

УДК 579.253.4 : 628.16

О. В. Кравченко

Державне підприємство «Науково–дослідний та конструкторсько–технологічний інститут міського господарства»

## ОТРИМАННЯ ВИСОКОПРОДУКТИВНИХ ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ ДЛЯ ВИДАЛЕННЯ ІЗ ВОДИ СПОЛУК ЗАЛІЗА ТА МАРГАНЦЮ

Підібрано умови для отримання високоефективних мутантних штамів залізо– та марганцевоокислюючих бактерій: обробка УФ–опроміненням з довжиною хвилі 260 нм протягом 20 хвилин та обробка нітритною кислотою з концентрацією 0,03 М, 0,04 М протягом 20 хвилин. Виявлено, що максимальну ефективність вилучення заліза та марганцю проявляє змішана культура штамів - у р.*Leptotrix* та β р.*Sphaerotillus* (до 98,6 % для обох елементів).

**Ключові слова:** мутанти залізо– та марганцевоокислюючих бактерій, видалення із води заліза та марганцю.

### Постановка проблеми

Залізо та марганець є постійними компонентами природних вод. Вміст цих елементів коливається у широкому діапазоні, причому в окремих регіонах України може сягати для заліза 20-30 мг/дм<sup>3</sup>, а для марганцю – 5-6 мг/дм<sup>3</sup>. Варто зазначити, що видалення цих елементів з води при їх високих концентраціях представляє достатньо складну задачу, внаслідок чого і у теперішній час, незважаючи на наявність цілого ряду фізичних, хімічних та біотехнологічних методів, уніфікована технологія знезалізнення та деманганізації води відсутня.

Зважаючи на вищесказане, а також на те, що підвищені концентрації заліза і марганцю спричиняють погіршення органолептичних властивостей води, призводять до утворення осадів, заростання водопровідних мереж і водозабірної арматури, існує потреба в удосконаленні існуючих технологій вилучення цих елементів із води.

### Аналіз останніх досліджень і публікацій

В останні роки більшість дослідників звертають увагу на роль мікроорганізмів при фізико–хімічному видаленні заліза та марганцю із води.

У роботах [1–4, 6, 7, 10] відмічено роль мікроорганізмів при видаленні заліза та марганцю. Зокрема автори звертають увагу на внесок біологічного фактору видалення заліза при фізико–хімічному очищенні на фільтрах знезалізнення та деманганізації. У роботі [1] показано, що бактерії р. *Galionella* на біофільтрах ефективно видаляють залізо при нейтральному рН та зазначено, що фактор біологічного окислення заліза був суттєвішим, ніж фізико–хімічного в умовах повної аерації.

Авторами роботи [2] встановлено необхідність аерації під час видалення заліза та марганцю із води на піщаних біофільтрах для сприяння розвитку бактерій.

У роботі [3] як завантаження біофільтрів використовувались марганцевий та кварцовий пісок, заселений залізо– та марганцевоокислюючими бактеріями. Бактерії р. *Galionella* були знайдені у промивній воді після 6 місяців експлуатації фільтрів. Висока ефективність біологічної деманганізації (максимальна ступінь очищення 98,6 %) при застосуванні фільтрів із завантаженням кварцовим піском показана і авторами у [5].

Зокрема при дослідженні ефективності видалення заліза та марганцю культурами залізо– та марганцевоокислюючих мікроорганізмів було виявлено, що представники родів *Leptotrix*, *Sphaerotillus*, *Metallogenium* на цеолітовому завантаженні фільтрів здатні видаляти залізо з ефективністю від 90 до 97 %, а марганець – від 74 % до 91 % [8, 9].

Стрімкий розвиток біотехнологічних методів робить можливим підвищення біодеградуючих властивостей виділених культур за здатністю видаляти залізо та марганець. Тому, метою цієї статті було дослідження можливості отримання високопродуктивних штамів залізо– та марганцевоокислюючих бактерій шляхом мутагенезу та перевірка ефективності видалення ними заліза та марганцю із води.

### Виклад основного матеріалу

**Матеріали і методи.** Об'єктом досліджень були мікроорганізми р. *Leptotrix*, р. *Sphaerotillus*, що визначені як найбільш ефективні у відношенні до вилучення заліза та марганцю з води на цеолітовому завантаженні швидких фільтрів [9].

Мікроорганізми розмножували шляхом висіву на тверде поживне середовище наступного складу:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – по 0,5 г кожного з реагентів, лимонна кислота – 10 г, сахароза – 2 г, гідролізат казеїну панкреатичний – 1 г,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 5,9 г, дистильована вода – 1 л, рН=6,8, агар-агар – 20 г. Температура культивування – 24–25°C, час культивування – 4–5 діб [7].

Обробку мікроорганізмів проводили УФ–опроміненням з довжиною хвилі 260 нм та часом обробки 20, 20, 25, 30 хв, відповідно. Як хімічний агент для отримання мутантних штамів використовували розчини нітритної кислоти з концентрацією 0,02 М, 0,03 М, 0,04 М, 0,05 М при тривалості обробки 20 хв.

Селекцію мутантних штамів проводили методом відбитків шляхом розсіву на повноцінне поживне середовище, склад якого наведено вище, та на селективне поживне середовище без заліза та марганцю. Отримані мутантні штами для зберігання пересівали на середовище складу:  $\text{MnSO}_4$  – 7 мг,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 1,5 г,  $\text{KCl}$  – 0,05 г,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,05 г,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  – 0,01 г, глюкоза – 2 мг, дистильована вода – 1 л.

Після заселення цеолітового завантаження пілотних фільтрів знезалізнення та деманганцації води отриманими мутантними штамми мікроорганізмів через них пропускали модельні розчини, приготовані на водопровідній воді, з додаванням заліза і марганцю до отримання наступних концентрацій: розчин № 1: 5 мг/дм<sup>3</sup> Fe(II) + 0,5 мг/дм<sup>3</sup> Mn(II); розчин № 2: 10 мг/дм<sup>3</sup> Fe(II) + 2 мг/дм<sup>3</sup> Mn(II).

Концентрації заліза та марганцю у вихідній воді та після фільтрування визначали за загальноприйнятими методиками.

Контролем для оцінки якості заселення досліджуваного завантаження мікроорганізмами служили цеолітові фільтри, заселені вихідними природними штамми р. *Leptotrix* та р. *Sphaerotillus*, під час попереднього фільтрування впродовж 20 діб. Через ці фільтри пропускали модельні розчини заліза та марганцю.

**Результати та їх обговорення.** Результати обробки мікроорганізмів р. *Leptotrix* УФ–опроміненням та нітритною кислотою наведені у табл. 1.

Таблиця 1. Обробка УФ–опроміненням та нітритною кислотою мікроорганізмів р. *Leptotrix*

Мутагенний агент	Довжина хвилі/ концентрація	Одиниці виміру	Тривалість обробки, хв	Кількість колоній мікроорганізмів	Летальність, %
УФ–опромінення	260	нм	20	186	95,6
УФ–опромінення	260	нм	20	35	99,2
УФ–опромінення	260	нм	25	0	100,0
УФ–опромінення	260	нм	30	0	100,0
$\text{HNO}_2$	0,02	М	20	2080	50,5
$\text{HNO}_2$	0,03	М	20	480	88,6
$\text{HNO}_2$	0,04	М	20	236	94,4
$\text{HNO}_2$	0,05	М	20	0	100,0
Контроль	–	–	–	4200	–

Із оброблених обома мутагенами штамів було відібрано колонії з тих чашок, де летальність становила 99 % для УФ–опромінення та від 88 % - для нітритної кислоти.

Відібрані колонії штамів відрізнялись від контрольного: за забарвленням усі мутантні штами були темнішими за вихідні, а за розміром колоній - на 1–2 мм більшими.

Таблиця 2. Обробка УФ–опроміненням та нітритною кислотою мікроорганізмів р. *Sphaerotillus*

Мутагенний агент	Довжина хвилі/ концентрація	Одиниці виміру	Тривалість обробки, хв	Кількість колоній мікроорганізмів	Летальність, %
УФ–опромінення	260	нм	20	890	50,6
УФ–опромінення	260	нм	20	0	100,0
УФ–опромінення	260	нм	25	0	100,0
УФ–опромінення	260	нм	30	0	100,0
$\text{HNO}_2$	0,02	М	20	872	51,6
$\text{HNO}_2$	0,03	М	20	220	87,8
$\text{HNO}_2$	0,04	М	20	79	95,6
$\text{HNO}_2$	0,05	М	20	0	100,0
Контроль	–	–	–	1800	–

Отже, із отриманих колоній було відібрано 3 мутантних штами р. *Leptotrix* (для зберігання ці штами пересівали на тверде поживне середовище).

Результати обробки мікроорганізмів р. *Sphaerotillus* УФ–опроміненням та нітритною кислотою наведені у табл. 2.

Із наведеної таблиці видно, що при дії УФ–випромінювання не вдалось отримати мутантні штами. Із оброблених нітритною кислотою штамів було відібрано колонії з тих чашок, де летальність становила від 87 %. Як і для представників р. *Leptotrix* колонії мутантних штамів відрізнялись

забарвленням та розміром колоній. Такі штами пересівали для зберігання на тверде поживне середовище, а 3 мутантних штами р. *Sphaerotillus* відібрали для перевірки їх ефективності до видалення заліза та марганцю.

На наступному етапі експерименту мутантними штамами було заселено колонки з цеолітовим завантаженням та пропущено модельні розчини із різною концентрацією заліза та марганцю.

Результати оцінки ефективності видалення заліза та марганцю із модельних розчинів за допомогою мутантних штамів наведено у табл. 3.

Таблиця 3. Вміст заліза та марганцю на виході із колонок при пропусканні модельних розчинів

Модельний розчин, мг/дм <sup>3</sup>	Концентрація на виході, мг/дм <sup>3</sup>		Ефективність видалення, %	
	Fe (II)	Mn(II)	Fe (II)	Mn(II)
Суміш відібраних штамів р. <i>Leptothrix</i> та р. <i>Sphaerotillus</i>				
1*	0,18	0,1	97,6	94
2**	0,49	0,24	97,6	92,5
Штам α р. <i>Leptothrix</i>				
1*	1,3	0,42	74	16
2**	4,4	1,4	56	30
Штам β р. <i>Leptothrix</i>				
1*	0,32	0,4	93,6	20
2**	0,64	1,4	93,6	30
Штам γ р. <i>Leptothrix</i>				
1*	0,19	0,4	96,2	20
2**	0,28	1,1	97,2	45
Штам α р. <i>Sphaerotillus</i>				
1*	3,4	0,29	32	42
2**	7,2	0,95	28	52,5
Штам β р. <i>Sphaerotillus</i>				
1*	2,2	0,19	56	62
2**	5,1	0,69	49	65,5
Штам γ р. <i>Leptothrix</i> та штам β р. <i>Sphaerotillus</i>				
1*	0,07	0,01	98,6	98
2**	0,16	0,03	98,4	98,5
Вихідна популяція				
1*	0,18	0,1	96,4	80
2**	0,49	0,24	95,1	88

Примітка: \* – 5 мг/дм<sup>3</sup> Fe(II) + 0,5 мг/дм<sup>3</sup> Mn(II);

\*\* – 10 мг/дм<sup>3</sup> Fe(II) + 2 мг/дм<sup>3</sup> Mn(II).

На графіку (рис. 1) проілюстровано зміну концентрації заліза та марганцю при фільтруванні модельного розчину № 1 з концентрацією 5 мг/дм<sup>3</sup> Fe(II) та 0,5 мг/дм<sup>3</sup> Mn(II).

З одержаних даних видно, що мутантні штами р. *Leptotrix* та р. *Sphaerotillus* достатньо ефективно видаляють залізо із модельного розчину (максимальна ефективність становила 96 %). Проте ефективність вилучення марганцю була гіршою, ніж у мікроорганізмів вихідної популяції (до 62 %). Причина цього може полягати у тому, що контрольна вихідна популяція є біоценозом, а мутантні штами отримувались із чистих культур.

Подібна ситуація (з ефективним видаленням заліза і малоефективним видаленням марганцю) спостерігалась (рис. 2) і при пропусканні модельного розчину № 2 з більш високими концентраціями заліза (10 мг/дм<sup>3</sup>) і марганцю (2 мг/дм<sup>3</sup>). Максимальна ефективність вилучення заліза становила при цьому 97 %, а марганцю – 65 %.

На противагу окремим штамам мікроорганізмів змішані популяції продемонстрували достатньо високу ефективність видалення обох елементів порівняно з вихідним біоценозом. Так, суміш селекціонованих штамів при пропусканні модельних розчинів: розчин № 1 – 5 мг/дм<sup>3</sup> Fe(II) + 0,5 мг/дм<sup>3</sup>

Mn(II) та розчин № 2 – 10 мг/дм<sup>3</sup> Fe(II) + 2 мг/дм<sup>3</sup> Mn(II) дозволяла видаляти залізо з ефективністю 97,6 % та марганець у межах 92 – 94 % порівняно з ефективністю для вихідної популяції, що давала ефективність видалення заліза до 96,4 % та марганцю до 88 %.

Найкращу ефективність показала суміш штаму  $\gamma$  р. *Leptotrix* та штаму  $\beta$  р. *Sphaerotillus*. Така суміш мутантів видаляє залізо з ефективністю до 98,6 %, марганець – до 98,5 %, що свідчить про вірогідність синергізму між різними штамми залізо– та марганецьокиснюючих бактерій.

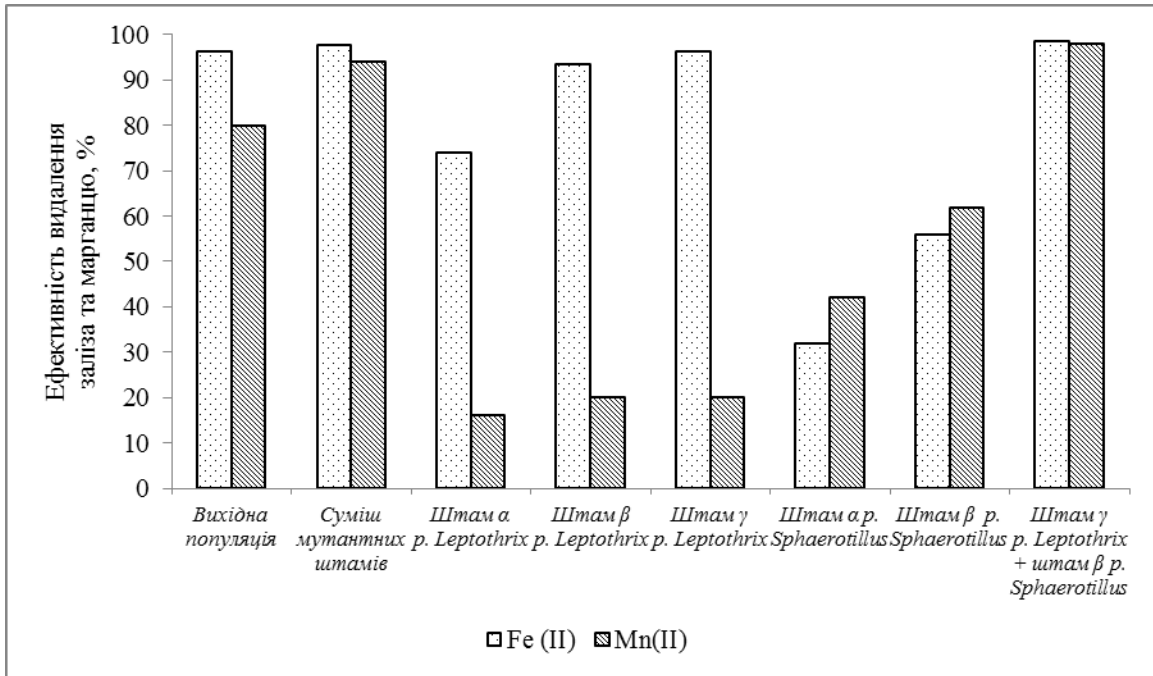


Рис. 1. Ефективність видалення заліза та марганцю із модельного розчину № 1 мутантними штамми

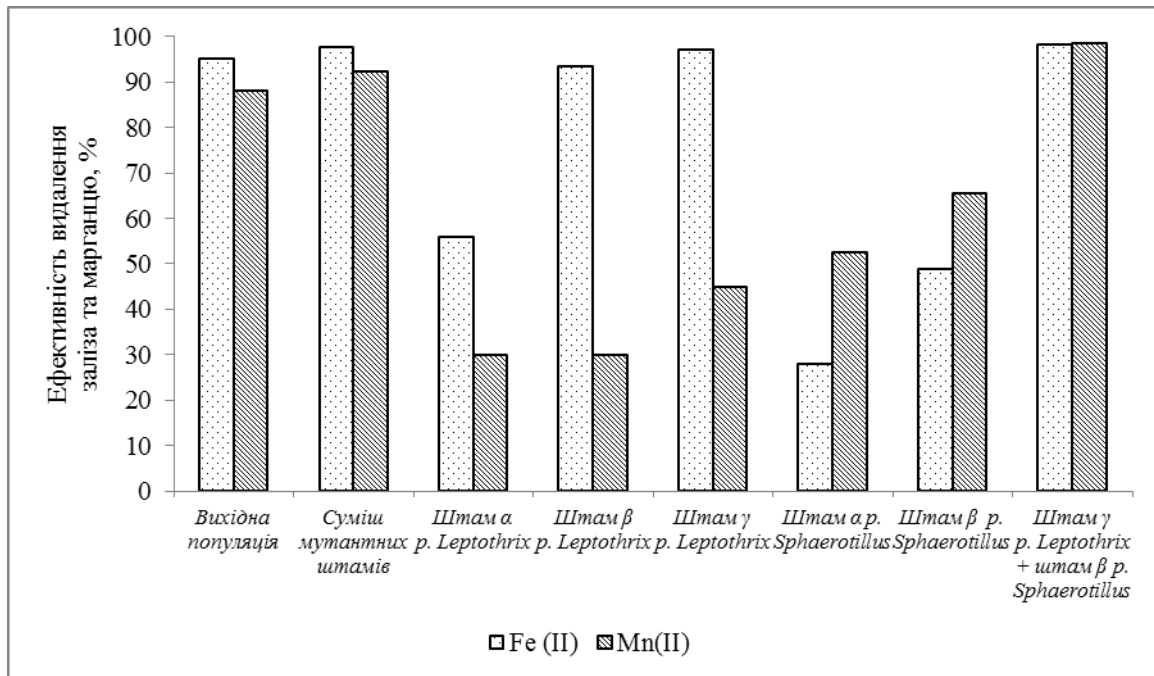


Рис. 2. Ефективність видалення заліза та марганцю із модельного розчину № 2 мутантними штамми

### Висновки

В результаті проведених досліджень було підібрано умови для отримання високоєфективних

мутантних штамів залізо– та марганецьокиснюючих бактерій, а саме обробка УФ–опроміненням з довжиною хвилі 260 нм протягом 20 хв та обробка нітритною кислотою з концентрацією 0,03 М,

0,04 М протягом 20 хв.; отримано та збережено мутантні штами.

При перевірці ефективності видалення заліза та марганцю із модельних розчинів мутантними штамами виявлено, що штами чистих культур мають невисоку ефективність порівняно із вихідною популяцією по видаленню марганцю (до 62 % проти 80 %).

Максимальна ефективність вилучення заліза та марганцю була зафіксована у змішаній культури штаму  $\gamma$  р. *Leptotrix* та штаму  $\beta$  р. *Sphaerotillus* (до 98,6 % для обох елементів).

Мутантні штами збережено для подальшого застосування та можливості їх використання для заселення ними завантаження цеолітових фільтрів для знезалізнення та деманганізації води, а також перевірки синергетичних взаємодій між мутантними штамами.

### Література

1. W.W.J.M. de Wet Biological iron oxidation by *Gallionella* spp. in drinking water production under fully aerated conditions / W.W.J.M. de Wet, I.J.T. Drinkla, L.C. Rietveld, M.C.M. van Loosdrecht // *Water Research*. – 2011. – N 45. – P. 5389 – 5398.
2. Dubinina, G. Modelling and Optimization of Processes for Removal of Dissolved Heavy Metal Compounds from Drinking Water by Microbiological Methods [Text] / G. A. Dubinina, A. Yu. Sorokina, A. E. Mysyakin, M. Yu. Grabovich, A. T. Eprintsev, V. Yu. Bukreeva // *Water Resources*. – 2012. – V. 30. – N 4. – P. 398–404.
3. Qin, S. Fe (II) and Mn (II) removal from drilled well water: a case study from a biological treatment unit in Harbin [Text] / S. Qin, F. Ma, P. Huang, J. Yang // *Desalination*. – 2009. – N. 245. – P. 183–193.
4. Farkas, A. Microbial activity in drinking water-associated Biofilms [Text] / A. Farkas, M. Dragan-Bularda, V. Muntean, D. Ciataras, S. Tigan // *Cent. Eur. J. Biol.* – 2013. – N 8(2). – P. 201–214.
5. Шаяхметова, Г. С. Роль железобактерий при очистке воды от марганца Патракоского водозабора Краснокамского района РБ [Текст] / Г. С. Шаяхметова, В. Д. Назаров, Р. З. Шаяхметов, В. В. Яковлев // *Башкирский химический журнал*. – 2007. – Т.14, № 2. – С. 126–130.
6. Тарасевич, Ю. И. Упрощенная модель обезжелезивания и деманганации воды на клиноптилолитовой загрузке фильтров [Текст] / Ю. И. Тарасевич, А. Е. Кулишенко, В. Е. Поляков, Р. В. Остапенко, В. Т. Остапенко, Т. Б. Кравченко // *Химия и технология воды*. – 2013. – Т. 32, № 5. – С. 98 – 109.
7. Дрожжин, О. С. Роль железобактерий в трансформации железа и марганца в грунтовых водах и использование их для очистки питьевой воды : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.16 [Текст] / О. С. Дрожжин; [Воронежский государственный университет]. – Воронеж, 2001. – 20 с.
8. Кравченко О. В. Розробка методики ідентифікації культур мікроорганізмів, які здатні окислювати сполуки заліза та марганцю у природних водах / О.В. Кравченко // *Проблеми водопостачання, водовідведення та гідраліки. Науково-технічний збірник*. – 2014. – 24. – С. 140 – 145.
9. Кравченко О.В. Роль мікроорганізмів при видаленні з води високих концентрацій заліза на фільтрах з цеолітовим завантаженням / О.В. Кравченко // *Актуальні проблеми систем теплозапостачання і вентиляції, водопостачання і водовідведення. Збірник наукових праць*. – Рівне : НУВГП, 2015. – 198 с. – С. 102 – 103.
10. Захарова, Ю.Р. Микроорганизмы, окисляющие железо и марганец в донных осадках озера Байкал : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.16 [Текст] / Захарова Юлия Робертовна. — Владивосток, 2007. — 21 с.

### References

1. W.W.J.M. de Wet, Drinkla, I.J.T., Rietveld L., M.C.M. van Loosdrecht (2011). Biological iron oxidation by *Gallionella* spp. in drinking water production under fully aerated conditions. *Water Research*, 45, 5389 – 5398.
2. Dubinina, G. (2012). Modelling and Optimization of Processes for Removal of Dissolved Heavy Metal Compounds from Drinking Water by Microbiological Methods. *Water Resources*, 39, 4, 398–404.
3. Qin, S., Ma, F., Huang, P., Yang, J. (2009). Fe (II) and Mn (II) removal from drilled well water: a case study from a biological treatment unit in Harbin. *Desalination*, 245, 183 – 193.
4. Farkas, A., Dragan-Bularda M., Muntean V., Ciataras D., Tigan S. (2013). Microbial activity in drinking water-associated Biofilms. *Cent. Eur. J. Biol.*, 8(2), 201–214.
5. Shayachmetova, G., Nazarov, V., Shayachmetov, R., Yakovlev, V. (2012). The role of iron in water purification from manganese Patrakoskyi intake, Krasnokamskiy region. *RB Bashkir Chemistry Journal*, 14, 2, 126 – 130.
6. Tarasevich, Y., Kylishenko, A., Polyakov, V., Ostapenko, R., Ostapenko, V., Kravchenko, T. (2013). Uproshchennaya model obezhezeivaniya i demanganacii vody na klinoptilolitovoj zagruzke filtrov. *Himiya i tekhnologiya vody*, 32, 5, 98–109.
7. Drozhzhin, O. (2001). Rol zhelezobakterij v transformacii zheleza i marganca v gruntovyh vodah i ispolzovanie ih dlya ochistki pitevoj vody. *Avtoref. dis kand. biol nauk 03 00 16*, 20.
8. Kravchenko, O. (2014). Development of methods for identification of cultures of microorganisms which are able to oxidize iron and manganese compounds in natural water. *Collected papers of KNUCA*, 24, 140 – 145.
9. Kravchenko, O. (2015). The role of microorganisms in removing water from high concentrations of iron filters with zeolite loading. *Collected papers of NUVGP (Rivne)*, 102–103.
10. Zakharova, Y. (2007). The microorganisms, which oxidize iron and manganese in the bottom sediments of Lake Baikal, *avtoref dis kand biol nauk 03 00 16*, 21.



**Рецензент:** д-р техн. наук, проф. Л.А. Саблій, Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут», Київ.

**Автор:** КРАВЧЕНКО Олександр Валерійович Державне підприємство «Науково-дослідний та конструкторсько-технологічний інститут міського господарства», Київ, кандидат технічних наук, завідувач підрозділу міської інфраструктури. E-mail – akravchenko@nikti.kiev.ua

## ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ УДАЛЕНИЯ ИЗ ВОДЫ СОЕДИНЕНИЙ ЖЕЛЕЗА И МАРГАНЦА

А.В. Кравченко

*Подобраны условия для получения высокоэффективных мутантных штаммов железо- и марганцеоксилирующих бактерий: обработка УФ-облучения с длиной волны 260 нм в течение 20 мин. и обработка азотистой кислотой с концентрацией 0,03 М, 0,04 М в течение 20 мин. Установлено, что максимальную эффективность извлечения железа и марганца проявляет смешанная культура штаммов  $\gamma$  р. *Leptotrix* и  $\beta$  р. *Sphaerotillus* (до 98,6 % для обоих элементов).*

**Ключевые слова:** мутанты железо и марганцеоксилирующих бактерий, удаление железа и марганца из воды.

## GETTING OF HIGHLY PRODUCTIVE STRAINS OF MICROORGANISMS FOR REMOVAL OF IRON AND MANGANESE FROM WATER

A. Kravchenko

*High containing of iron and manganese in drinking is a serious problem for Ukraine. Different methods for removing these elements need to be modernized. Due to faster developing of biotechnology, it is important to use its methods in treatment of drinking water, particularly in removing iron and manganese.*

*In our study we established the condition for getting mutant strains of highly productive strains of iron and manganese oxidizing bacteria: UV with a wavelength of 260 nm for 20 min. processing and nitrite acid with concentration of 0.03 M, 0.04 M for 20 min. Maximum efficiency removal of iron and manganese was recorded in mixed culture strain  $\gamma$  *Leptotrix* and strain  $\beta$  *Sphaerotillus* (to 98.6 % for both elements). Mutant strains were stored for further use.*

**Key words:** mutants of iron- and manganese oxidizing bacteria, removing iron and manganese from water.