. – М.: Изд-во МГУ, 1995. – 224 с.
8. Розанова Е.П. Методы культивирования и идентификации анаэробных бактерий, восстанавливающих серу и ее окисленные соединения / Е.П. Розанова // Теоретические и методические основы изучения анаэробных микроорганизмов. – Пушкино, 1978. – С. 123–136.
9. Cr (VI) sorption by intact and dehydrated *Candida utilis* / O. Muter, I. Lubinya, D. Millers et al. // Process Biochemistry. – 2002. – Vol. 38. – No. 1. – P. 123–131.
10. Assay of chromium (III) in microbial cultures using chromazuril S and surfactants for monitoring chromate remediation processes / Т.М. Honchar, Н.Р. Ksheminska, І.О. Patsay et al. // Біотехнологія. – 2008. – Т. 1. – № 4. – С. 85–94.