

Научная статья
УДК 579.22, 579.26
doi:10.37614/2949-1215.2024.15.1.030

БАКТЕРИАЛЬНОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ХРОМАТОВ. ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НОВЫХ ШТАММОВ В СИСТЕМАХ БИООЧИСТКИ

Александр Викторович Игнатенко¹, Татьяна Владимировна Хижняк²

^{1,2}Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

¹ignatenko5aiav@gmail.com

²tanya_khijniak@mail.ru

Аннотация

Представлены результаты исследования нового хроматвосстанавливающего штамма бактерии рода *Salisediminibacterium* MB1000, выделенного из осадков солёных щелочных озёр Кулундинской степи (Алтайский край). Определены оптимальные условия роста и восстановления хромата в зависимости от температуры, pH среды, солёности и соотношения солей. Показана возможность масштабирования процесса хроматредукции в лабораторном биореакторе. Рассчитана средняя скорость процесса восстановления хромата.

Ключевые слова:

хром, биоредукция, *Salisediminibacterium*

Финансирование:

работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Для цитирования:

Игнатенко А. В., Хижняк Т. В. Бактериальное восстановление хроматов. Возможность применения новых штаммов в системах биочистки // Труды Кольского научного центра РАН. Серия: Технические науки. 2024. Т. 15, № 1. С. 189–195. doi:10.37614/2949-1215.2024.15.1.030.

Original article

BACTERIAL REDUCTION OF CHROMATE. APPLICATION OF NEW STRAINS IN THE BIOREMEDIATION SYSTEMS

Alexandr V. Ignatenko¹, Tatiana V. Khijniak²

^{1,2}Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Centre of Biotechnology of RAS, Moscow, Russia

¹ignatenko5aiav@gmail.com

²tanya_khijniak@mail.ru

Abstract

This paper presents the results of a study of a new chromate-reducing strain of the bacterium genus *Salisediminibacterium* MB1000 isolated from sediments of salt alkaline lakes of the Kulunda steppe (Altai, Russia). Optimal conditions for growth and chromate reduction have been determined depending on temperature, pH of the medium, salinity and salt ratio. The possibility to scale up the chromate reduction process in a laboratory bioreactor is shown. The average speed of the chromate reduction process is calculated.

Keywords:

chromium, bioreduction, *Salisediminibacterium*

Funding:

the work was carried out with the financial support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

For citation:

Ignatenko A. V., Khijniak T. V. Bacterial reduction of chromate. Application of new strains in the bioremediation systems // Transactions of the Kola Science Centre of RAS. Series: Engineering Sciences. 2024. Vol. 15, No. 1. P. 189–195. doi:10.37614/2949-1215.2024.15.1.030.

Введение

Хром — ценный поливалентный тяжёлый металл, широко используемый в промышленности. Основными потребителями выступают тяжёлое и среднее машиностроение, химическое и кожевенное производства [1]. Особенно важную роль хром играет в гальванических процессах, выступая важной добавкой, повышающей коррозионную стойкость сплавов. Основной природный источник хрома —

ультраосновные горные породы. Наиболее распространёнными минералами являются стихтит, крокоит, уваровит и группа хромшпинелидов-хромитов [2]. Согласно работе [3], общемировые подтверждённые запасы хромовых руд составляют 2,5 млрд т. Большая часть подтверждённых запасов сосредоточена в ЮАР (70 %), Казахстане (12,5 %) и Зимбабве (5,6 %). В мировом производстве товарной хромовой руды ведущую роль играет ЮАР (38,7 %), Индия (20,6 %) и Казахстан (17,6 %). При этом в России на рубеже 2000–2010 гг. ежегодно потреблялось более 1 млн т хромовой руды, при собственном производстве от 0,3 до 0,6 млн т в год. Образующийся дефицит покрывался импортом из Турции и Казахстана. Следовательно, технологии, связанные с обработкой и переработкой хромосодержащих руд, сплавов и материалов, должны быть направлены на минимизацию потерь хрома с отходами. По некоторым оценкам, ежегодно в мире образуется более 2 млн т хромосодержащих отходов [4].

Помимо экономических потерь при выбросах хромосодержащих отходов, соединения хрома являются токсичными для живых организмов [5–6]. В окружающей среде в зависимости от условий широко распространёнными являются стабильные шести- и трехвалентные формы хрома, наиболее токсичной и канцерогенной является шестивалентная (Cr (VI)), преобладающая в промышленных отходах. Образуя хорошо растворимые и устойчивые оксианионы $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ и $\text{Cr}_2\text{O}_4^{2-}$, Cr (VI) способен мигрировать с водными потоками, загрязняя обширные территории почв, водоёмов и грунтовых вод, в то же время соединения трёхвалентного хрома (Cr (III)) образуют малорастворимые и, следовательно, малоподвижные гидроксиды и связываются с минеральными компонентами почв. Всё это снижает токсичность соединений трёхвалентного хрома.

Реакция восстановления Cr (VI) до Cr (III) лежит в основе большинства методов очистки отходов и загрязнённых территорий, однако под действием восстановителей, таких как органические соединения, Fe (II), Mn (II) и др., Cr (III) способен окисляться в почвах и водоёмах до Cr (VI) [7]. Поэтому очистка загрязнённых территорий путём восстановления токсичного Cr (VI) без удаления загрязнённого материала не может гарантировать от вторичного загрязнения через некоторый промежуток времени. Особенно важным становится недопущение попадания любых соединений хрома в окружающую среду. Для этого необходимо развивать технологии очистки сточных вод и промышленных отходов непосредственно на предприятиях или центрах переработки отходов и стоков. Биологические методы являются одним из перспективных направлений в этой области [5, 8].

К настоящему моменту известно довольно много видов бактерий, восстанавливающих шестивалентный хром [5–6, 9]. При pH 6,5–8,5 можно отметить следующие виды: *Micrococcus roseus*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *D. vulgaris*, *Pseudomonas stutzeri*, *Ps. fluorescens*, *Ps. aurantiaca*, *Ps. aeruginosa*, *Ps. dechromaticans*, *Ps. putida*, *Escherichia coli*, *Agrobacterium radiobacter*, *Enterobacter cloacae*, *Aeromonas dechromatica*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *Shewanella oneidensis*, *Cellulomonas sp.*, *Acenobacter calcoaceticus*, *Halomonas aquamarina*. В щелочных солёных условиях список много короче: *Cellulosimicrobium funkei* AR8, *P. saccharolyticum* LY10, *Halomonas sp.* M-Cr, *Halomonas chromatireducens*, *Acinetobacter*, *Bacillus subtilis*.

В ходе наших предыдущих исследований из накопительной культуры нитратредуцирующих бактерий был выделен хроматвосстанавливающий штамм MB1000, относящийся к филогенетической ветви бацилл рода *Salisediminibacterium*, обитающих в щелочных солёных осадках водоёмов [10]. Выделенный организм оказался способен восстанавливать Cr (VI) в щелочных солёных условиях. Были определены морфология, филогенетическое положение, влияние органических компонентов среды на рост и развитие культуры, а также возможные субстраты — доноры электронов и состав образующегося в процессе культивирования хромосодержащего органоминерального осадка. Установлено, что увеличение концентрации дрожжевого экстракта в среде увеличивает как скорость роста и восстановления Cr (VI), так и максимальную возможную концентрацию последнего в среде. В частности, на минеральных средах с добавкой 100 мг/л дрожжевого экстракта культура восстанавливала до 30 мг Cr/л за 3 сут в анаэробных условиях, что выгодно отличает её от других описанных ранее штаммов.

Целью данной работы стало уточнение ключевых параметров среды (рН, температура культивирования, солёность и соотношение ключевых минеральных компонентов среды) и масштабирование процесса биоредукции Cr (VI) культурой *Salisediminibacterium* MB1000 в простейших биореакторах объёмом до 1 л в аэробных и анаэробных условиях.

Материалы и методы

При работе со штаммом MB1000 использовались те же методы, что и в вышедшей ранее работе [10]. Концентрацию Cr (VI) определяли дифенилкарбазидным методом, оптическую плотность раствора при длине волны 600 нм — на спектрофотометре Eppendorf BioSpectrometr basic. В экспериментах использовали пенициллиновые флаконы объёмом 20 мл. Объём жидкой питательной среды составлял 8 мл, объём инокулята, предварительно выращенного на хромсодержащей среде, — 0,08 мл. Для создания анаэробных условий пенициллиновые флаконы, закрытые резиновыми пробками, вакуумировали и продували аргоном. Эксперименты проводились в трёхкратной повторности с использованием химического и биологического контроля (кроме экспериментов по масштабированию).

Состав основных минеральных компонентов для сред, использованных во всех экспериментах, представлен в таблице. Непосредственно перед посевом в среды стерильно добавляли, г/л: K_2HPO_4 — 0,5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,1, NH_4Cl — 0,1, K_2CrO_4 — 0,0225, дрожжевой экстракт — 0,1, лактат — 1, микроэлементы по Пфеннигу — 2 мл [11].

При определении диапазона и оптимума температуры роста культуры и восстановления Cr (VI), культивирование проводили в термостатах при температурах 10, 15, 20, 26, 30, 37, 42, 46 и 55 °C в анаэробных условиях; рН среды — 9,7.

Состав основных минеральных компонентов сред с указанием эксперимента, где они применялись, общей солёности по Na^+ и соотношения $([Na_2CO_3] + [NaHCO_3])/[NaCl]$

Соль, г/л	рН (1 М по Na ⁺)	Температура (1,5 М по Na ⁺)	Солёность (состав для среды 1 М по Na ⁺)			
	Соотношение ([Na ₂ CO ₃] + [NaHCO ₃])/[NaCl]					
	0,20	0,20	0,05	0,25	0,75	1,50
Na ₂ CO ₃	13,00	19,50	3,66	13,83	25,79	32,89
NaHCO ₃	4,00	6,00	0,97	3,66	6,81	8,69
NaCl	50,00	75,00	53,79	40,70	25,30	16,13

При определении диапазона и оптимума рН среды для создания необходимых значений в приготовленную среду, исходно имеющую рН 9,8, контролируя по рН-метру, добавляли для подщелачивания раствор 2 М NaOH, для подкисления — 2 М HCl. Полученные среды имели рН на начало эксперимента: 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,4, 10,7 и 11. Культивирование проводили в анаэробных условиях при температуре 37 °C.

Эксперимент по определению оптимальной общей солёности и соотношения между карбонат/гидрокарбонат- и хлорид-ионами задумывался с целью поиска оптимального состава основных минеральных компонентов. Сомнения в оптимальности среды, использовавшейся для предыдущих экспериментов, основывались на значительном отличии её состава от природных рассолов, заливавших осадки, из которых штамм *Salisediminibacterium* MB1000 был выделен. В исследовании была проверена возможность роста и восстановления Cr (VI) при соотношениях $([Na_2CO_3] + [NaHCO_3])/[NaCl]$: 0,05, 0,25, 0,75, 1,5 и общей солёности для каждого из вариантов; 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 и 4 М по Na^+ . Для расчёта состава сред различной солёности в рамках одного соотношения основных минеральных солей рассчитанный состав солей для 1 М по Na^+ (см. табл.)

кратно увеличивали или уменьшали. Показатель pH приготовленных сред, при необходимости, доводили до значений 9,5–10 растворами 2 М HCl и 2 М NaOH. Культивирование проводили в анаэробных условиях при температуре 37 °С.

При масштабировании процесса хроматредукции была выбрана среда культивирования с соотношением $([\text{Na}_2\text{CO}_3] + [\text{NaHCO}_3])/[\text{NaCl}] = 0,75$, солёностью 1,5, pH 10, температура — 37 °С. Было опробовано два варианта культивирования: накопительный и отливно-доливной. В первом в герметично закрытую бутылку объёмом 1 л (объём среды — 0,750 л) по мере восстановления акцептора электронов (хромата) добавляли свежую порцию концентрата K_2CrO_4 . В этом случае газообмена с окружающей средой не происходило и все продукты метаболизма накапливались в среде. Второй вариант: из литровой бутылки (объём среды — 0,800 л) по мере восстановления Cr (VI) проводили слив 200 мл культуральной жидкости с осадком после активного взмучивания, затем добавляли 200 мл свежей среды, содержащей хромат, при этом происходил газообмен с окружающей средой.

Результаты исследований

Результаты определения диапазона и оптимума роста культуры и восстановления Cr (VI) в зависимости от температуры и pH представлены ниже (рис. 1). Как следует из полученных результатов, штамм MB1000 способен расти и восстанавливать Cr (VI) при температуре от 20 до 46 °С и pH от 8 до 10,7. Оптимальными можно считать температуру около 37 °С и pH 9–10.

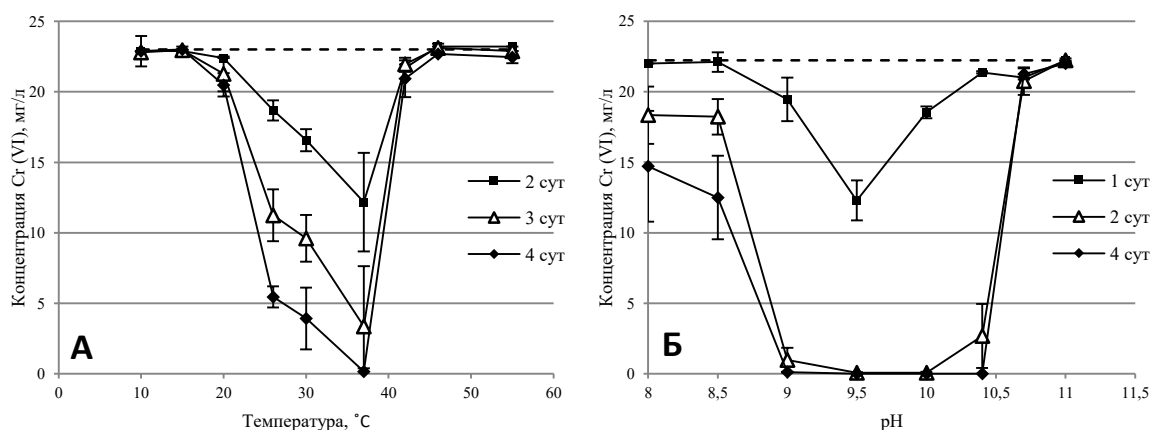


Рис. 1. Диапазон и оптимум роста штамма *Salisediminibacterium* MB1000 и восстановления Cr (VI) в зависимости от температуры (А) и pH (Б). Пунктиром обозначена начальная концентрация Cr (VI) в среде

Проведённые исследования по определению соотношения основных минеральных солей и общей солёности среды показали, что штамм MB1000 способен развиваться в широком диапазоне условий (рис. 2). Из полученных данных следует, что для восстановления Cr (VI) и роста культуры строго необходимо наличие в среде достаточного количества карбонатов. Так, при соотношении $([\text{Na}_2\text{CO}_3] + [\text{NaHCO}_3])/[\text{NaCl}]$, равном 0,05, роста культуры не наблюдали во всём исследованном диапазоне общей солёности. При увеличении доли карбонат- и гидрокарбонат-ионов до 0,25 рост бациллы и восстановление хромата наблюдали в диапазоне солёности от 1 до 3 М по Na^+ с оптимумом от 2 до 2,5 М.

Дальнейшее увеличение доли этих солей способствует расширению диапазона возможной для существования культуры солёности. При культивировании более 4 сут штамм *Salisediminibacterium* MB1000 был способен полностью восстанавливать исходные 22,5 мг Cr/л во всём диапазоне солёности больше 1 М по Na^+ в среде с соотношением $([\text{Na}_2\text{CO}_3] + [\text{NaHCO}_3])/[\text{NaCl}]$, равном 1,5 (см. рис. 2).

Эксперимент по созданию процесса восстановления Cr (VI) в лабораторных биореакторах показал возможность эффективного использования нового штамма *Salisediminibacterium* MB1000 и дальнейшего масштабирования как в аэробных, так и в анаэробных условиях.

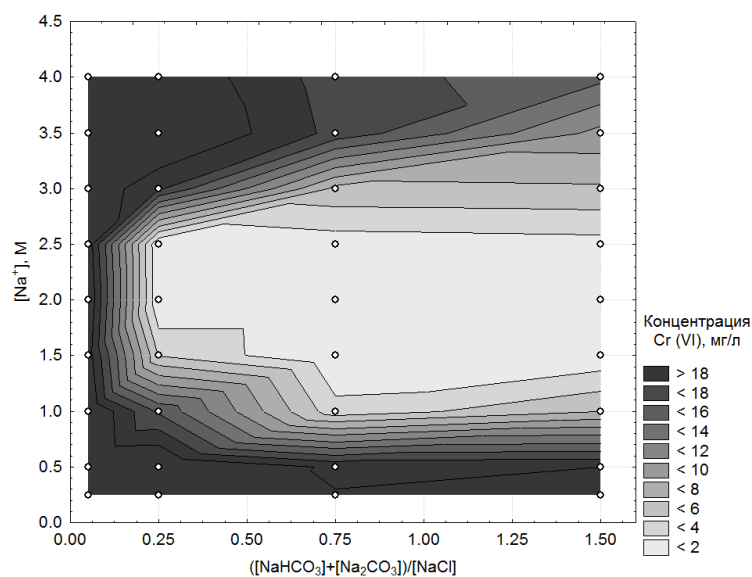


Рис. 2. Диаграмма концентрации Cr (VI) на вторые сутки культивирования в средах с различной солёностью по Na^+ и соотношением $([\text{Na}_2\text{CO}_3] + [\text{NaHCO}_3])/[\text{NaCl}]$. Диаграмма построена с помощью программы Statistica с использованием алгоритма 3D Wafer Plot. Изолинии построены с шагом 2 мг Cr/л. Узловыми точками отмечены полученные экспериментальные данные

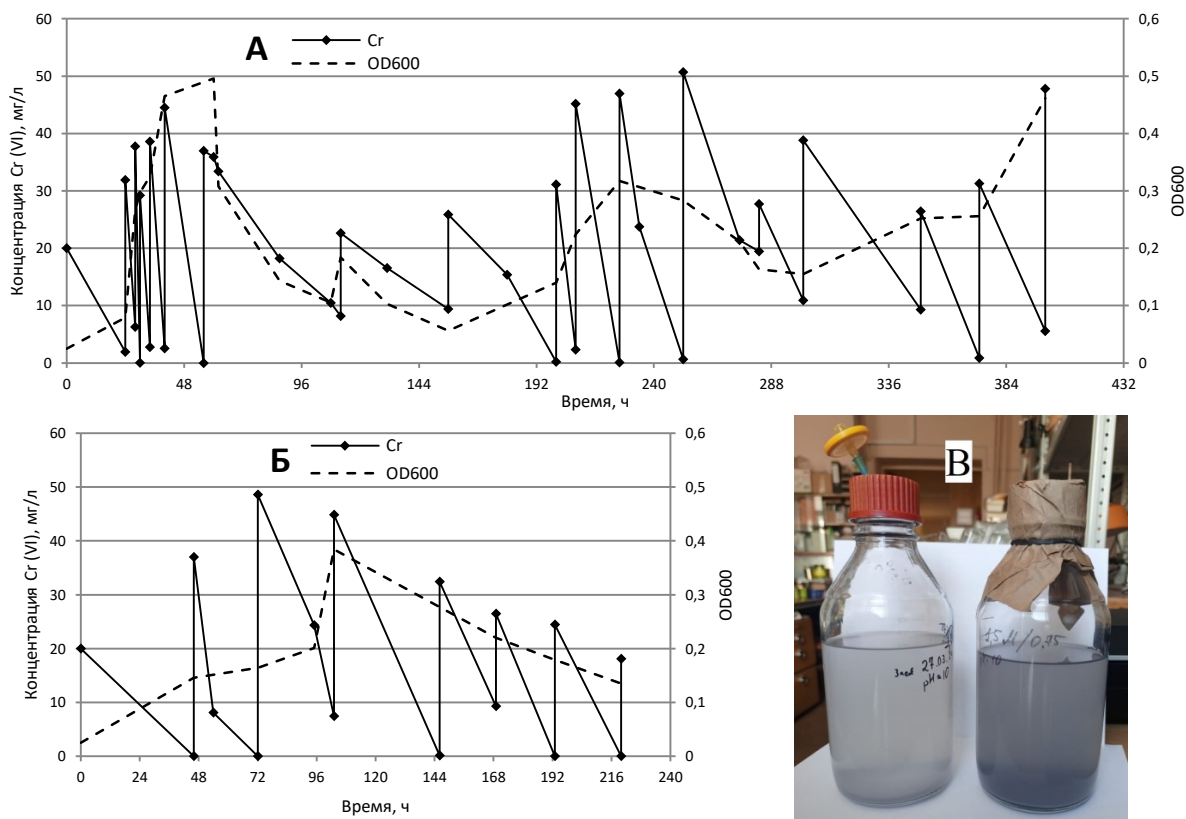


Рис. 3. Динамика роста и восстановления Cr (VI) в лабораторных биореакторах:
А — анаэробный накопительный биореактор; Б — аэробный отливно-доливной биореактор;
В — общий вид биореакторов накопительного (справа) и отливно-доливного (слева)

В накопительном анаэробном биореакторе удалось поддерживать жизнеспособность и активный процесс хроматредукции более 400 ч (рис. 3А). Суммарно, с момента начала эксперимента, культура восстановила 572 мг Cr (VI). Средняя скорость восстановления составила 1,90 мг Cr/л·ч. Максимальная скорость в момент активного роста, близкого к экспоненциальному, между 24 и 40 ч культивирования достигала 8,59 мг Cr/л·ч. Добавление концентрата в различных количествах показало, что при условии наличия всех необходимых для жизнедеятельности компонентов процесс способен идти до концентраций 50,7 мг Cr/л. Отметим, что после затормаживания процесса после 56 ч культивирования в среду были дополнительно внесены: лактат 1 г/л на 62 ч; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1 г/л на 87 ч; K_2HPO_4 — 0,5 г/л на 108 ч; NH_4Cl — 0,1 г/л на 131 ч; микроэлементы по Пфеннигу — 2 мл/л на 156 ч. Однако действенный эффект оказало внесение дрожжевого экстракта из расчёта 0,1 мг/л на 180 ч культивирования. Позднее была сделана ещё одна добавка дрожжевого экстракта 0,05 мг/л на 283 ч культивирования. Важно отметить увеличение биомассы, о чём можно судить исходя из увеличения значений оптической плотности, и ускорение процесса хроматредукции после внесения дрожжевого экстракта. Наблюдается прямая корреляция между скоростью восстановления Cr (VI) и количеством биомассы. Восстановленный хром выпадает в осадок, который скапливается на дне (см. рис. 3В). Результаты микроскопии и рентгеновского микроанализа осадка совпадают с полученными нами ранее при культивировании культуры в пенициллиновых флаконах [11].

Аэробный реактор проработал в отливно-доливном режиме на момент написания статьи 220 ч. За время работы культура восстановила 212 мг Cr (VI). Средняя скорость восстановления составила 1,2 мг Cr/л·ч. Несмотря на более скромные показатели по скорости восстановления хромата, при данном варианте культивирования не наблюдается резких скачков в объёмах биомассы и система не требует дополнительного внесения компонентов среды для поддержания процесса хроматредукции.

Выводы

Полученные результаты указывают на высокую перспективность использования нового штамма *Salisediminibacterium* MB1000 для создания систем биоочистки щелочных стоков, содержащих хромат. Адаптационные возможности исследованных бактерий позволяют применить их в широком диапазоне условий и подстроиться под конкретные технологические задачи.

Список источников

1. Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: A review / B. Dhal [et al.] // J. Hazardous Materials. 2013. Vol. 250–251. P. 272–291.
2. Геология металлических полезных ископаемых: учеб. пособие / Э. А. Высоцкий [и др.]. Минск: ТетраСистемс, 2006. 336 с.
3. Хромитоносные провинции и месторождения хромовых руд России / В. И. Николаев [и др.] // Минеральное сырьё. 2021. № 43. С. 185.
4. Водяницкий Ю. Н. Тяжёлые и сверхтяжёлые металлы и металлоиды в загрязнённых почвах. М., 2009. 182 с.
5. Recent bioreduction of hexavalent chromium in wastewater treatment: A review / D. Pradhan [et al.] // J. Industrial and Engineering Chemistry. 2017. Vol. 55. P. 1–20.
6. Chromium pollution and its bioremediation mechanisms in bacteria: A review / B. Pushkar [et al.] // J. Environmental Management. 2021. Vol. 287. P. 112279.
7. A review of the formation of Cr (VI) via Cr (III) oxidation in soils and groundwater / J. Liang [et al.] // Science of the Total Environment. 2021. Vol. 774. P. 145762.
8. Metabolic pathway of Cr (VI) reduction by bacteria: A review / N. N. Ramli [et al.] // Microbiological Research. 2023. Vol. 268. P. 127288.
9. Chen J., Tian Y. Hexavalent chromium reducing bacteria: mechanism of reduction and characteristics // Environmental Science and Pollution Research. 2021. Vol. 28. P. 20981–20997.
10. Ignatenko A. V., Khizhnyak T. V. A new haloalkaliphilic member of the genus *Salisediminibacterium* capable of efficient chromate reduction // Microbiology. 2024. Vol. 93, No. 2. P. 163–166.
11. Pfenning N., Lippert K. D. Über das vitamin B12-bidurfnis phototropher schwefelbacteien // Arch. Microbiol. 1966. Bd 55, No. 3. P. 245–256.

References

1. Dhal B., Thatoi H. N., Das N. N., Pandey B. D. Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 2013, Vol. 250–251, pp. 272–291.
2. Vysotskii E. A., Gubin V. N., Il'kevich G. I., Shtefan L. V. *Geologiya metallicheskih poleznykh iskopaemykh* [Geology of Metallic Mineral Wealth]. Minsk, Tetra-Sistems, 2006, 336 p.
3. Nikolaev V. I., Kazennova A. D., Nikol'skaya N. E., Sergeev N. S., Samkov V. S., Dolgushin S. S., Serzhantov N. F. Hromitonosnye provincii i mestorozhdeniya hromovykh rud Rossii [Chromite-bearing provinces and chromium ore deposits in Russia]. *Mineral. Syr'e* [Mineral raw materials], 2021, No. 43, pp. 185. (In Russ.).
4. Vodyanitskii Yu. N. *Tyazhelye i sverkhtyazhelye metally I metalloidy v zagryaznennykh pochvakh* [Heavy and Superheavy Metals and Metalloids in Polluted Soils]. Moscow, 2009, 182 p.
5. Pradhan D., Sukla L. B., Sawyer M., Rahman P. K. Recent bioreduction of hexavalent chromium in wastewater treatment: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2017. Vol. 55, pp. 1–20.
6. Pushkar B., Sevak P., Parab S., Nilkanth N. Chromium pollution and its bioremediation mechanisms in bacteria: A review. *Journal of Environmental Management*, 2021. Vol. 287, pp. 112279.
7. Liang J., Huang X., Yan J., Li Y., Zhao Z., Liu Y., Ye J., Wei Y. A review of the formation of Cr (VI) via Cr (III) oxidation in soils and groundwater. *Science of the Total Environment*, 2021, Vol. 774, pp. 145762.
8. Ramli N. N., Othman A. R., Kurniawan S. B., Abdullah S. R. S., Hasan H. A. Metabolic pathway of Cr (VI) reduction by bacteria: A review. *Microbiological Research*, 2023, Vol. 268, pp. 127288.
9. Chen J., Tian Y. Hexavalent chromium reducing bacteria: mechanism of reduction and characteristics. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, Vol. 28, pp. 20981–20997.
10. Ignatenko A. V., Khizhnyak T. V. A new haloalkaliphilic member of the genus *Salisediminibacterium* capable of efficient chromate reduction. *Microbiology*, 2024, Vol. 93, No. 2, pp. 163–166.
11. Pfenning N., Lippert K. D. Uber das vitamin B12-bidurfnis phototropher schwefelbacteien. *Archives of Microbiology*, 1966, Bd 55, No. 3, pp. 245–256.

Информация об авторах

А. В. Игнатенко — аспирант, младший научный сотрудник;

Т. В. Хижняк — доктор биологических наук, главный научный сотрудник.

Information about the authors

A. V. Ignatenko — Postgraduate Student, Junior Researcher;

T. V. Khijniak — Dr. Sc. (Biology), Chief Researcher.

Статья поступила в редакцию 07.04.2024; одобрена после рецензирования 10.04.2024; принята к публикации 12.04.2024.

The article was submitted 07.04.2024; approved after reviewing 10.04.2024; accepted for publication 12.04.2024.