

УДК 579.695

ПОДБОР ШТАММОВ-СИМБИОНТОВ СПОСОБНЫХ СНИЖАТЬ КОНЦЕНТРАЦИЮ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

*П.С. Майоров, аспирант, 8(8422) 55-95-47, pavelmayorovv@yandex.ru,
Н.А. Феоктистова, кандидат биологических наук, доцент,
8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru,
З.С. Голякевич, студент, 8(8422) 55-95-47, usxa@yandex.ru,
К.В. Шокина, магистрант, 8(8422) 55-95-47, shokina-k93@mail.ru,
С.Н. Золотухин, доктор биологических наук, профессор,
тел. 8(8422)55-95-47, fvm.zol@yandex.ru,
Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор,
8(8422)55-95-47, dav_ul@mail.ru
ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА*

Ключевые слова: бактерии-симбионты, тяжелые металлы, отходы, гальваническое производство, *Bacillus*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Citrobacter*, *Desulfovibrio desulfuricans*.

Работа посвящена обзору результатов исследований по подбору штаммов симбионтов с целью разработки биопрепарата для снижения концентрации ионов тяжелых металлов в отходах гальванического производства. Установлено, что бактерии рода *Bacillus*, вида *Pseudomonas alcaligenes*, вида *Acidithiobacillus ferrooxidans* и бактерий рода *Citrobacter* и сульфатредуцирующие бактерии *Desulfovibrio desulfuricans* в составе «микробиального коктейля» способны адсорбировать ионы цинка.

Введение. Загрязнение окружающей природной среды – один из факторов, наиболее существенно влияющих на продолжительность жизни и здоровье людей. Загрязнение окружающей природной среды и ее техногенное преобразование приобретают глобальный характер. Одним из наиболее опасных источников загрязнения атмосферы и гидросферы является гальваническое производство. Гальваническое производство связано с образованием большого количества сточных вод и твердых отходов. Наибольшую опасность представляют отходы, образующиеся при реагентной очистке сточных вод. Поиск оптимальных путей выхода из сложившейся ситуации становится все более актуальным [1]. Биологический метод очистки, предполагающий использование симбионтов-микроорганизмов различных семейств, позволяет эффективно извлекать ионы тяжелых металлов и является наиболее перспективным в настоящее время. Он направлен на решение таких задач, как предотвращение

вредного воздействия растворов шламов, полученных в результате гальванического производства по оцинковыванию металлоизделий на окружающую среду, извлечение тяжелых металлов и превращение их во вторичное сырье и, в конечном итоге, снижение класса опасности отходов до 4-го и 5-го уровней. Отходы данных классов опасности являются относительно безвредными и безопасными для окружающей среды [2,3].

Целью исследований является изучение возможности снижения концентрации ионов тяжелых металлов в отходах гальванического производства с помощью микроорганизмов.

Для достижения поставленной цели нами были сформулированы задачи:

- подбор микроорганизмов-симбионтов, способных осуществлять биохимические процессы при достаточно критических значениях pH (от 4 до 10) при средней температуре культивирования 20 ± 2 °C и адсорбировать при этом ионы тяжелых металлов;
- определение биологических свойств микроорганизмов-симбионтов, параметров культивирования;
- создание на их основе биопрепарата, позволяющего в совокупности адсорбировать большинство тяжелых металлов, используемых в промышленности.

Материалы и методы. В работе использовали референс-штаммы бактерий рода *Bacillus*, вида *Pseudomonas alcaligenes*, сульфатредуцирующие бактерии *Desulfovibrio desulfuricans*, *Citrobacter*, *P.pseudoalcaligenes*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА, которые хранились при температуре $+2-4^{\circ}\text{C}$ и культивировались на мясопептонном бульоне и коммерческой среде Постгейта при температуре $+33 \pm 3^{\circ}\text{C}$; полевые штаммы бактерий рода *Bacillus* выделенные нами из проб торфосорбентов и почвы Приволжского Федерального округа (для идентификации бактерий применяли схему R.Gordon, R.A. Slepecky, H.T. Hemphill и специфические бактериофаги рода *Bacillus* [4, 7]). Параметры культивирования бактерий рода *Bacillus*, вида *Pseudomonas alcaligenes*, сульфатредуцирующие бактерии *Desulfovibrio desulfuricans* были подобраны эмпирическим методом [5-6, 9].

Изучение физико-химических свойств микроорганизмов (рост при значениях pH от 4 до 10) и возможность совместного культивирования проводили на плотных питательных средах при стандартных условиях.

В исследованиях использовали спектрофотометр, позволяющий измерять оптическую плотность при $\lambda = 540$ нм; кюветы с толщиной по-

глощающего слоя 50 мм; мерную посуду; рН–метр и буферные растворы, питательные среды, микробиологическое лабораторное оборудование.

При подготовке к выполнению измерений были приготовлены следующие вспомогательные и градуировочные растворы: раствор натрия тетраборнокислого с молярной концентрацией 0,05 моль/дм³; раствор сульфарсазена с массовой долей 0,05%; раствор сульфита натрия с массовой долей 20 %; раствор тиомочевины с массовой долей 10 %; раствор сульфосалициловой кислоты с массовой долей 10 %; раствор серной кислоты (1:1); раствор аммиака (1:1); основной градуировочный раствор ионов цинка с массовой концентрацией 0,025 мг/см³; рабочий градуировочный раствор ионов цинка с массовой концентрацией 0,0005 мг/см³.

Исследование проводили на основе методики измерений массовой концентрации ионов цинка в природных и сточных водах фотометрическим методом с сульфарсазеном ПНДФ 14.1:2.195-2003 (ФР.1.31.2007.03804), рассмотренной и одобренной федеральным бюджетным учреждением «Федеральный центр анализа и оценки техногенного воздействия» (ФБУ «ФЦАО») [7]. Фотометрический метод определения массовой концентрации ионов цинка основан на взаимодействии ионов цинка в слабокислой среде с сульфарсазеном (плюмбоном) с образованием комплексного соединения красно-оранжевого цвета, интенсивность окраски которого измеряется при длине волны $\lambda = 540$ нм.

Результаты исследований. Первоначально нами было выделено из проб торфосорбентов и проб почвы с нефтяными загрязнениями 16 штаммов бактерий, которые были типированы по схемам дифференциации бактерий рода *Bacillus* (по методикам R.Gordon и R.A. Slepescu, H.T. Hemphill), которые включающей обширный набор биохимических тестов (табл. 1) [8,9].

Подбор штаммов бактерий-симбионтов был основан на способности, сохранять биохимическую активность при рН от 4 до 10 при средней культивирования температуре 20 ± 2 °С при максимальной длительности культивирования 14 суток.

Установлено, что *P. alcaligenes* – это грамотрицательные подвижные палочки, не образующие спор. На агаризованной питательной среде образуются плоские, выпуклые, матовые колонии диаметром 2-3 мм. Является аэробом, обладают каталазной и оксидазной активностью. Опытным путем установлено температурный оптимум - 26 до 28 °С.

Культура устойчива к ионам тяжелых металлов: Zn, Pb, Fe, Cr. Продуцирует биологические ПВА.

Desulfovibrio desulfuricans - грамотрицательные сульфатредуци-

Таблица 1 – Ключ для первичной дифференциации бактерий родов *Bacillus* и *Paenibacillus*

1. Каталаза: положительный	2
отрицательный	17
2. Voges-Proskauer: положительный	3
отрицательный	10
3. Рост в анаэробном агаре: положительный	4
отрицательный	9
4. Рост при 50°C: положительный	5
отрицательный	6
5. Рост в 7% NaCl: положительный	<i>B. licheniformis</i>
отрицательный	<i>B. coagulans</i>
6. Кислота и газ из глюкозы (неорганический N): положительный	<i>B. polymyxa</i>
отрицательный	7
7. Редукция NO ₃ до NO ₂ : положительный	8
отрицательный	<i>Paenibacillus alvei</i>
8. Параспоранное тело в спорангии: положительный	<i>B. thuringiensis</i>
отрицательный	<i>B. cereus</i>
9. Гидролиз крахмала: положительный	<i>B. subtilis</i>
отрицательный	<i>B. pumilus</i>
10. Рост при 65°C: положительный	<i>B. stearothermophilus</i>
отрицательный	11
11. Гидролиз крахмала: положительный	12
отрицательный	15
12. Кислота и газ из глюкозы (неорганический N): положительный	<i>B. macerans</i>
отрицательный	13
13. Ширина палочки 1.0 μm или больше: положительный	<i>B. megaterium</i>
отрицательный	14
14. Рост при pH < 6.0: положительный	<i>B. circulans</i>
отрицательный	<i>B. firmus</i>
15. Рост в анаэробных условиях: положительный	<i>B. laterosporus</i>
отрицательный	16
16. Образование кислоты из глюкозы (неорганический азот):	<i>B. brevis</i>
отрицательный	<i>B. sphaericus</i>
17. Рост при 65°C: положительный	<i>B. stearothermophilus</i>
отрицательный	18
18. Разложение казеина: положительный	<i>P. larvae</i>
отрицательный	19
19. Параспоранное тело в спорангии: положительный	<i>P. popilliae</i>
отрицательный	<i>B. lentimorbus</i>

рующие бактерии подвижные, палочковидные, облигатные анаэробы с полярными жгутиками. Относительно устойчивые к тяжёлым металлам, а также имеют способности к восстановлению соединений меди, никеля и цинка.

Citrobacter - грамотрицательные колиформные бактерии семейства. Способны использовать цитрат в качестве единственного источ-

ника углерода., ферментируют лактозу. Прямые подвижные палочки, являющиеся факультативными-анаэробами. Некоторые микроорганизмы данного рода способны адсорбировать ионы меди, свинца и цинка путем создания фосфатных комплексов.

A. ferrooxidans грамотрицательные бактерии, очень подвижные, имеют один жгутик, облигатные аэробы. Используют молекулярный водород в качестве источника энергии. Оптимальная температура для роста 25-30°C. Трехвалентного железа могут быть использованы некоторые виды в качестве акцептора электронов терминал. Бактерии данного вида окисляют Fe (II) до Fe (III).

P.pseudoalcaligenes - грамотрицательные подвижные палочки, являются аэробами, обладают каталазной и оксидазной активностью. Установлена оптимальная температура роста - 28 до 30°C. Имеют способности к адсорбции никеля, цинка, свинца.

Таким образом, были подобраны штаммы микроорганизмов, имеющие в совокупности способность адсорбировать ионы цинка, меди, железа и никеля. Опытным путем была доказана их способность к существованию в симбионтном сообществе

Для проведения количественного исследования способности адсорбировать тяжелые металлы «биологическим коктейлем» из подобранных микроорганизмов мы использовали 7 колб одинакового размера, куда разливали по 200 мл отходов гальванического производства. При этом pH в колбах доводили до значений от 4 до 10, так как определение кислотности нативного образца дало значение pH=13. Затем добавили в каждую колбу по 0,1 мл суточной культуры каждого штамма бактерий рода *Bacillus* (20 штаммов), 0,1 мл – культуры *Pseudomonas alcaligenes*, 0,5 мл – сульфатредуцирующие бактерии *Desulfovibrio desulfuricans*, 0,1 мл культуры *Citrobacter* (5 штаммов), 0,5 мл – культуры *P.pseudoalcaligenes*, 0,5 мл культуры - *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Далее определяли количество бактериальной массы методом последовательных разведений с последующим высевом на мясо-петонный агар.

Опытным путем нами было установлено, что бактерии рода *Bacillus*, используемые нами в эксперименте, вида *Pseudomonas alcaligenes*, сульфатредуцирующие бактерии *Desulfovibrio desulfuricans*, бактерий вида *Acidithiobacillus ferrooxidans* и бактерий рода *Citrobacter* являются штаммами, способными к созданию симбиотического микробного сообщества. Наиболее благоприятным показателем pH среды для развития вышеназванных микроорганизмов и активного наращивания бактериальной массы в течение 14 суток было значение равное 6.

Ход основного эксперимента. Для проведения исследования использовались 4 колбы с 200 мл отходов гальванического производства, на основе которых были подготовлены 4 пробы для дальнейшего измерения оптической плотности: 1) отходы гальванического производства без добавления микроорганизмов (нативный образец) pH=13; 2) отходы гальванического производства со смещенным показателем pH равным 6; 3) отходы гальванического производства со смещенным показателем pH равным 6, куда были внесены суточные культуры бактерий рода *Bacillus* и вида *Pseudomonas alcaligenes* (21 штамм по 0,1 мл каждой суточной культуры); 4) гальванический материал со смещенным показателем pH равным 6, куда были внесены суточные культуры бактерий рода *Bacillus*, *Pseudomonas alcaligenes* (21 штамм по 0,1 мл суточной культуры), сульфатредуцирующими бактериями *Desulfovibrio desulfuricans* (0,5 мл суточной культуры), бактериями вида *Acidithiobacillus ferrooxidans* (0,5 мл суточной культуры) и бактериями рода *Citrobacter* (5 штаммов по 0,1 мл суточной культуры).

Посевы культивировались при температуре 20 ± 2 °C в течение 14 суток. Стоит отметить, что через 24 часа во второй, третьей и четвертой пробах наблюдали образование небольшого осадка, в третьей и четвертой пробах дополнительно наблюдали образование бактериальной пленки и небольшое осветление проб.

В день проведения измерений (15 сутки культивирования) был построен градуировочный график на основе образцов для градуировки с массовой концентрацией ионов цинка от 0,02 до 0,5 мг/дм³. Состав и количество образцов для построения градуировочного графика приведены в таблице 2.

Анализ образцов для градуировки проводили в порядке возрастания их концентрации. Для построения градуировочного графика каждую искусственную смесь фотометрировали 3 раза с целью исключения случайных результатов и усреднения данных. По оси ординат откладывают значения оптической плотности, а по оси абсцисс - величину концентрации вещества в мг/дм³.

Далее проводили отбор проб и их измерение, для чего в мерную колбу вместимостью 50 см³ помещали 3 см³ пробы и доводили до объема 25 см³ добавлением дистиллированной воды. Предварительно пробы фильтровали с помощью фильтровальной бумаги и, поскольку содержание ионов цинка в пробах предположительно превышало 0,5 мг/дм³, пробы разбавлялись дистиллированной водой в соотношении 1:500.

Градуировочный график представлен на рисунке 1.

Таблица 2 - Состав и количество образцов для градуировки

Но- мер образ- ца	Объем рабочего раствора ионов цинка с конц. 0,0005 мг/ см ³ , см ³	Содержание ионов цинка в мерной колбе вместимостью 25 см ³ , мг	Массовая концен- трация ионов цинка в градуировочных растворах, мг/дм ³
1	0	0	0
2	2,0	0,0010	0,04
3	5,0	0,0025	0,10
4	10,0	0,0050	0,20
5	15,0	0,0075	0,30
6	20,0	0,0100	0,40
7	25,0	0,0125	0,50

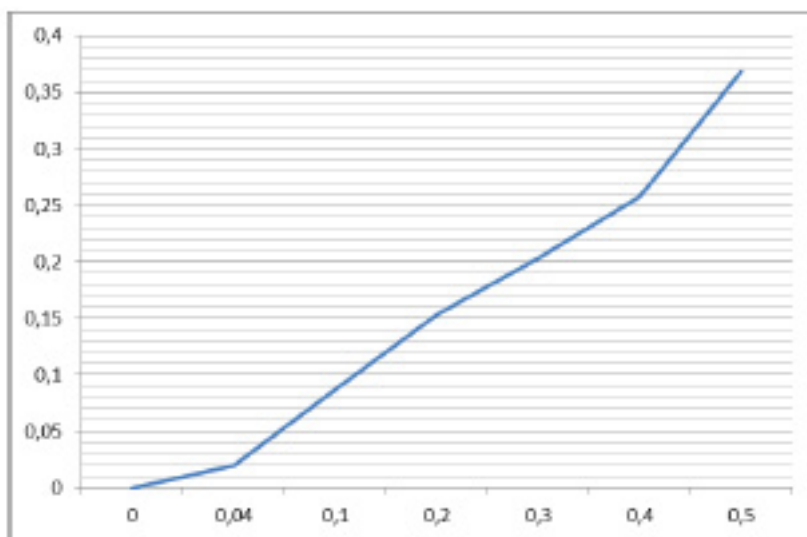


Рисунок 1 - Градуировочный график

Далее к исследуемой пробе добавляли 1 см³ 20 % раствора сульфата натрия, 1 см³- 10% раствора сульфосалициловой кислоты, 1 см³- 10 % раствора тиомочевины и 2 см³- 0,05 % раствора сульфарсазена. После тщательного перемешивания и раствор доводили до метки 0,05 моль/

Таблица 3 - Результаты фотометрии подготовленных проб

Номер пробы	Значение оптической плотности (D)	Массовая концентрация ионов цинка, мг/дм ³
1	0,306	0,45
2	0,097	0,11
3	0,07	0,08
4	0,018	0,02

дм³ раствором натрия тетраборнокислого и вновь перемешивался.

Через 10 минут измеряли оптическую плотность полученного раствора при длине волны 540 нм в кювете с толщиной поглощающего слоя 50 мм и определяли концентрацию цинка в пробе по данным градуировочного графика (рис. 1). Полученные результаты представлены в таблице 3.

Заключение. Проведенные исследования показали, что основное воздействие на адсорбцию цинка в пробах оказал «кислотный коктейль». Так, значение массовой концентрации ионов цинка снизилось во второй пробе по сравнению с первой на 34 пункта и составило 0,11 мг/дм³. Однако, наблюдается снижение концентрации цинка и в двух последних пробах. Это свидетельствует о том, что подобранные нами штаммы микроорганизмов (бактерии рода *Bacillus*, вида *Pseudomonas alcaligenes*, вида *Acidithiobacillus ferrooxidans*, бактерий рода *Citrobacter* и сульфатредуцирующие бактерии *Desulfovibrio desulfuricans*) также способны адсорбировать ионы цинка. В соответствии с полученными данными в последний пробе, по сравнению со второй, концентрация ионов цинка снизилась более чем в 5 раз. Поскольку перед проведением измерений пробы предварительно разбавляли дистиллированной водой, данные значения соответствуют лишь пробам, подготовленным специально для измерения оптической плотности. Концентрация ионов цинка в исходных образцах оказалась значительно выше. Данные представлены в таблице 4.

Таким образом, в пробах с «микробиальным коктейлем» наблюдается снижение концентрации ионов цинка по сравнению с пробами без микроорганизмов. Данный факт позволяет сделать вывод, что бактерии рода *Bacillus*, вида *Pseudomonas alcaligenes*, вида *Acidithiobacillus ferrooxidans* и бактерий рода *Citrobacter* и сульфатредуцирующие бактерии *Desulfovibrio desulfuricans* в составе «микробиального коктейля» способны адсорбировать ионы цинка. Особое внимание стоит обратить

Таблица 4 - Концентрация ионов цинка в исходных пробах

Номер пробы	Концентрация ионов цинка подготовленных проб, мг/дм ³	Вторичное разбавление	Первичное разбавление	Концентрация ионов цинка в первоначальных пробах, мг/дм ³
1	0,45	3:25	1:500	1825
2	0,11	3:25	1:500	458,3
3	0,08	3:25	1:500	333,3
4	0,02	3:25	1:500	83,33

на четвертую пробу, в которой снижение концентрации ионов цинка, по сравнению с третьей, происходит при введение в «коктейль» сульфатредуцирующих бактерий. В целом снижение концентрации ионов цинка в четвертой пробе по сравнению с первой произошло в 22 раза. Но, несмотря на многократное снижение значений концентрации ионов цинка, они все же значительно выше предельно допустимой концентрации.

Библиографический список

1. Алясова, А.В. Влияние гальванического производства на окружающую среду / А.В. Алясова // *Advances in current natural sciences*. - №7. - 2011. - С. 68-69.
2. Брындина, Л.В. Совместное использование микроорганизмов в биологической очистке сточных вод / Л.В. Брындина, С.Н. Петров, О.С. Корнеева // *Экологические системы и приборы*. – М.: Научтехлитиздат, 2006. №11. – С. 13-15.
3. Ксенофонтов, Б.С. Использование микроорганизмов активного ила в качестве флокулянта для очистки сточных вод // Б.С. Ксенофонтов, Е.Е. Гончаренко, Е.В. Сеник // *Естественные и технические науки*. - М.: Спутник+, 2015. - №3(81). – С.221-226.
4. Кудряшова, К.В. Изучение видового разнообразия бактерий рода *Bacillus*, контаминирующих корне- и клубнеплоды / К.В. Кудряшова, Н.А. Феоктистова, М.А. Лыдина, Д.А. Васильев, Б.И. Шморгун // В сборнике: *Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: материалы VI Международной научно-практической конференции*. – Ульяновск, 2015. - С. 95-98.
5. Майоров, П.С. Определение параметров культивирования бактерий рода *Alcaligenes* в отходах гальванического производства / П.С. Майоров, К.В. Шокина. Н.А. Феоктистова // *Новая наука: проблемы и перспективы: международное научно-периодическое издание по итогам международной научно-*

- практической конференции 4 ноября 2015 года. – Стерлитамак, РИЦ Ами, 2015. – С. 8-11.
6. Майоров, П.С. Результаты изучения возможности снижения концентрации ионов цинка в отходах гальванического производства биологическим способом («микробальным коктейлем») / П.С. Майоров, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2016. - № 1 (33). - С. 66-71.
 7. ПНД Ф 14.1:2.195-2003 Количественный химический анализ вод. Методика измерений массовой концентрации ионов цинка в природных и сточных водах фотометрическим методом с сульфарсазеном – Normasc– система нормативов - URL: <http://www.normacs.ru/Doclist/doc/V72U.html> - дата обращения 12.11.2015.
 8. Феоктистова, Н.А. Результаты сравнительного анализа бактериологических методов исследований какао-порошка на наличие бацилл, вызывающих порчу продуктов питания (БВПП) / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2015. - № 1 (29). - С. 69-77.
 9. Шокина, К.В. Определение параметров культивирования бактерий рода *Bacillus* в сточных водах гальванического производства / К.В. Шокина, П.С. Майоров, Н.А. Феоктистова // Новая наука: проблемы и перспективы: международное научно-периодическое издание по итогам международной научно-практической конференции 4 ноября 2015 года. – Стерлитамак, РИЦ Ами, 2015. – С. 22-29.

MATCHING OF SHTAMMOV-SIMBIONTOV CAPABLE TO REDUCE CONCENTRATION OF IONS OF HEAVY METALS

Mayorov P.S., Feoktistova N.A., Golyakevich Z.S., Shokina K.V., Zolotukhin S.N., Vasilyev D.A.

Keywords: *bacteria-simbionty, heavy metals, waste, galvanic production, Bacillus, Pseudomonas alcaligenes, Acidithiobacillus ferrooxidans, Citrobacter, Desulfovibrio desulfuricans.*

Work is devoted to the overview of results of researches on matching of strains of simbiot for the purpose of development of a biological product for decrease in concentration of ions of heavy metals in waste of galvanic production. It is established that bacteria of the sort *Bacillus*, a type of *Pseudomonas alcaligenes*, a type of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and bacteria of the sort *Citrobacter* and sulfatredutsiryushchy bacteria of *Desulfovibrio desulfuricans* as a part of “mikrobalny cocktail” are capable to adsorb zinc ions.