



Агроекологія, радіологія, меліорація

УДК 628.35+546.766+
628.4.042+631.461

© 2015

І.Б. Сіома

О.Б. Таширеві,

*доктор
технічних
наук*

*Інститут
мікробіології
і вірусології
ім. Д.К. Заболотного*

ЗНЕШКОДЖЕННЯ ТОКСИЧНОГО ХРОМАТУ ПІД ЧАС ЗБРОДЖЕННЯ ЕКОЛОГІЧНО НЕБЕЗПЕЧНИХ ХАРЧОВИХ ВІДХОДІВ ҐРУНТОВИМИ МІКРООРГАНІЗМАМИ

Мета. Визначити кількісні показники стійкості природного мікробного угруповання до хроматаніону та здатності його відновлення до Cr(III). **Методи.** Періодичне культивування, газохроматографічний та фотоколориметричний аналізи. **Результати.** Мікробна асоціація ефективно руйнує відходи, зменшуючи їх масу в 6 разів за 9–12 днів. Метаболічно активна асоціація швидко і ефективно відновлює хромати. **Зростання концентрації хроматів призводить до збільшення часу їх відновлення.** **Висновки.** Отримані дані можна використати для створення новітніх природоохоронних біотехнологій і прогнозування природної ремедіації навколишнього середовища, забрудненого хроматами.

Ключові слова: спорова асоціація, відновлення хроматів, біотехнологія, біоремедіація, тверді харчові відходи.

Елемент хром є необхідним для повноцінної життєдіяльності людини і тварин [6]. Його нестача може призвести до порушення метаболізму ліпідів і глюкози у людини та ссавців. Проте надходження хрому у високих концентраціях в організм може бути загрозою здоров'ю та навіть життю. Так, LD₅₀ оральної токсичності Cr(VI) для щурів становить 50–100 мг/кг. Найтоксичнішими вважаються 6-валентні сполуки хрому (CrO₄²⁻, Cr₂O₇⁻). Вони є мутагенами і канцерогенами.

Сполуки Cr(VI) широко використовують у багатьох галузях промисловості, наприклад у технологічних циклах отримання гальванічних покриттів [5–7]. Тому їх знешкодження є актуальним напрямом збереження довкілля.

Нині у біотехнологіях знешкодження хроматвмісних стічних вод використовують

спеціально селекціоновані хроматрезистентні мікроорганізми, які відновлюють Cr(VI) до нерозчинного, а значить нетоксичного, Cr(III) [6]. Отримання промислово значущих штамів потребує значних зусиль та часу. Додаткові труднощі виникають за необхідності нарощувати біомасу «спеціальних» штамів, їх зберігання, транспортування до місця впровадження та забезпечення роботи промислової установки. Запропонований нами підхід позбавлений цього недоліку. Принциповою новизною нашого підходу є поєднання процесів деструкції екологічно небезпечних твердих харчових відходів та вилучення сполук Cr(VI) із розчинів мікроорганізмами, неадаптованими до токсичного хрому III. Вважаємо, що деструктори твердих харчових відходів можуть неспецифічно

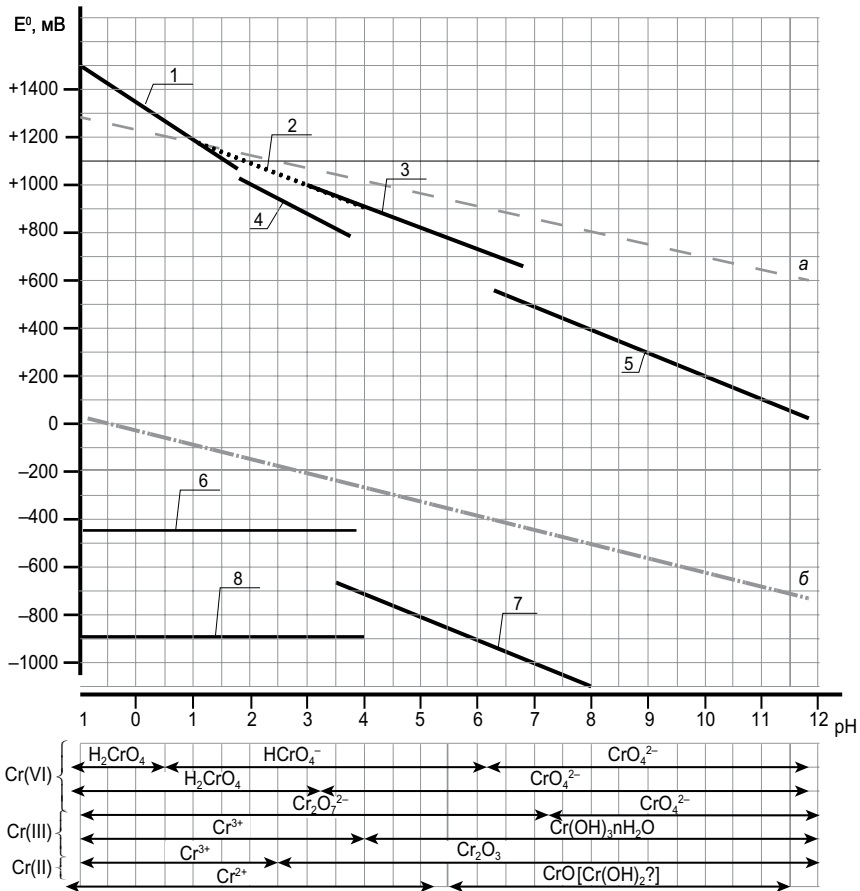


Рис. 1. Редокс-стани сполук хрому [4]: 1 – $H_2CrO_4 + 6H^+ + 3e = Cr^{3+} + 4H_2O$; 2 – $HCrO_4^- + 4H^+ + 3e = Cr(OH)_3 + H_2O$; 3 – $Cr_2O_7^{2-} + 8H^+ + 6e = 2Cr(OH)_3 + H_2O$; 4 – $Cr_2O_7^{2-} + 14H^+ + 6e = 2Cr^{3+} + 7H_2O$; 5 – $CrO_4^{2-} + (n-1)H_2O + 5H^+ + 3e = Cr(OH)_3 \cdot nH_2O$; 6 – $Cr^{3+} + e = Cr^{2+}$; 7 – $Cr(OH)_3 \cdot nH_2O + 3H^+ + 3e = Cr^0 + (3+n)H_2O$; 8 – $Cr^{2+} + 2e = Cr^0$; а – верхня межа термодинамічної стійкості води; б – нижня межа

відновлювати та осаджувати хромати. Ця технологія опирається на такі положення:

- термодинамічне прогнозування, тобто вибір оптимальних умов відновлення хромату мікроорганізмами;
- визначення кількісних показників гомеостазу природної ґрунтової асоціації.

Під гомеостазом ми маємо на увазі: здатність зберігати стабільне функціонування за максимально допустимої концентрації хромату і здатність відновлювати Cr(VI) до нерозчинного $Cr(OH)_3$.

Мета досліджень — визначення кількісних показників стійкості (гомеостаз) природного мікробного угруповання до хромат-аніону та здатності його відновлення до Cr(III).

Спорові бактерії було обрано тому, що вони

дуже поширені у довкіллі, стійкі до несприятливих факторів через утворення ендоспор. Крім цього, з огляду на термодинамічні розрахунки вони створюють оптимальні умови для відновлення хроматів. Так, бацили гідролізують крохмаль і створюють анаеробні умови, потрібні для клостридій. Ефективне відновлення хромату відбувається за максимальної різниці потенціалів між донорною системою (мікроорганізм) і акцепторною (хромати). Стандартний потенціал (E_0') відновлення Cr(VI) до нерозчинного гідроксиду Cr(III) становить +555 мВ (рис. 1, реакція 5), а клостридії здатні створювати найнижчий потенціал середовища — від -200 до -400 мВ. Тому різниця потенціалів між донорною та акцепторною системами у 700–900 мВ має забезпечувати швидке та повне відновлення

хромат-аніону (CrO_4^{2-}) до нерозчинного, а значить, нетоксичного $\text{Cr}(\text{OH})_3$.

Відповідно до нашої мети визначено: кількісні характеристики метаболічної активності мікробної асоціації під час періодичного культивування за відсутності $\text{Cr}(\text{VI})$; вплив $\text{Cr}(\text{VI})$ на метаболічні показники асоціації; летальні та максимально допустимі концентрації (МДК) $\text{Cr}(\text{VI})$ для цієї асоціації; кількісні показники процесу відновлення $\text{Cr}(\text{VI})$ залежно від його концентрацій у середовищі.

Матеріали і методи. Об'єкти досліджень: подрібнена картопля як субстрат, бациллярно-кlostридіальне природне мікробне угруповання і хромат-аніон (CrO_4^{2-}). Цей субстрат було обрано, оскільки крохмаль є одним з найпоширеніших природних полімерів, з яких утворюються харчові відходи. Крім цього, раніше була показана висока ефективність його використання для анаеробного культивування споруютьовальних ґрунтових мікробних асоціацій [3, 10].

Культивування: у флакони об'ємом 250 мл вносили 50 г картоплі (кубики розміром 1 cm^3) та інокулят об'ємом 1 мл. Субстрат та інокулят попередньо нагрівали до 100°C протягом 5 хв. Співвідношення об'ємів газової та рідкої фаз становило 1:1. Об'єм надлишкового газу вимірювали шприцем на 50 мл один раз на добу, показники рН та Eh — потенціометричним методом. Для визначення рН використовували рН-метр-мілівольтметр «рН-150 МА» з вимірювальним електродом ЭСК-10603/4. Редокс-потенціал вимірювали за допомогою рН-метра-мілівольтметра «рН-150 МА» вимірювальним електродом ЭПВ-1. Електродом порівняння був хлорсрібний електрод ЭВЛ-1М3.

Концентрацію водню в газовій фазі визначали за стандартною методикою на газовому хроматографі ЛХМ-8-МД [1]. Хроматограф обладнаний двома сталевими колонками — одна (I) для аналізу H_2 , O_2 , N_2 і CH_4 , друга (II) — для аналізу CO_2 .

Параметри колонок: I—I = 3 м, $d = 3$ мм, з молекулярним ситом 13X (NaX); II—I = 2 м, $d = 3$ мм, з носієм Porapak-Q; температура колонок — +60°C, випарювача — + 75°C, детектора — +60°C, струм детектора — 50 мА. Газ-носії — аргон, швидкість потоку газу — 30 $\text{cm}^3/\text{хв}$. Об'єм проб газу: на I колонці — 2,5 cm^3 , на II — 1 cm^3 .

Уміст H_2 у газовій суміші (у %) розраховували за стандартною методикою.

Концентрацію $\text{Cr}(\text{VI})$ визначали колориметричним методом з дифенілкарбазидом (ДФК)

[2]. Метод базується на здатності ДФК до утворення забарвлених комплексів з хромат-аніоном і вимірюванням оптичної густини.

Результати та їх обговорення. Отримані результати відповідають термодинамічним розрахункам. Так, спорова асоціація ефективно руйнує картоплю і знижує редокс-потенціал до рівнів, близьких до теоретично прогнозованих, тобто оптимальних для відновлення токсичного CrO_4^{2-} .

Початковий потенціал +460 мВ протягом 13 год знижувався до -270 мВ і відбувалося закиснення середовища (зміна рН з 6,92 до 5,51) (рис. 2 і 3). Далі починався синтез водню із швидкістю приблизно 104 мл на 1 кг картоплі за 1 год. Протягом перших 22 год культивування приріст біомаси був незначним (оптична густина не перевищувала 0,4 за початкового показника 0,2). Тільки після зниження Eh до -260 мВ починався активний ріст мікроорганізмів. Це є свідченням домінування облигатно анаеробних мікроорганізмів відповідно до концепції Джекоба [9].

Максимальний приріст біомаси (до 1,9 од. оптичної густини) спостерігався через 70 год. Повна деструкція картоплі асоціацією відбувалася на 9–12-ту добу культивування. Маса субстрату зменшувалася у 6 разів, тобто коефіцієнт деструкції (K_D) становив 6.

Отже, ми довели, що асоціація швидко та ефективно руйнує модельні харчові відходи та знижує редокс-потенціал до мінімальних значень, що найбільш підходять для відновлення хроматів.

Отримані результати свідчать, що хромати доцільно вносити у фазі найнижчого значення редокс-потенціалу та у середині логарифмічної фази росту, оскільки саме ці два фактори зумовлюють ефективне

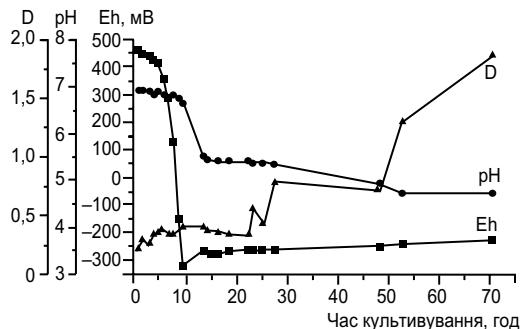


Рис. 2. Динаміка окисно-відновного потенціалу, рН і оптичної густини за культивування без стресових факторів

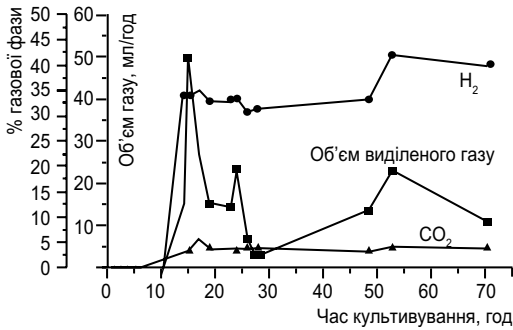


Рис. 3. Динаміка виділення газу та його складу за культивування без стресових факторів

відновлення хроматів. Саме тому хромати вносили у культуру, що бродить, через 40 год культивування. У цей час редокс-потенціал був уже стабільним і становив $-210 \dots -240$ мВ, а оптична густина становила 0,8 од.

Ефективність відновлення хроматів асоціацією досліджували у концентраційному градієнті Cr(VI) 100, 200 і 500 мг/л. Метою було визначення МДК та встановлення здатності мікроорганізмів до росту та відновлення хромату (гомеостаз).

За внесення хромату у концентрації 100 мг/л відбувалося стрибкоподібне підвищення Eh і дуже швидко повне відновлення хроматів протягом 30 хв (рис. 4). Одночасно з відновленням хроматів редокс-потенціал знижувався до вихідної величини. Швидкість відновлення Cr(VI) була настільки високою, що за його внесення у концентрації 50 мг/л ми не встигали відслідкувати стрибок потенціалу

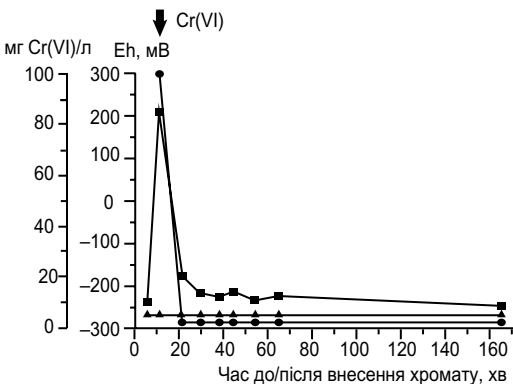


Рис. 4. Динаміка окисно-відновного потенціалу і концентрації Cr(VI) у середовищі за внесення Cr(VI) у концентрації 100 мг/л: ■ — Eh; ▲ — межа чутливості Cr(VI); ● — концентрація Cr(VI)

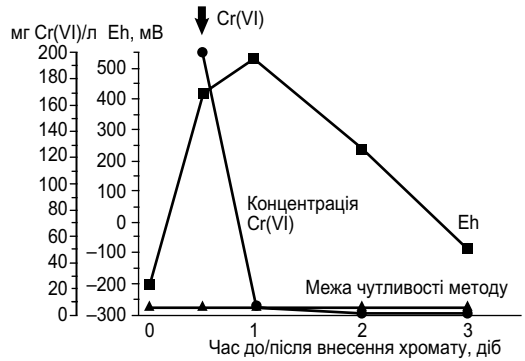


Рис. 5. Динаміка окисно-відновного потенціалу і концентрації Cr(VI) в середовищі за внесення Cr(VI) у концентрації 200 мг/л

вгору та повернення його до вихідної величини. Так само блискавично відбувалося і повне відновлення хромату.

Повернення редокс-потенціалу до вихідних значень і поновлення синтезу водню однозначно доводить здатність асоціації до активного метаболізму за наявності хромату. Динаміка відновлення хроматів свідчить про те, що концентрація Cr(VI) може бути істотно підвищена. Тому наступним кроком стало внесення в активну культуру Cr(VI) у вдвічі більшій концентрації — 200 мг/л. Як і передбачалося, у такій концентрації відновлення хромату уповільнювалося (рис. 5). Ще більше сповільнення спостерігалось за внесення 6-валентного хрому в концентрації 500 мг/л. Час повного відновлення Cr(VI) в середовищі залежав від вихідної концентрації і становив 30 хв для 100 мг/л, 3 доби для 200 мг/л і 7 дб для 500 мг/л. За внесення 6-валентного

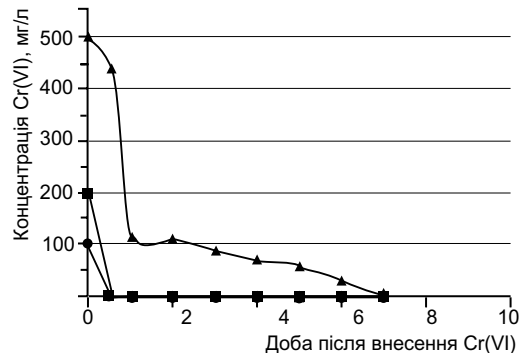


Рис. 6. Швидкість зниження концентрації Cr(VI) залежно від величини вихідної концентрації: ● — 100 мг Cr(VI)/л; ■ — 200 мг; ▲ — 500 мг Cr(VI)/л

хрому в середовище в концентрації 1000 мг/л відбувалося повне пригнічення метаболічної активності асоціації. Отже, летальна концентрація Cr(VI) становила 1000 мг/л.

Швидкість відновлення хроматів була максимальною одразу після внесення і знижувалася відповідно до зменшення концентрацій 6-валентного хрому (рис. 6).

Основним прикладним аспектом отриманих результатів є визначення концентрації

6-валентного хрому в 100 мг/л, що підходить для біотехнологічного очищення. За таких умов швидкість відновлення Cr(VI) до Cr(III) становитиме 100 мг/год.

Уміст Cr(VI) у концентрації 500 мг/л, очевидно, є неприйнятним. Однак важливість отриманих результатів полягає у тому, що за аварійного скиду великих об'ємів Cr⁶⁺ у навколишнє середовище природні угруповання здатні до спонтанної ремедіації.

Висновки

Відповідно до термодинамічних розрахунків досягнуто ефективного відновлення хроматів неадаптованими до них ґрунтовими мікроорганізмами. Споріві природні угруповання *Clostridium* і *Vacillus* ефективно руйнують екологічно небезпечні тверді харчові відходи та відновлюють хромати з утворенням нетоксичного гідроксиду Cr(III). Ефективність

і швидкість видалення хроматів є дуже високими, тому ці асоціації є досить перспективними для подальшого розроблення новітніх природоохоронних біотехнологій. Отримані кількісні показники гомеостазу є також підґрунтям для прогнозування залучення сполук хрому до біогеохімічних циклів та отримання кількісних показників природної ремедіації.

Бібліографія

1. Другов Ю.С. Газохроматографический анализ загрязненного воздуха/Ю.С. Другов, В.Г. Березкин. — М.: Химия, 1981. — 256 с.
2. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии/Ю.Ю. Лурье. — М.: Химия. 1979. — 480 с.
3. Образование молекулярного водорода ассоциацией спорообразующих микроорганизмов/Н.А. Матвеева, А.С. Левинско, И.Р. Притула и др.//Мікробіологічний журн. — 2011.— Т. 73, № 1. — С. 36–43.
4. Таширеві О.Б. Біотехнології очищення промислових стічних вод на основі термодинамічного прогнозування взаємодії мікроорганізмів з металами та радіонуклідами: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра тех. наук: 03.00.20/О.Б. Таширеві. — К.: МОН України, Нац. ун-т харч. техн., 2005. — 35 с.
5. Baselt Randall C. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals In Man/C. Baselt Randall//Foster City: Biochemical Publications (8th ed.). — 2008. — P. 305–307.
6. Chemical and microbial remediation of hexavalent

chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: A review/B. Dhal, H.N. Thatoi, N.N. Das, B.D. Pandey//J. of Hazardous Materials 250–251. — 2013. — P. 272–291.

7. Degarmo E. Materials and Processes in Manufacturing (9th ed.)/ E.P. Degarmo, J.T. Black, R.A. Kohser. — Wiley, 2003. — 793 p.

8. Hingston J.A. Leaching of Chromated Copper Arsenate Wood Preservatives: a Review/J.A. Hingston et.al//Environmental Pollution. — 2001. —111, № 1. — P. 53–66.

9. Jacob H.E. Redox Potential/H.E. Jacob//Meth. Microbiol. — 1970. — 2.—P.91–123.

10. Tashyрева A. The Novel Comprehensive Approach for Agricultural and Landfill Biomass Microbial Fermentation and Biogas Production/A. Tashyрева, O. Tashyrev, I. Prytulа//Biotechnology and Plant Breeding Perspectives; eds. R.K. Behl, E. Arseniuk. — Agrobios (International) Publishers. — 2014. — P. 347–356.

Надійшла 18.12.2014.