

ПОСЛІДОВНІСТЬ ВІДНОВЛЕННЯ ХРОМУ (VI) ТА НІТРАТУ В МЕМБРАННОМУ БІОРЕАКТОРІ

Досліджено послідовність відновлення шестивалентного хрому та нітрату в мембранному біореакторі діалізного типу з іммобілізованими клітинами. Показано, що за одночасної присутності Cr(VI) та нітрату в розчині першим починає відновлюватись Cr(VI). Зниження концентрації нітрату починається лише в присутності залишкових концентрацій хромату. Встановлено, що редокс-послідовність відновлення хроматів та нітратів бактеріями підлягає електрохімічним закономірностям: першим відновлюється елемент, стандартний електродний потенціал редукції якого вищий. Показано можливість ефективного проведення двох окисно-відновних процесів у мембранному біореакторі діалізного типу шляхом розділення процесів редукції по обидва боки мембрани. При іммобілізації клітин із обох боків мембрани процеси хроматоредукції та денітрифікації протікають одночасно з активного та приймального боків мембрани відповідно.

Нітрат та хромат - поширені забруднення, що згубно впливають на здоров'я людини. Найвні технології очистки води від оксіаніонів, таких, як нітрат та хромат (біхромат), поділяють на дві основні групи: фізико-хімічні та біологічні [1]. До фізико-хімічних процесів, що широко використовуються, належать іонний обмін, електродіаліз, нанофільтрація та зворотний осмос. Однак, на відміну від фізико-хімічних процесів, де забруднення лише переходять в інший стан або концентруються, біологічна редукція може забезпечити повне видалення їх із води. Останнім часом значного розповсюдження набули мембранні біореактори [2-8]. Такі технології поєднують у собі і біологічні, і фізико-хімічні методи очистки води. Мембрана у таких біореакторах може бути як носієм для мікроорганізмів, так і виконувати розділювальну функцію. Чимало праць останніх років присвячено саме розробці мембранних біореакторів для денітрифікації [4-7]. Антропогенно забруднені екониші, як правило, містять кілька мінеральних компонентів, здатних слугувати бактеріям термінальними акцепторами електронів при диханні. Дослідниками показано можливість одночасного видалення з води перхлорату та нітрату за допомогою процесів, що протікають в іонообмінному мембранному біореакторі [8].

Здатності бактерій використовувати різні елементи зі змінним ступенем окиснення як термінальні акцептори електронів приділяється дедалі більше уваги. Зокрема, вивчено хромат-редукцію псевдомонадами, виділеними з ділянок, за-

бруднених хроматами, арсенатами та міддю [9]. Виділені штами були толерантні до Cr(VI) у концентрації до 520 мг/л і відновлювали хромат у присутності міді та арсенату, при цьому швидкість редукції залежала як від природи другого забруднення, так і від його концентрації. В анаеробних умовах штами також частково відновлювали Co(III) та U(VI). Описано кінетику редукції Cr(VI) щодо сульфат та нітрат редукції в мікроаеробних умовах [10]. Дослідження показали, що бактеріальний консорціум, виділений із навколишнього середовища, редукує Cr(VI) двома різними фізіологічними групами: анаеробними сульфатредукуючими бактеріями та факультативними анаеробами. Сульфатредукуючі бактерії були активні в мікроаеробних умовах. Накопичення сульфідів відбувалось лише після повного використання хромату та нітрату. За відсутності сульфат-редукції хроматредукція супроводжувалась денітрифікацією.

На основі результатів, отриманих іншими дослідниками, а також власних експериментальних даних [11], зроблено припущення, що послідовність відновлення змінновалентних елементів мікроорганізмами за їх одночасної присутності в середовищі підпорядковується електрохімічним закономірностям: у першу чергу відновлюються ті хімічні елементи, стандартний електродний потенціал редукції яких вищий.

Метою цього дослідження є вивчення послідовності відновлення нітрату та шестивалентного хрому за їх одночасної присутності в середовищі денітрифікуючими бактеріями та визначення

параметрів одночасного проведення денітрифікації та хроматредукції у мембранному біореакторі діалізного типу.

1. Матеріали і методи

1.1. Живильні середовища і мікроорганізми

У роботі було використано денітрифікуючі штами бактерій роду *Pseudomonas*: *P. aeruginosa* PI, *P. fluorescens var. pseudo-iodinum* PI 1, *P. mendocina* P13 та *P. stutzeri* P19 із колекції мікроорганізмів відділу мікробіології очистки води ІКХХВ НАН України.

Посівну культуру бактерій вирощували на повноцінному агаризованому середовищі МПА (Serva) в чашках Петрі за температури 28 °С.

Для вивчення процесів денітрифікації та хроматредукції використовували сольове середовище М9 (Fluka) з мікроелементами такого складу (г/дм³): КН₂Р₀₄ - 3; Na₂НР₀₄ - 6; NH₄Cl - 1; NaCl - 0,5; MgSO₄·7H₂O - 0,1; CaCl₂ - 0,1; 1 мл розчину мікроелементів, який містить (мг/дм³): FeSO₄·7H₂O - 25; MnSO₄·2H₂O - 5; CoSO₄ - 1; ZnSO₄ - 1; CuSO₄·6H₂O - 0,1; H₃B₀₃ - 0,1; Na₂MoO₄ - 25; NiCl₂·6H₂O - 0,1.

Як джерело вуглецю використовували етанол (1 г/дм³). Акцепторами електронів слугували такі речовини: КN₀₃ з концентрацією N₀₃ від 0,5 до 1 г/дм³ та K₂Cr₂O₇ з концентрацією Cr⁶⁺ 10-15 мг/дм³.

Динаміку процесів денітрифікації та хроматредукції вільноплаваючими бактеріями визначали у плоскодонних колбах об'ємом 100 см³ за температури 28 °С. Посівний матеріал із чашок знімали мікробіологічною петлею та стерильно вносили у модельний розчин до концентрації 250-5-300 мг/дм³. Оптичну густину суспензії вимірювали колориметрично при 540 нм у кюветках 5 мм. Поверхню культурального середовища заливали шаром стерильного вазелінового масла завтовшки 2 см. Процеси проводили в замкнутій системі культивування.

1.2. Методи іммобілізації бактерій

Включення клітин у гелі агар-агару. Клітини мікроорганізмів іммобілізували в плівках із агар-агару. Плівки формували на робочій поверхні промислових ультрафільтраційних целюлозних мембран Microdin-Nadir C005F та C030F, що мають cut-off 5000 та 30000 відповідно.

1%-ий розчин агар-агару охолоджували до температури 40-50 °С. Суспензію клітин у фізіологічному розчині змішували з таким же об'ємом розчину агар-агару. Отриману суспензію виливали на мембрани, рівномірним шаром розподіляли по поверхні за допомогою щільної

фільери (товщина шару 300 мкм) та залишали на деякий час для затвердіння.

1.3. Використання діалізного режиму

Денітрифікацію та хроматредукцію проводили у діалізній комірці, яка має конструкцію динамічного типу. Об'єм камер дорівнював 130 см³. Камери розділені між собою вертикально закріпленою досліджуваною мембраною. Площа мембрани становила 25·10⁻⁴ м². Робоча сторона мембрани з іммобілізованими на ній мікроорганізмами була в активній частині біореактора. Між камерами і мембраною розміщено гумові ущільнюючі прокладки. Модельний розчин готували на основі сольового середовища М9 і заливали в обидві камери. В одну з камер додавали етиловий спирт як донор електронів, нітрат і хромат як акцептори електронів. Кисень із розчину не видаляли. Водну поверхню обох камер заливали шаром стерильного вазелінового масла завтовшки 2 см.

Для проведення процесу використовували денітрифікуючу культуру *P. fluorescens var. pseudo-iodinum*.

1.4. Аналітичні методи

Концентрацію шестивалентного хрому визначали фотоколориметрично з дифенілкарбазидом при довжині хвилі 540 нм.

Концентрацію нітрату вимірювали за допомогою системи капілярного електрофорезу Капель 103 Р.

2. Результати та їх обговорення

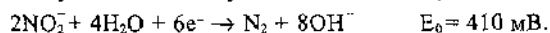
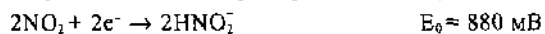
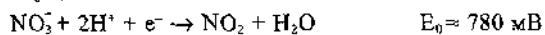
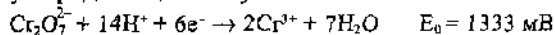
2.1. Дослідження послідовності відновлення Cr(VI) та нітрату денітрифікуючими бактеріями роду *Pseudomonas* за їх одночасної присутності в середовищі культивування.

З огляду на аналіз літератури зроблено припущення, що послідовність відновлення елементів зі змінним ступенем окиснення мікроорганізмами за їх одночасної присутності в середовищі підпорядковано електрохімічним закономірностям: у першу чергу редукуються ті хімічні елементи, стандартний електродний потенціал реакцій відновлення (E°) яких вищий [12].

У процесі аналізу стандартних електродних потенціалів відновлення окиснених сполук азоту зроблено припущення, що перша стадія денітрифікації (N₀₃— >N₀₂) відбувається у дві реакції: на першому етапі утворюється оксид чотиривалентного азоту, на другому - нітрит-іон, відновлення останнього до елементного азоту проходить, ймовірно, відповідно до реакції, E° якої дорівнює 410 мВ. Стандартний електродний

потенціал редукції Cr(VI) дорівнює 1333 мВ.

Таким чином, послідовність відновлення хромату та нітрату за одночасної присутності їх у середовищі має бути така:



Для підтвердження цього нами вивчено послідовність відновлення хроматів і нітратів за їх одночасної присутності в культуральному середовищі денітрифікуючими псевдомонадами. При цьому одночасно контролювали індивідуальні процеси відновлення нітратів і хроматів цими

культурами. Як видно з рис. 1, за присутності в середовищі або тільки нітрату (крива 2), або тільки хромату (крива 3), *P. fluorescens var. pseudo-iodinum* P-11 відновлює 200 мг/дм³ нітратів за 2 доби, а 10 мг/дм³ Cr(VI) - за 12 діб. Низька швидкість редукції Cr(VI) пояснюється його токсичною дією на неадаптовані колекційні штами бактерій. З біохімічної точки зору редукція хроматів - складний процес. Як видно з наведених окисно-відновних реакцій, для відновлення одного йона дихромату клітині потрібно «накопичити» та приєднати до нього 6 електронів та 14 протонів.

За одночасної присутності нітратів та хроматів у розчині (рис. 1) першим починає відновлюва-

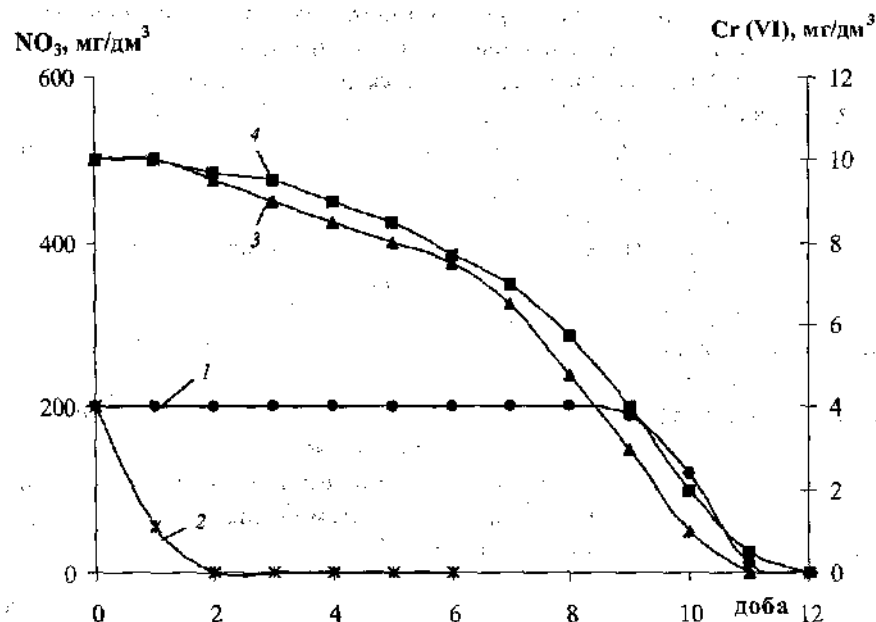


Рис. 1. Зміна концентрації Cr(VI) та NO₃ культурою *P. fluorescens var. pseudo-iodinum*: 1 - концентрація нітрату за наявності у середовищі Cr(VI), 2 - концентрація нітрату за відсутності Cr(VI), 3 - концентрація Cr(VI) за відсутності нітрату, 4 - концентрація Cr(VI) за наявності нітрату

тися Cr(VI) (крива 4). Лише після того, як концентрація Cr(VI) знижується до 3 мг/дм³, починається відновлення нітрату (крива 1). Зниження концентрації нітрату в присутності залишкових концентрацій хромату починається з 9-ї доби і досягає нульового значення за 4 доби культивування. Процеси одночасно завершуються на 12-ій добі. Тобто в культурі *P. fluorescens var. pseudo-iodinum* P-11 хроматредукція передуює денітрифікації. За відсутності Cr(VI) нітрат відновлюється за 2 доби. Як видно з кривих зміни концентрації Cr(VI), у присутності нітрату та без нього (криві 4 та 5) останній не впливає на швидкість хроматредукції.

Аналогічно поводити себе й решта денітрифікуючих псевдомонад: *P. aeruginosa* P1, *P. mendocina* P13 та *P. stutzeri* P19. *P. mendocina* P~13

починає відновлення нітрату, коли концентрація Cr(VI) знижується до 4,5 мг/дм³. Але інтенсивне зниження вмісту нітрату починається лише при зменшенні концентрації Cr(VI) до 2 мг/дм³.

P. aeruginosa та *P. stutzeri* P-19 відновлюють нітрат, коли концентрація Cr(VI) знижується до 0,5 мг/дм³, що спостерігається після 6-ї та 10-ї доби культивування відповідно, тоді як денітрифікація без Cr(VI) цими культурами відбувається протягом 2 діб.

Таким чином, проведені дослідження показують, що редукція шестивалентного хрому денітрифікуючими бактеріями передуює відновленню нітратів цими культурами. Швидкість хроматредукції не залежить від наявності в середовищі нітрат-іона. Отже, редокс-послідовність відновлення хроматів та нітратів бактеріями підпоряд-

ковується електрохімічним законам - першим відновлюється елемент, стандартний електродний потенціал редукції якого вищий.

3. Дослідження денітрифікації та хроматредукції у мембранному біореакторі

Метою цього дослідження є визначення параметрів проведення денітрифікації та хроматредукції у мембранному біореакторі, а також вивчення послідовності відновлення Cr(VI) і нітрату за одночасної присутності в середовищі культивування при діалізному режимі.

При використанні діалізного режиму у мембранному біореакторі внаслідок різниці концентрацій з обох боків мембрани виникає дифузійний потік крізь мембрану. За рахунок дифузійного потоку субстрат (етанол) і термінальний акцептор електронів (нітрат та хромат) безперервно підводяться до біокатализатора. Швидкість підведення залежить від швидкості дифузійного потоку, що, в свою чергу, залежить від концентрації забруднень та проникності мембрани. Проникність мембрани у цьому випадку визначається її початковим значенням cut off.

Завдяки іммобілізації велика кількість клітин концентрується на мембрані. В іммобілізованому стані клітини проявляють високу біокаталітичну активність, а також стають більш захищеними від токсичної дії забруднень.

Для ефективного проведення біологічних процесів у діалізному режимі необхідно, щоб швидкості редукції та дифузії були приблизно однакові. В такому випадку редукція має відбуватися повністю на біоплівці мембранного біореактора

і забруднення не повинно потрапляти в приймальну частину біореактора.

Як видно з рис. 2, за одночасної присутності Cr(VI) і нітрату в активній частині біореактора спершу відновлюється Cr(VI). Його концентрація в активній частині біореактора знижується практично лінійно протягом 60 год культивування, а в приймальній частині - не перевищує 0,5 мг/л. Водночас відбувається дифузія нітрату в приймальну частину біореактора. Процес денітрифікації починається на 40-й годині при досягненні концентрації хрому 4 мг/л. Хроматредукція та денітрифікація тривають 120 годин і завершуються зниженням вмісту Cr (VI) та NO₃ до нульових значень.

Для визначення впливу йонів шестивалентного хрому на відновлення нітрату досліджено також процес денітрифікації у мембранному біореакторі бактеріями роду *Pseudomonas fluoresces var. pseudo-iodinum*, іммобілізованими з активного боку мембрани, за відсутності йонів Cr (VI). Рис. 3 свідчить, що процес відновлення нітратів у мембранному біореакторі повністю завершується протягом 60 год. Концентрація NO₃, що дифузійно проникає в приймальну частину, не перевищує 50 мг/л. Це означає, що процес денітрифікації майже повністю проходить на біоплівці реактора, а тривалість його вдвічі менша, ніж у присутності Cr(VI).

Отже, наявність шестивалентного хрому в мембранному біореакторі пригнічує відновлення нітрату. Денітрифікація починається тільки після того, як практично завершується відновлення Cr(VI).

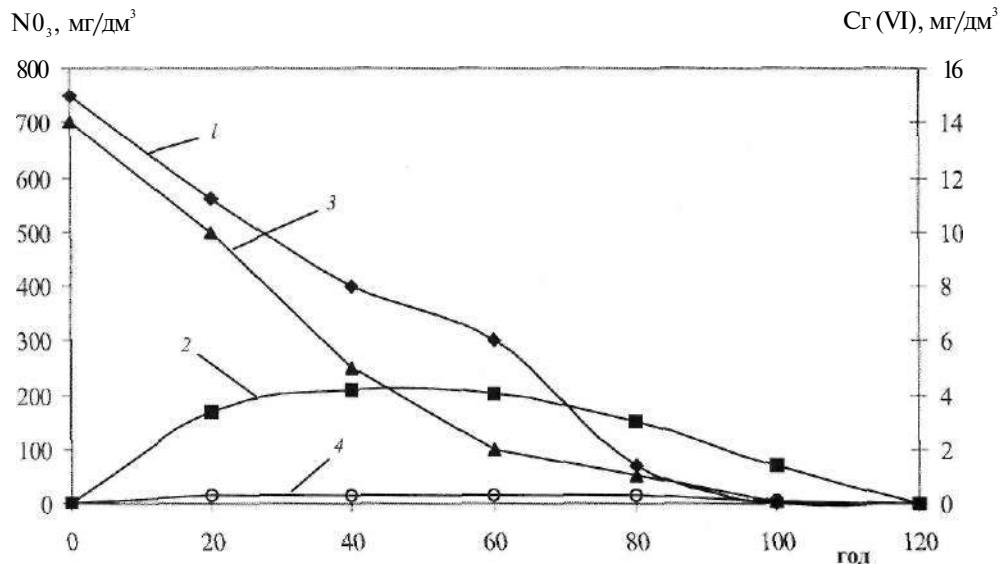


Рис. 2. Послідовність відновлення Cr(VI) та нітрату в мембранному біореакторі за їх одночасної присутності в середовищі (мембрана C005F): 1 - концентрація NO₃ з активного боку мембрани; 2 - концентрація NO₃ з приймального боку мембрани; 3 - концентрація Cr(VI) з активного боку мембрани; 4 - концентрація Cr(VI) з приймального боку мембрани

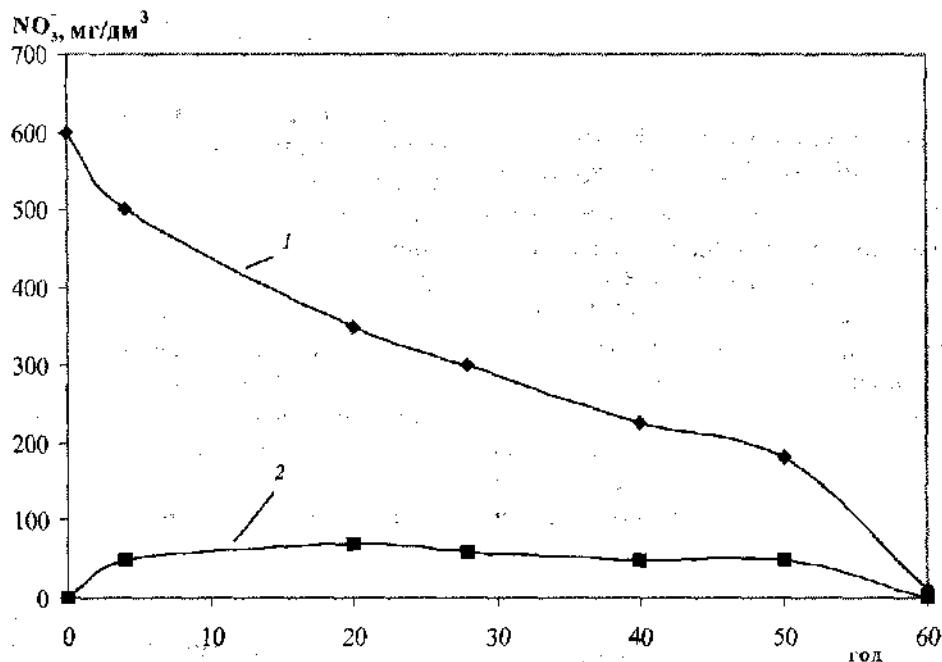


Рис. 3. Зміна концентрації нітрату в мембранному біореакторі (мембрана C005F):
1 – концентрація NO_3^- з активного боку мембрани; 2 – концентрація NO_3^- з приймального боку мембрани

Таким чином, за одночасної присутності у середовищі кількох елементів зі змінним ступенем окиснення згідно з електрохімічними законами, елемент із нижчим стандартним електродним потенціалом не відновлюється в активній частині біореактора, а дифундує у приймальну частину доти, поки не відновиться елемент із вищим електродним потенціалом. Із технічної та екологічної точок зору такий процес є недоцільним, оскільки збільшується операційний час проведення процесів відновлення. При цьому забруднення (нітрат) потрапляє у дифузійну частину. Для зворотного процесу дифузії необхідно, щоб концентрація нітрату в активній частині реактора стала нижчою, ніж у дифузійній. А це можливо лише після закінчення процесу хроматредукції. З огляду на це для ефективного проведення двох окисно-відновних процесів у мембранному біореакторі діалізного типу необхідно розділити проведення процесів редукції по обидва боки мембрани.

Так, проведено дослідження відновлення іонів Cr(VI) у присутності нітрату при іммобілізації бактерій як на активному, так і на приймальному боках мембрани, тоді як в усіх попередніх дослідженнях бактерії наносили тільки на активний бік мембрани. Іммобілізація біокатализатора в плівках з обох боків мембрани спричинила до зростання дифузійного опору крізь мембрану і, відповідно, зменшення дифузійного потоку. Тому для збільшення проникності мембрани було використано мембрану з більшим cut-off, а саме - C030F.

Як виявилось, цей спосіб має низку переваг порівняно з попереднім, коли хроматредукція пригнічувала процес денітрифікації і нітрат дифундував у приймальну частину. Завдяки іммобілізації клітин по обидва боки мембрани редукція хрому проходить, як і раніше, на активному боці мембрани. Нітрат, дифундуючи в приймальну частину, відновлюється бактеріями, іммобілізованими на зворотному боці мембрани. Результати досліджень наведено на рис. 4.

Концентрація хрому, як і в попередніх випадках, знижується лінійно і досягає значень 0,5 мг/л протягом 47 год культивування. В приймальну частину Cr(VI) не потрапляє, а отже, не пригнічує денітрифікацію.

Концентрація NO_3^- у приймальній частині протягом дослідження також залишалася нульовою, тобто швидкості денітрифікації та дифузії нітрату також відповідні.

Отже, іммобілізація бактерій із обох боків мембрани дала змогу уникнути дифузії нітрату крізь мембрану в незабруднену частину біореактора та розділити процеси хроматредукції та денітрифікації, завдяки чому скоротився час обробки води.

Висновки

Результати проведених досліджень свідчать, що за одночасної присутності хрому (VI) та нітрату в розчині спершу починає відновлюватися Cr(VI) . Концентрація нітрату знижується тільки за наявності залишкових концентрацій хрому. Отже, редукція шестивалентного хрому

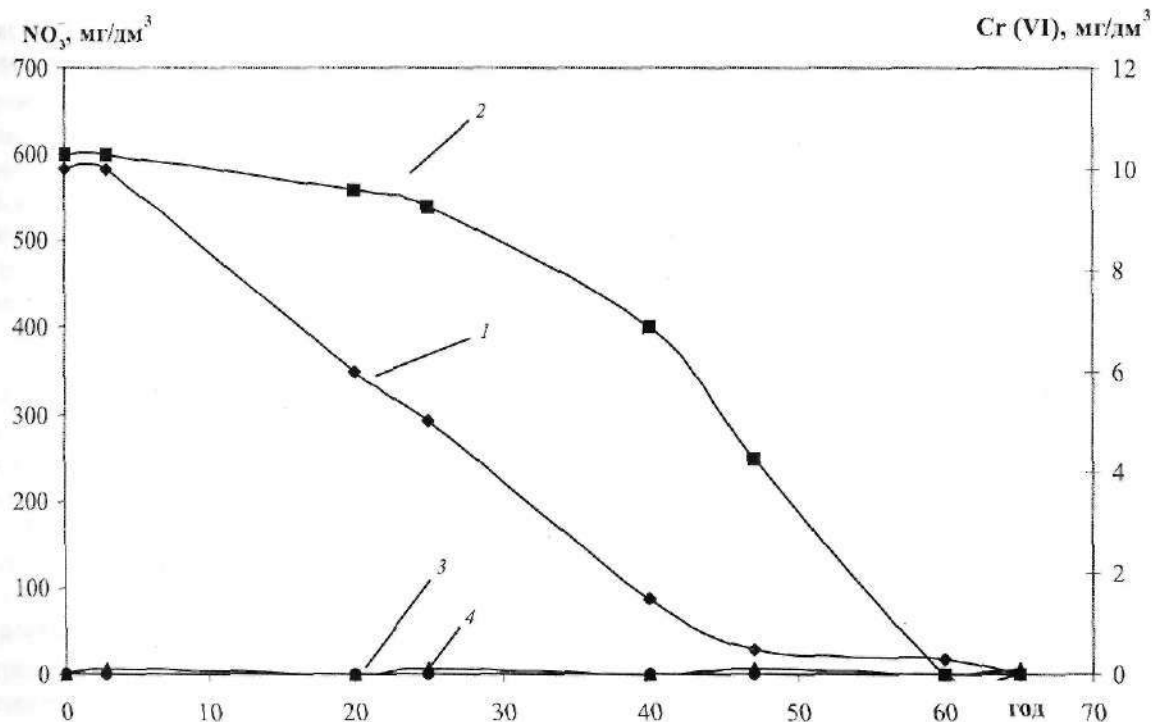


Рис. 4. Послідовність відновлення шестивалентного хрому та нітрату за їх одночасної присутності в середовищі у мембранному (мембрана С030F) біореакторі: 1 – концентрація Cr(VI) з активного боку мембрани; 2 – концентрація NO₃⁻ з активного боку мембрани; 3 – концентрація NO₃⁻ з приймального боку мембрани; 4 – концентрація Cr(VI) з приймального боку мембрани

денітрифікуючими бактеріями передувє відновленню нітратів цими культурами. Швидкість хроматредукції не залежить від наявності в середовищі нітрат-іона.

Одночасне проведення процесів денітрифікації та хроматредукції у мембранному біореакторі діалізного типу з іммобілізованими клітинами підтверджує послідовність відновлення хрому та нітрату. А саме, редокс-послідовність відновлення хроматів та нітратів бактеріями підпорядковується електрохімічним закономір-

ностям - першим відновлюється елемент, стандартний електродний потенціал редукції якого вищий.

Показано можливість ефективного проведення двох окисно-відновних процесів у мембранному біореакторі діалізного типу шляхом розділення процесів редукції по обидва боки мембрани. При іммобілізації клітин з обох боків мембрани процеси хроматредукції та денітрифікації протікають одночасно з активного та приймального боків мембрани відповідно.

Роботу виконано за підтримки Гранта Президента України для молодих вчених.

1. Запольський А. К., Клименко Н. А., Астрелін І. М., Брик А. Т., Гвоздяк П. І., Князькова Т. В. Фізико-хімічні основи очистки стічних вод.- К.: Лібра, 2000.- 552 с.
2. Giorno L., Drioli E. Biocatalytic membrane reactor: applications and perspectives II Trends Biotechnol.- 2000.- № 18.- P. 339-349.
3. Konovalova V. V., Dmytrenko G. N., Nigmatulli R. R., Bryk M. T., Gvozdyak P. I. Chromium (VI) reduction in a membrane bioreactor with immobilized *Pseudomonas* cells II Enzyme and Microbial Technology.- 2003.- № 33.- P. 899-907.
4. Zhang D., Lu P., Long T., Verstraete W. The integration of methanogenesis with simultaneous nitrification and denitrification in a membrane bioreactor II Process Biochemistry.- 2005.- № 40.- P. 541-547.
5. Wang X, Huang X., Yuan Q. Nitrogen and carbon removals from food processing wastewater by an anoxic I aerobic membrane bioreactor II Process Biochemistry.- 2005.- № 40.- P. 1733-1739.
6. Ergas S. J., Rheinheimer D. E. Drinking water denitrification using a membrane bioreactor II Water Research.- 2004.- № 38.- P. 3225-3232.
7. Rezanian B., Oleszkiewicz J.A., Cicek N., Mo H. Hydrogen-dependent denitrification in an alternating anoxic-aerobic SBR membrane bioreactor II Water Sci Technol.- 2005.- № 51.- P. 403-409.
8. Matos C. T., Velizarov S., Crespo G., Reis M. A. M. Simultaneous removal of perchlorate and nitrate from drinking water using the ion exchange membrane bioreactor concept II Water Research.- 2006.- № 40.- P. 231-240.
9. McLean J., Beveridge T. J. Chromate Reduction by a Pseudomonad Isolated from a Site Contaminated with Chromated Copper Arsenate II Appl. and Envir. Microbiology.- 2001.- № 67.- P. 1076-1084.
10. Vainshtein M., Kuschik P., Mattusch J., Vatsourina A., Wiessner A. Model experiments on the microbial removal of chromium from contaminated groundwater II Water Research.- 2003.- № 37.- P. 1401-1405.

11. *Dmitrenko G. N., Konovalova V. V., Ereshko T. V.* The Successive Reduction of Cr(VI) and NO_3^- or Mn(IV) Ions Present in the Cultivation Medium of Denitrifying Bacteria // *Microbiology*.-2006.- № 75.- P. 125-128.
12. *Рабинович В. А., Хавин З. Я.* Краткий химический справочник.- М.: Химия, 1978.- 392 с.

V. Konovalova, G. Dmytrenko, A. Burban, M. Bryk

SEQUENCE OF CHROME (VI) AND NITRATE REDUCTION
IN MEMBRANE BIOREACTOR

Sequence of chrome (VI) and nitrate reduction in dialyze membrane bioreactor with immobilized cells has been investigated. It has been shown that Cr (VI) are reduced first at simultaneously present chromate and nitrate in the medium. The reduction of nitrate began only after the Cr (VI) decreases to residual concentration. It can be suggested that the succession of biological reductive reactions is determined by the standard redox potentials E° of these reactions. Namely, in the presence of several electron acceptors in the cultivation medium, microorganisms first utilize those acceptors which have the highest standard redox potential. The possibility to carry out of two oxidation-reduction processes in dialyze membrane bioreactor by separation of reduction processes into different side of membrane has been shown. Both denitrification and chromate reduction processes are proceed at the same time on the feed and receiving membrane side respectively.