

УДК 628.112+574.582

М. А. Сазановец, аспирант (БГТУ);**А. В. Игнатенко**, кандидат биологических наук, доцент (БГТУ)**АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ НА АДСОРБЦИЮ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ АЛЮМОСИЛИКАТНЫМИ СОРБЕНТАМИ**

Статья посвящена проблемам сорбционной очистки водных сред, загрязненных ионами тяжелых металлов. Рассмотрено влияние микроорганизмов на сорбционные свойства алюмосиликатных сорбентов. Проведено изучение сорбции ионов Fe^{2+} , Cu^{2+} бактериальными клетками в свободном состоянии, иммобилизованном на поверхности алюмосиликатного сорбента, а также при образовании биопленок. Показано, что в присутствии иммобилизованных микроорганизмов предельная емкость связывания тяжелых металлов алюмосиликатным сорбентом возрастает. Образование биопленки на поверхности сорбента увеличивает устойчивость микроорганизмов к тяжелым металлам и повышает эффективность их связывания по сравнению с алюмосиликатным сорбентом.

The article is devoted to the problems of waste water clearing from heavy metals. It was examined the influence of microorganisms at adsorption properties of alum silicate adsorbents. It was studied sorption of Fe^{2+} , Cu^{2+} ions with bacteria cells in suspension, immobilized condition on the surface of alum silicate sorbents and in biofilms. It was shown that immobilization of microorganisms increased a total capacity of heavy metals binding by alum silicate sorbent. Biofilms formation increase stability of microorganisms to heavy metals and efficiency of heavy metals catching in comparison with alum silicate sorbents.

Введение. Загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами является одной из актуальных экологических проблем. В настоящее время для очистки водных сред от тяжелых металлов наиболее широко используется сорбционная очистка на ионообменных смолах, активированных углях, алюмосиликатных сорбентах. Наибольшей эффективностью связывания ионов тяжелых металлов (ТМ) обладают сорбенты с развитой внутренней поверхностью микропор, достигающей $1000 \text{ м}^2/\text{г}$, и сорбционной емкостью к отдельным ТМ в диапазоне $100\text{--}580 \text{ мг/г}$ [1, 2].

Одним из недостатков микропористых сорбентов является загрязнение их поверхности органическими, неорганическими загрязнителями, а также микроорганизмами. Быстрое развитие на поверхности сорбентов бактерий и других микроорганизмов приводит к изменению сорбционных свойств таких сорбентов.

Основная часть. Цель настоящей работы – анализ связывания бактерий на поверхности алюмосиликатных сорбентов и их влияния на сорбцию тяжелых металлов.

В качестве объекта исследования использовали алюмосиликатный сорбент по ТУ 2163-001-01115840-94 с удельной поверхностью $30 \text{ м}^2/\text{г}$. Сорбент фракционировали с помощью сит, отбирая гранулы размером $(0,9 \pm 0,1) \text{ мм}$.

В работе использовали чистые культуры бактерий и грибов из коллекции кафедры биотехнологии и биоэкологии: *Bacillus sp.*, *E. coli*, а также выделенные из сточных вод штаммы *Pseudomonas sp.*

Коллекционные культуры бактерий высевали петлей на скошенный питательный агар (ПА) и культивировали в течение 3 сут. Затем смывы культур в питательном бульоне (ПБ) наращивали в течение 2 ч для перевода клеток в экспоненциальную фазу роста. После этого клетки осаждали центрифугированием при 8 тыс. об./мин в течение 10 мин, трижды отмывали от питательной среды в физиологическом растворе (ФР) при тех же условиях центрифугирования.

Оценку концентрации микроорганизмов в водной среде проводили турбидиметрическим методом [3]. Для этого строили калибровочные графики зависимости интенсивности рассеивания света на длине волны 600 нм (D_{600}) от концентрации клеток в суспензии. Содержание микроорганизмов в водной среде определяли методом культивирования на агаризованных питательных средах по формуле

$$N = \frac{a \cdot 10^f}{V}, \quad (1)$$

где a – среднее число выросших колоний на чашках; f – степень разведения суспензии клеток; V – объем суспензии, нанесенной на поверхность агаризованной среды. Концентрации микроорганизмов в водной среде варьировали в интервале $10^6\text{--}10^8 \text{ кл/мл}$.

Содержание ионов Fe^{2+} , Cu^{2+} в водной среде определяли комплексонометрическим методом по величине оптической плотности комплексов тяжелых металлов с ЭДТА на длинах волн 370 и 750 нм соответственно. Для этого предварительно строили калибровочные зависимости

между изменением оптической плотности среды от концентрации ионов ТМ на выбранных длинах волн.

Процесс сорбции ТМ изучали в статическом режиме. Стационарную сорбцию ТМ проводили в колбах $V = 50 \text{ см}^3$, содержащих 2 г сорбента и 20 см^3 раствора ТМ соответствующей концентрации. Колбы встряхивали в шейкере в течение 1 ч, отбирая по 2 см^3 пробы каждые 10 мин, добавляли в них по 2 см^3 комплексона ЭДТА (1 : 1) и измеряли оптические плотности полученных комплексов тяжелых металлов на соответствующих длинах волн. Величину сорбции ТМ сорбентом определяли по выражению

$$A = \frac{(C_0 - C_p) \cdot V}{m}, \quad (2)$$

где C_0 , C_p – исходная и равновесная концентрации ТМ; V – объем раствора; m – сухая масса сорбента.

Проверяли подчиненность процесса связывания ТМ уравнению изотермы мономолекулярной сорбции Ленгмюра [4]:

$$A = \frac{A_\infty \cdot K \cdot C}{(K \cdot C + 1)}, \quad (3)$$

где A_∞ – предельная емкость связывания ТМ клетками; K – константа связывания Ленгмюра; C – равновесная концентрация ТМ.

Величину A_∞ находили, преобразуя выражение (3) в обратных координатах $1/A$ от $1/C$.

Связывание микроорганизмов с алюмосиликатным сорбентом регистрировали турбидиметрическим методом по изменению концентрации клеток в водной среде.

Сухую биомассу определяли методом взвешивания на аналитических весах после центрифугирования клеток и их высушивания до постоянной массы при 105°C .

Для изучения влияния микроорганизмов на сорбционные свойства сорбента через колонку с алюмосиликатными гранулами пропускали отмытые центрифугированием в физиологическом растворе суточные культуры клеток до полного насыщения сорбента. Выход микроорганизмов из колонки регистрировали по изменению оптической плотности проб на длинах волн 280 и 600 нм. Колонки с иммобилизованными на сорбенте клетками бактерий использовали далее для наращивания биопленок. Для этого через колонки пропускали раствор глюкозы (10^{-4} М) в течение 3 сут.

После адсорбции микроорганизмов на алюмосиликатных гранулах и образования биопленок через полученные образцы сорбентов пропускали растворы солей ТМ при таких же усло-

виях, как и в случае исходного алюмосиликатного сорбента.

Оценку жизнеспособности микроорганизмов в присутствии ТМ проводили редуктазным методом по ГОСТ 23454–79 [5] с помощью редокс-красителя метиленового синего (МС), а также методом диффузии веществ в агар.

Измерение удельной площади поверхности сорбента проводили с помощью связанного красителя МС, измеряя его концентрацию в растворе до и после связывания на длине волны 680 нм.

Зная площадь поверхности, занимаемую молекулой МС, и концентрацию связанного красителя, рассчитывали величину удельной поверхности сорбента, как описано в [6].

Полученные данные обрабатывали статистически, используя программное обеспечение Microsoft Excel.

В работе проведен сравнительный анализ сорбционных свойств алюмосиликатного сорбента до и после иммобилизации микроорганизмов, а также после образования биопленки на его поверхности методом анализа изотерм адсорбции ТМ и определения максимальной сорбционной емкости сорбента и биосорбента.

Вначале определяли величину A_∞ связывания ТМ алюмосиликатным сорбентом. Время сорбции ТМ выбрано равным 2 ч, так как запись кинетических кривых сорбции показала, что равновесное состояние в анализируемой среде устанавливалось в течение 1–2 ч и далее не изменялось.

Результаты анализа полученных изотерм сорбции ТМ после установления равновесного состояния приведены на рис. 1.

Как видно из рис. 1, связывание Fe^{2+} хорошо описывается уравнением изотермы мономолекулярной сорбции Ленгмюра. Аналогичная зависимость наблюдается и в случае Cu^{2+} .

Рассчитанные значения величин A_∞ приведены в таблице.

На втором этапе изучали связывание микроорганизмов с поверхностью алюмосиликатного сорбента (рис. 2).

Анализ максимальной удельной емкости связывания клеток на поверхности сорбента показал (таблица), что она варьирует в диапазоне 0,45–0,75 мг/г для изученных микроорганизмов.

В отличие от алюмосиликатного сорбента изотерма связывания ТМ на иммобилизованных микроорганизмах носит более сложный характер (рис. 3). Выделяется область низких концентраций ТМ, в которой связывание подчиняется уравнению Ленгмюра, и область высоких концентраций, описываемая зависимостью Фрэйдлиха [3]. Это, видимо, связано с проникновением ТМ внутрь клеток и их гибелью.

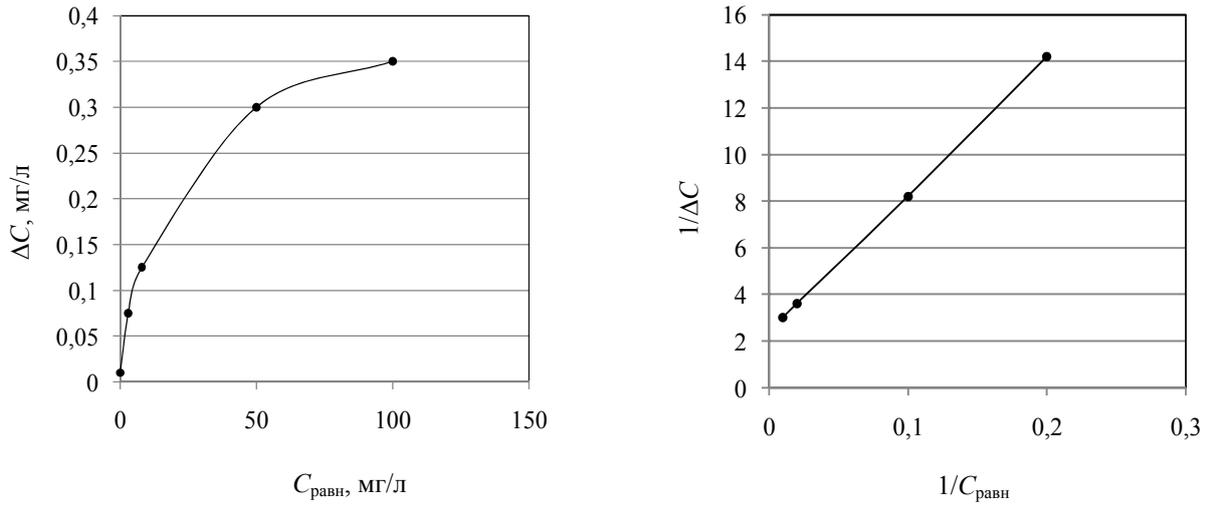


Рис. 1. Изотерма сорбции Fe^{2+} на алюмосиликатном сорбенте в прямых и обратных координатах

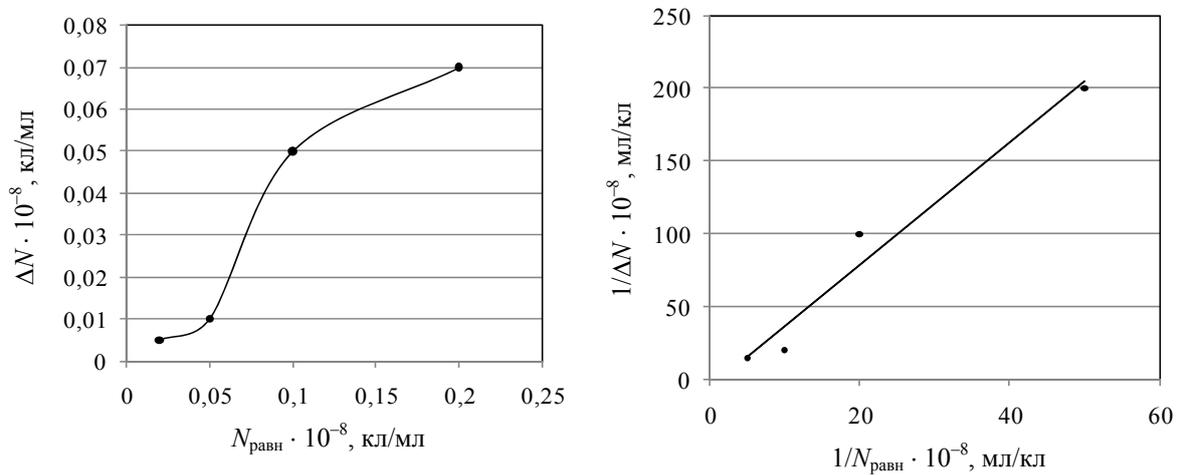


Рис. 2. Изотерма сорбции клеток *E. coli* на алюмосиликатном сорбенте в прямых и обратных координатах

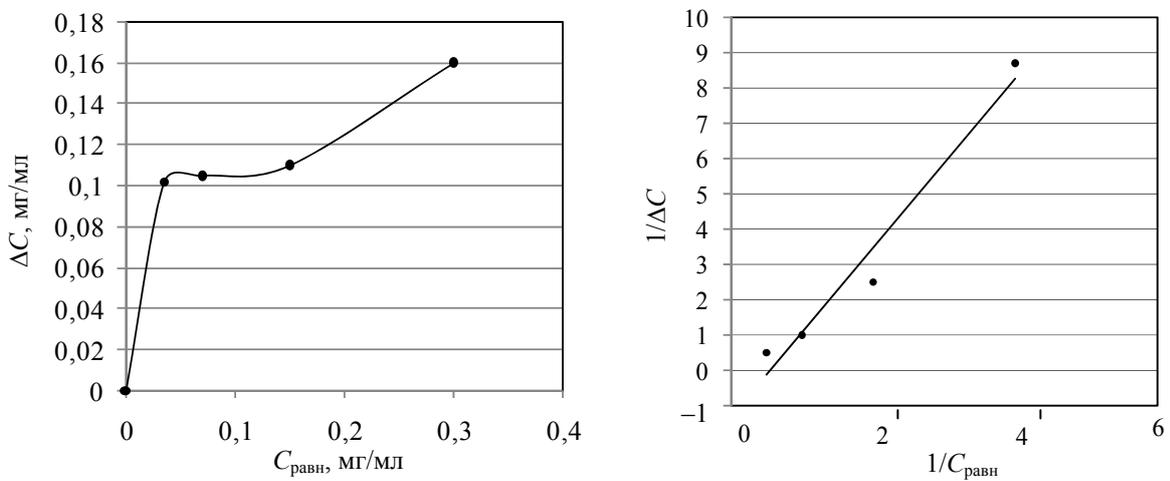


Рис. 3. Изотерма сорбции Cu^{2+} на суспензии клеток *E. coli* в прямых и обратных координатах

Рассчитанные значения показателей сорбции Fe^{2+} , Cu^{2+} для алюмосиликатного сорбента и биосорбентов в свободном и иммобилизованном состоянии приведены в таблице. Как из нее видно, сорбционная емкость алюмосиликатного сорбента в присутствии иммобилизованных микроорганизмов *E. coli* увеличивается в 2–3 раза по сравнению с исходным сорбентом.

Характеристика сорбционной емкости сорбентов ($T = 20^{\circ}C$)

Сорбенты	Сорбируемый объект	Сорбционная емкость, мг/г
Алюмосиликатные гранулы	Fe^{2+}	$2,2 \pm 0,1$
Алюмосиликатные гранулы	Cu^{2+}	$2,9 \pm 0,4$
Алюмосиликатные гранулы	<i>E. coli</i>	$0,45 \pm 0,05$
Алюмосиликатные гранулы	<i>Pseudomonas sp.</i>	$0,75 \pm 0,10$
Клетки <i>E. coli</i>	Fe^{2+}	$3,5 \pm 0,3$
Клетки <i>Pseudomonas sp.</i>	Fe^{2+}	$27,6 \pm 0,5$
Алюмосиликатный сорбент с клетками <i>E. coli</i>	Cu^{2+}	$6,5 \pm 0,4$
Алюмосиликатный сорбент с биопленкой <i>Pseudomonas sp.</i>	Fe^{2+}	$120,1 \pm 0,8$

В реальных условиях микроорганизмы, иммобилизованные на поверхности сорбентов, могут образовывать биопленки. Как указывают данные анализа редуцтазной активности клеток *Bacillus sp.* в суспензии и в биопленке (рис. 4), микроорганизмы в 3–4 раза более устойчивы к ионам меди в составе биопленки, чем в свободном состоянии.

Было проверено также, как влияет образование биопленки на сорбционные свойства алюмосиликатного сорбента (таблица). При сорбции на поверхности сорбента устойчивых к ТМ клеток *Pseudomonas sp.* величина максимальной сорбционной емкости связывания Fe^{2+} увеличилась на порядок, а при образовании биопленки повышалась в 50–60 раз по сравнению с алюмосиликатным сорбентом.

Заключение. Полученные данные показывают, что микроорганизмы хорошо сорбируются на поверхности алюмосиликатного сорбента и образуют биопленки.

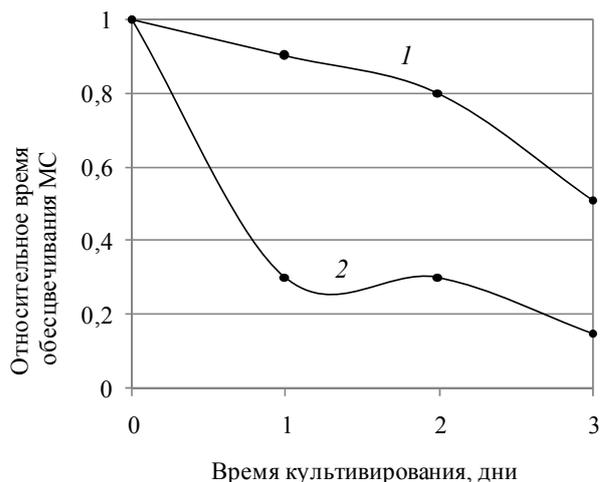


Рис. 4. Редуцтазная активность *Bacillus sp.* в присутствии Cu^{2+} (10^{-3} М):
1 — клетки в ПБ; 2 — клетки в биопленке

Клетки бактерий проявляют повышенную устойчивость к ТМ в иммобилизованном состоянии и сохраняют свою жизнеспособность при более высоких концентрациях по сравнению со свободными микроорганизмами.

Образование биопленки устойчивых к ТМ форм клеток повышает сорбционную емкость связывания ТМ на 1–2 порядка по сравнению с исходным алюмосиликатным сорбентом.

Литература

- Смирнов, А. Д. Сорбционная очистка воды / А. Д. Смирнов. — Л.: Химия, 1982. — 168 с.
- Илялетдинов, А. Н. Микробиологическая очистка воды от тяжелых металлов / А. Н. Илялетдинов // Водные ресурсы. — 1980. — № 2. — С. 158–169.
- Фридрихсберг, Д. А. Курс коллоидной химии / Д. А. Фридрихсберг. — Л.: Химия, 1984. — 368 с.
- Грег, С. Адсорбция, удельная поверхность, пористость / С. Грег, К. Синг. — 2-е изд. — М.: Мир, 1984. — 306 с.
- Методы определения ингибирующих веществ: ГОСТ 23454–79. — Введ. 01.01.80. — М.: Стандарты, 1989. — 6 с.
- Савицкая, Т. А. Коллоидная химия: лаб. практикум: в 2 ч. / Т. А. Савицкая, Д. А. Котиков. — Минск: БГУ, 2004. — Ч. 1. — 104 с.

Поступила 28.02.2013