

Геохимическая трансформация неорганических ионов микроорганизмами

Абдрашитова С.А.

В современном мире экологические проблемы по своей общественной значимости вышли на одно из первых мест. Бурное развитие хозяйственной деятельности людей привело к интенсивному, часто разрушительному, воздействию на окружающую среду. Влияние человека на природу происходит как путем преобразования сложившихся в течение тысячелетий естественных систем, так и в результате загрязнения почв, воды, воздуха. Это привело к резкому ухудшению состояния природы, часто с необратимыми последствиями.

Интенсивность искусственной концентрации, перераспределения и проникновения химических элементов из литосферы в биосферу несопоставима со скоростью миграции вещества, характерной для эволюционных геологических процессов. Естественные механизмы самоочищения биосферы не справляются со все возрастающей нагрузкой, что приводит к деградации окружающей среды, выражающейся в необратимом нарушении химического равновесия в экосистемах регионального и глобального уровня.

В большинстве случаев миграция металлов в природной среде связана с их окислительно-восстановительными превращениями, что обуславливает изменение уровней их растворимости. Большая роль в окислительно-восстановительных превращениях металлов принадлежит микроорганизмам и поэтому понимание механизмов окислительно-восстановительных трансформаций металлов, осуществляемых бактериями, важно для управления этими процессами при разработке способов очистки окружающей среды от токсичных ионов.

Основой биогеохимических преобразований металлов являются следующие виды взаимодействия микроорганизмов с металлами: аккумуляция металлов микроорганизмами за счет поглощения полисахаридной капсулой, клеточной стенкой; активный транспорт металлов в клетку; образование летучих и нерастворимых соединений металлов. По мере усиливающегося загрязнения биосферы металлами последние, благодаря микроорганизмам, начинают вовлекаться в глобальные биогеохимические циклы.

Существует большое разнообразие в распределении аккумулярованных металлов. В зависимости от металла и микроорганизма связывание происходит

почти полностью на поверхности клеток или, в основном, внутриклеточно, есть также много промежуточных вариантов. Например, накопление ртути у грибов и бактерий происходит в основном за счет адсорбции их на поверхности клеток. Ртуть у водорослей и цианобактерий аккумулируется как внутри, так и на поверхности клеток.

В превращениях элементов с переменной валентностью участвуют практически все группы микроорганизмов - хемолитотрофные, фотоавтотрофные и гетеротрофные.

К настоящему времени представления о способности микроорганизмов окислять или восстанавливать элементы с переменной валентностью существенно изменились, так как появились сведения, что некоторые из них могут, в зависимости от условий выращивания и состава среды, восстанавливать или окислять несколько переменного-валентных элементов, используя их в качестве акцептора или, соответственно, донора электронов. В других случаях окислительно-восстановительные реакции имеют место при взаимодействии элементов с переменной валентностью с продуктами метаболизма бактерий (1-7).

В данном сообщении будут обсуждены проблемы, важные для Республики Казахстан и связанные с трансформацией серы и ртути микроорганизмами.

Трансформация серы микроорганизмами

С 1995 года стало очевидным, что мировое производство серы превышает спрос на серу. В основном, большой избыток возник из-за повышенного образования серы на нефтеперерабатывающих заводах по всему миру и от широкого использования кислого природного газа. К настоящему времени пришло понимание того, что несмотря на то, что сера является жизненно важным продуктом для любой развитой экономики, в регионах, перерабатывающих кислый природный газ и тяжелую нефть, большое количество серы надо будет хранить на временной основе и, насколько это можно предполагать в настоящее время, в течении 10 – 50 лет.

Складирование серы в виде блоков, осуществленное в 70 – 80 годы в Канаде, Франции и других странах привело к значительным экологическим проблемам, связанным с образованием сернокислотных стоков из-под блоков. Оказалось, что образующаяся серная кислота является результатом метаболической деятельности тионовых бактерий, для которых окисление серы является способом получения энергии.

Тионовые бактерии широко распространены в различных экологических нишах и, в зависимости от вида бактерий, могут жить в присутствии серы при самых разнообразных значениях рН без органического вещества. Большинство тионовых бактерий являются аэробными формами, которым для развития необходим кислород, но известны и анаэробные тионовые бактерии, которые окисляют серу в отсутствие кислорода за счет процесса денитрификации. Наиболее значимыми среди тионовых автотрофных бактерий являются *Thiobacillus thioparus*, *T. thiooxidans*, *T. denitrificans*, *T. ferrooxidans*. Самым важным их отличием между собой является способность расти при различных рН среды обитания.

При окислении серы выделяется много энергии для жизнедеятельности бактерий. Так, для сравнения, при окислении одного атома закисного железа до трехвалентного состояния высвобождается один электрон, в то время как

каждый атом серы при окислении до сульфата высвобождает шесть электронов. При окислении одного грамма моля железа и серы выделяется соответственно 11 и 118 ккал.

В настоящее время в Канаде фирма Alberta Sulphur Research LTD. проводит исследования и полевые работы по изучению возможных сценариев развития микробиологических процессов при подземном хранении твердой серы (8).

В Республике Казахстан к настоящему времени вокруг нефтеперерабатывающих заводов скопилось огромное количество серы, которая складывается на поверхности почвы. В связи с тем, что развитие микробиологических процессов может привести к окислению серы и загрязнению подземных и поверхностных вод серной кислотой, было предложено захоронить серу в отработанные урановые карьеры, которые затем покрывать слоем почвы. Предполагалось, что это поможет предотвратить окисление серы бактериями.

Нами были проведены исследования для выяснения возможности развития тионовых бактерий при моделировании в лабораторных условиях процесса захоронения серы в отработанных карьерах, основание которых покрыто водоупорными глинами, при различных температурах и режимах увлажнения.

Эксперименты проводили в сосудах, половина которых инкубировали при температуре $+4-6^{\circ}\text{C}$, что имитировало предполагаемую температуру в месте захоронения серы в зимний и весенне-осенний период. Другая половина сосудов находилась при температуре $+18-20^{\circ}\text{C}$, что соответствовало возможным температурам в хранилище летом в условиях резко-континентального климата в данном регионе Казахстана. Применялся различный режим орошения, имитирующий поступление воды на поверхность хранилища с атмосферными осадками.

Полученные результаты позволили дать прогноз развития микробиологических процессов, которые будут происходить при складировании серы в карьерах: сначала начнут развиваться тионовые бактерии *T.thioparus* и *T.denitrificans*, живущие при слабощелочных и нейтральных значениях среды. Так как при своем развитии эти бактерии получают энергию за счет окисления серы, то на границе раздела сера\глина будет образовываться серная кислота, что будет снижать рН почвы и подземных вод и стимулировать развитие бактерий *T.thiooxidans*. Эти бактерии способны развиваться при кислых и очень кислых рН и также используют серу в качестве источника энергии. В результате этого будет вновь образовываться серная кислота.

Если грунтовые воды будут находиться достаточно далеко от дна карьеров, то процесс образования серной кислоты бактериями будет развиваться медленно, но если грунтовые воды будут находиться очень близко или будут подниматься в весенне-осенний период до уровня складываемой серы, то микробиологические процессы окисления серы будут развиваться очень быстро и загрязнение грунтовых вод неизбежно.

Что будет происходить с верхним слоем серы, который предполагается покрыть слоем водоупорной глины высотой 1 – 1,5 метров? В условиях резко - континентального климата Казахстана с выпадением осадков в виде дождя и снега увлажнение глины обязательно будет иметь место и развития процессов бактериального окисления серы избежать будет невозможно. Это приведет к тому, что по мере образования серной кислоты, последняя будет подниматься вверх и постепенно распространяться дальше, загрязняя близлежащие почвы,

поверхностные и грунтовые воды. Это позволяет говорить о потенциальной опасности захоронения серы в карьерах.

Трансформация ртути микроорганизмами

Следующее исследование связано с изучением возможности использовать бактерии, устойчивые к ртути, для разработки способа биоремедиации подземных вод от ртути.

Из почв и илов пригорода Павлодара, загрязненных ртутью в результате деятельности завода «Химпром» по производству хлор-щелочей, были выделены аэробные и факультативно-анаэробные бактерии, а также анаэробные сульфатредуцирующие бактерии (СРБ), устойчивые к 0,005, 0,02 и 0,05mM HgCl₂. Для исследований было отобрано 3 штамма аэробных бактерий, которые были идентифицированы как *Pseudomonas stutzeri*, штамм Ks 28 и 2 штамма были отнесены к виду *Pseudomonas putida*, штаммы 52 и 19. Факультативно-анаэробная бактерия была отнесена к виду *Citrobacter freundii*, штамм 8, а два отобранных штамма СРБ –к роду *Desulfotomaculum*, штаммы 8а и 12.

Оптимальной температурой для роста исследуемых аэробных бактерий, устойчивых к ртути, является температура +28°C. При температуре +35°C бактерии растут очень слабо и с повышением концентрации ртути в среде рост бактерий практически прекращается. Аэробные бактерии хорошо растут при температуре +4°C, несколько снижая при этой температуре скорость роста при концентрации ртути до 0,05 mM HgCl₂.

Аэробные бактерии поглощают растворимую ртуть внутрь клеток, восстанавливают ее до металлической ртути с последующим выбросом из клетки. Бактерии хорошо сорбируются на активированном угле, керамзите и песке.

Моделирование процесса очистки ртутьсодержащих стоков в лабораторном эксперименте с использованием аэробных бактерий, иммобилизованных на керамзите, показало, что бактерии способны активно поглощать ртуть как при температуре +20 - 22°C, так и при +4°C.

Результаты эксперимента представлены на рисунках 1, 2 и свидетельствуют о том, что в присутствии 0,005mM HgCl₂ процесс поглощения ртути аэробными бактериями начал стабилизироваться в течении 5 – 6 дней. Наилучшие показатели в этом эксперименте отмечены для штаммов № 52 и KS28. В экспериментах, где использовался сток с концентрацией 0,05mM HgCl₂ процесс стабилизации завершился в такие же сроки, как и в вариантах с 0,005mM HgCl₂, но количество ртути в растворах, выходящих из реакторов, было существенно больше. Следует отметить, что увеличение объема заменяемого раствора через 10 суток эксперимента до 300 мл показало, что бактерии активно поглощают ртуть и при такой скорости замены растворов в реакторах.

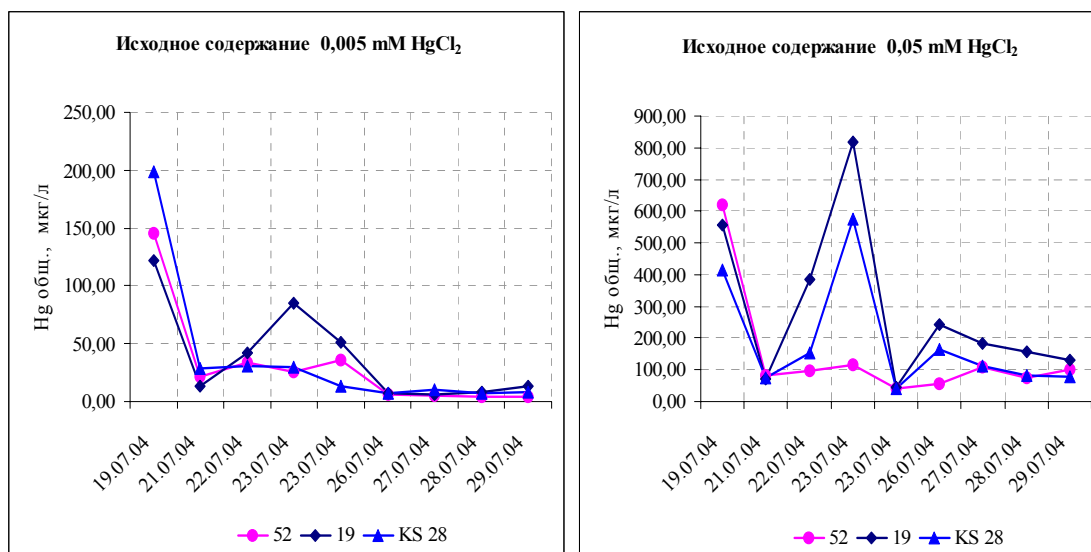


Рис.1. Динамика изменения концентрации Hg_{общ.} в растворах, выходящих из реактора с иммобилизованными на керамзите аэробными бактериями при температуре +20 – +22°C при замене ежедневно 150 мл раствора и аэрации 1 л воздуха в минуту

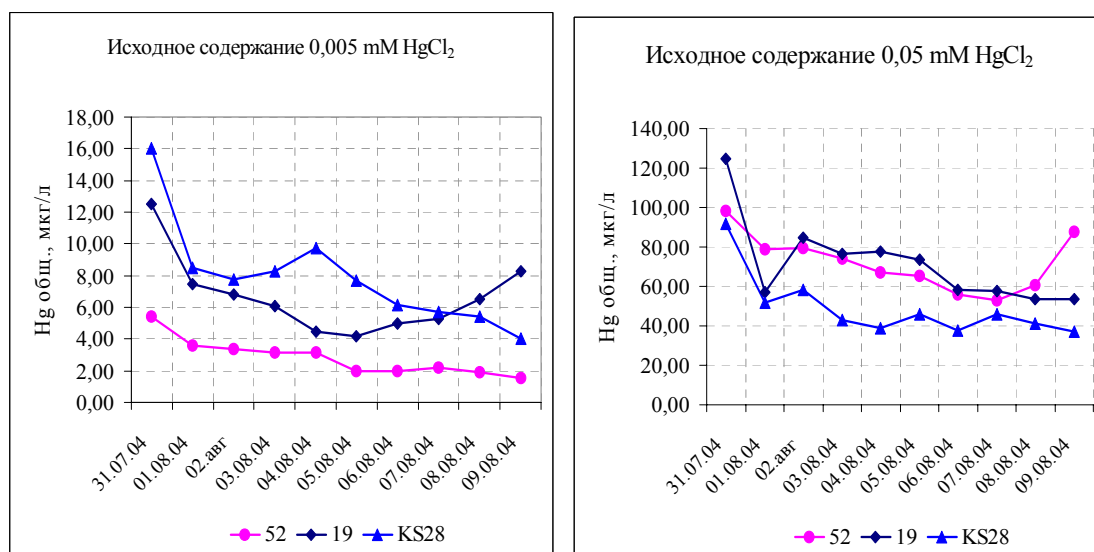


Рис.2. Динамика изменения концентрации Hg_{общ.} в растворах, выходящих из реактора с иммобилизованными на керамзите аэробными бактериями при температуре +20 – +22°C при замене ежедневно 300 мл раствора и аэрации 0,3 л воздуха в минуту

Изучение возможности использовать аэробные бактерии для очистки грунтовых вод от ртути при температуре +4°C показало, что наиболее эффективно в условиях пониженных температур работает штамм №52, у которого стабилизация процесса поглощения ртути отмечена уже через сутки после начала эксперимента при ежедневной замене 0,5 объема реактора (рисунок 3).

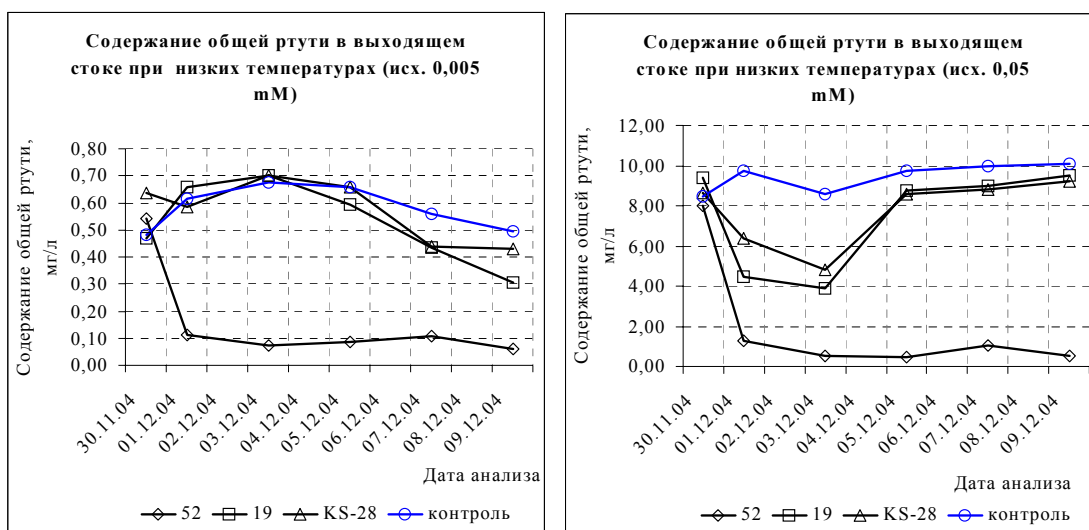


Рис.3. Содержание ртути в выходящих из реактора растворах в лабораторном эксперименте с аэробными бактериями при температуре +4°C

Следующим этапом эксперимента было изучение скорости поглощения ртути аэробными бактериями при температуре +4°C и ежедневной замене всего объема стока в реакторе.

Результаты работы показали, что аэробные устойчивые к ртути бактерии способны активно расти и поглощать ртуть при температуре +4°C (рисунок 4). Наиболее эффективным в поглощении ртути оказался штамм № 52.

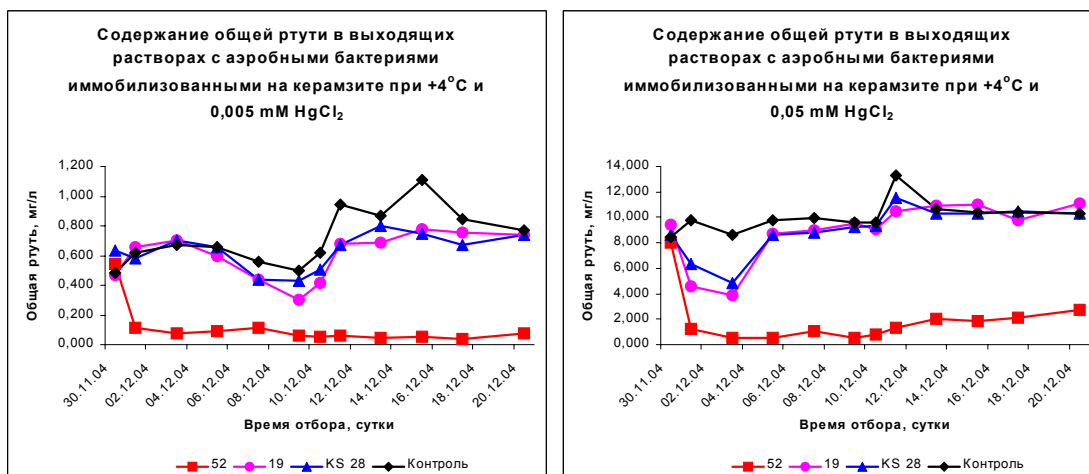


Рисунок 4. Содержание $Hg_{общ}$ (мг/л) в выходящем стоке в эксперименте с аэробными бактериями, иммобилизованными на керамзите при температуре +4°C и ежедневной полной замене растворов

Полученные данные свидетельствуют о том, что исследуемые аэробные бактерии можно использовать для очистки загрязненных ртутью грунтовых вод, где преобладают низкие температуры.

Эксперименты с СРБ, устойчивыми к ртути, позволили обнаружить, что бактерии могут использовать как лактат, так и ацетат и продуцируют H_2S в количествах, достаточных для связывания испытанных концентраций ртути.

Наиболее подходящим сорбентом для иммобилизации СРБ оказалось синтетическое волокно. На синтетическом волокне СРБ хорошо иммобилизовывались как при росте с лактатом, так и с ацетатом и количество образованного сероводорода было сходным в присутствии различных концентраций HgCl_2 . СРБ при $+4^\circ\text{C}$ образуют меньшее количество H_2S , чем при росте при температуре $+18-20^\circ\text{C}$. В то же время этого количества H_2S достаточно для эффективного осаждения ртути.

При росте СРБ в среде с ацетатом практически вся ртуть выпадает в осадок, тогда как при их росте в среде с лактатом, несмотря на высокое содержание H_2S в культуральной жидкости, обнаруживается $\text{Hg}_{\text{общ}}$. Анализ содержания метиловой ртути (MeHg) в культуральной жидкости показал, что MeHg образуется в культуральной жидкости при росте СРБ с лактатом. Это позволяет говорить о том, что при использовании данных штаммов СРБ для очистки грунтовых вод от ртути необходимо выращивать их с использованием ацетата в качестве источника органического вещества.

Моделирование процесса очистки ртутьсодержащих стоков в лабораторных экспериментах с использованием СРБ, иммобилизованных на синтетическом волокне, и внесение в ртутьсодержащий сток ацетата, показало, что при скорости протока, сходной со скоростью движения грунтовых вод в пригороде Павлодара, процесс осаждения ртути СРБ идет хорошо и содержание растворимой ртути при выходе из реактора ниже значений предельно допустимых концентраций (рисунок 5, 6). Сходные результаты были получены и при моделировании процесса осаждения ртути при $+4^\circ\text{C}$.

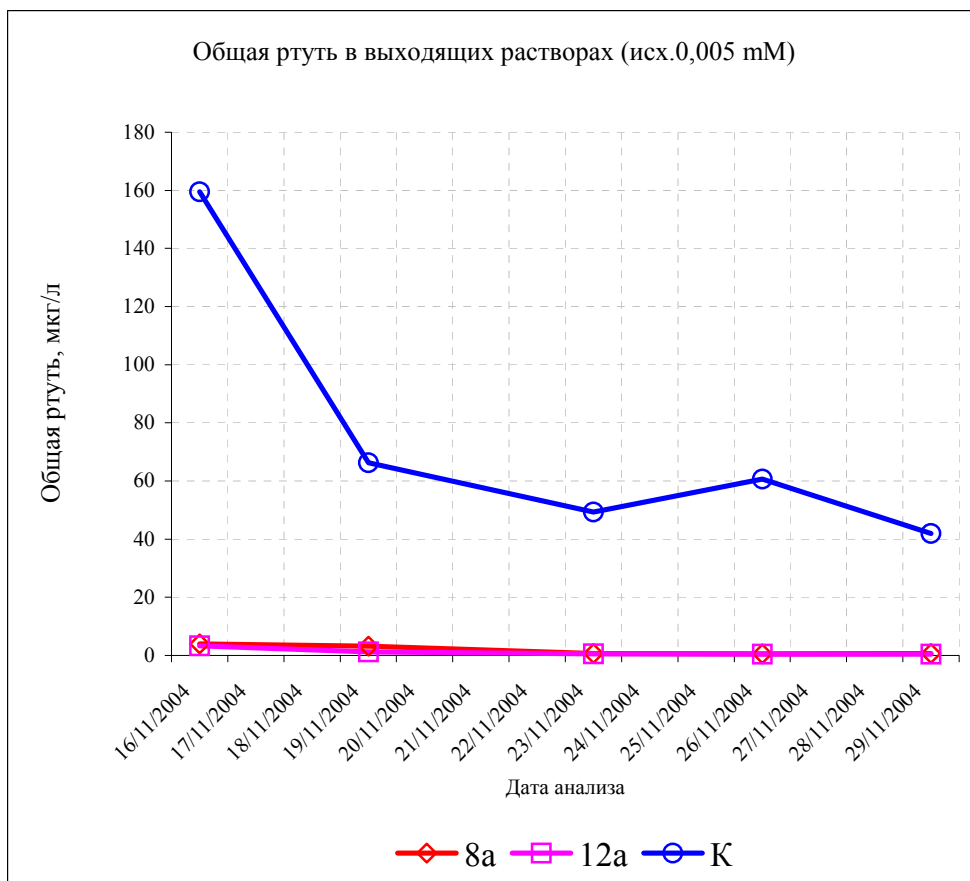


Рис. 5. Содержание общей ртути в выходящих растворах в лабораторном эксперименте при +18 –20°C с СРБ, иммобилизованными на синтетическом волокне (объем раствора в реакторе 500 мл, замена раствора по 50 мл 1 раз в трое суток, в контроль не добавляли СРБ)

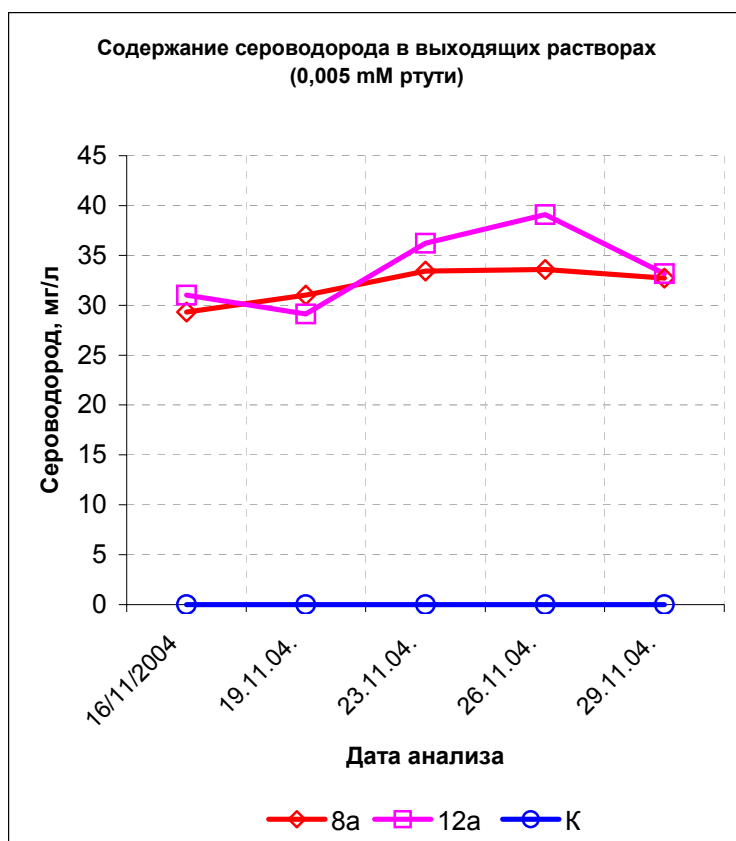


Рисунок 6. Содержание сероводорода в выходящих растворах в лабораторном эксперименте при +18 – 20°C с СРБ штаммы 8a и 12, иммобилизованными на синтетическом волокне (объем раствора в реакторе 500 мл, замена раствора по 50 мл 1 раз в трое суток, в контроль не добавляли питательную среду)

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что исследуемые штаммы СРБ способны расти при температурах +4°C и +18-20°C в среде с ацетатом и образовывать H₂S в количестве, достаточном для связывания растворимой ртути в сульфиды ртути и эти бактерии можно рекомендовать для использования в биотехнологии очистки грунтовых вод от растворимой ртути так как в таких условиях метиловая ртуть практически не образуется.

Весьма поучительными оказались результаты, полученные с факультативно-анаэробными бактериями *Citrobacter freundii*. Факультативно-анаэробные бактерии продуцируют H₂S при росте с тиосульфатом в анаэробных условиях в присутствии различных испытанных концентраций HgCl₂ в количестве, достаточном для образования осадка сульфида ртути. Однако в культуральной жидкости было обнаружено достаточно высокое содержание Hg_{общ.}, что свидетельствовало о присутствии в растворе или MeHg, или растворимых полисульфидов.

Результаты химического анализа показали, что MeHg в культуральной жидкости отсутствует. Это позволяет предполагать, что обнаруживаемая в культуральной жидкости ртуть является следствием образования растворимых полисульфидов при росте факультативно-анаэробных бактерий с тиосульфатом. Факт появления растворимых форм ртути в анаэробных условиях в присутствии H₂S является очень важным, так как развитие таких процессов в природной среде при наличии необходимых условий создает риск загрязнения грунтовых и поверхностных вод растворимыми соединениями ртути.

ЛИТЕРАТУРА

1. Obuekwe C.O., Westlake D.W.S. Effect of reducible compounds (potential electron acceptors) on reduction of ferric iron by *Pseudomonas* species // *Microbial Lett.*- 1982.- V.19, № 74.- P.57-62.
2. By Russ Moya A., Man Y.M., Keith S.M., Herbert R.A. The dual role of nitrate as nitrogen source and electron acceptor for the growth of sulphate reducing bacteria // *J. Appl.Bacteriol.*- 1983.- V.55, № 3.- P.270.
3. Castignetti D., Hollocher I.C. Heterotrophic nitrification among denitrifications // *Appl.and Environ.Microbiol.* - 1984.- V.47.- No 4.- P.620.
4. Jones J.G., Davison W., Gardener S. Iron reduction by bacteria range of organisms involved and metal reduced // *FEMS Microbiol. Lett.*-1984.-V.21, №1.- P.133-136.
5. Ottow J.C.G., Fabig W. Einflub der Sauerstoffbegasung auf die Denitrifikationsintensitat (aerobe Denitrification) und das redoxniveau unterschiedlicher Bakterien // *Landwirt. Forsch.*- 1985.- Sonder. Nr.41.- S.453-470.
6. Wakatsuki Tohru. Metal oxidoreduction by microbial cells // *J. Ind.Microbiol.*-1995.-V.14, №2.-C.169-177
7. Lovley D.R. Bioremediation of organic and metal reduction // *J. Ind. Microbiol.*-1995.-V.14, №2, C.85-93
8. Clark P.D. Studies of the storage of sulfur in underground repositories // *Alberta Sulfur Research LTD.*, 2003.