

Р. А. Г а р а н и н, И. Н. Л ы к о в

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДРОЖЖЕЙ
(SACCHAROMYCES CEREVISIAE) В КАЧЕСТВЕ
БИОСОРБЕНТА ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ
ИЗ ПРОМЫШЛЕННЫХ СТОЧНЫХ ВОД**

Рассмотрены основные принципы, этапы и условия, при которых происходит максимальная биосорбция тяжелых металлов дрожжами. Проведенное исследование затрагивает этап выяснения пороговых концентраций для дрожжей в жидкой среде, характерной для дрожжей, при введении в нее солей металлов Zn, Ni и Cu. Также приведен этап исследования биосорбционных свойств дрожжей в сточных водах с повышенным содержанием ионов тяжелых металлов. При этом выявлены основные закономерности биосорбции в зависимости от условий среды.

Широко используемые методы очистки сточных вод от повышенного содержания тяжелых металлов пока еще не в состоянии обеспечить очистку до необходимых величин ПДК и в настоящее время разрабатываются физико-химические методы доочистки, которые позволяют очистить сточные воды до необходимых значений ПДК [1]. Одним из перспективных направлений очистки сточных вод с повышенным содержанием тяжелых металлов является привлечение микроорганизмов, в частности дрожжей [2–4]. Среди многообразия микроорганизмов, способных к биосорбции тяжелых металлов, наибольший интерес, на наш взгляд, представляют дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*), так как их применение оправдано экономически. В перспективе они могут применяться для решения многих экологических проблем — очистка сточных вод, биоремедиация загрязненных почв и т.д.

Резистентность дрожжей может возникнуть как вследствие многократных пересевов при возрастающей концентрации катионов металла, так и при первых пассажах на среду [10, 6]. Вначале присутствие повышенных концентраций металла вызывает стресс и замедление роста дрожжей. Через некоторое время включаются защитные механизмы в клетках и рост дрожжей возобновляется.

Основным достоинством дрожжей является то, что они используют широкий спектр механизмов детоксикации тяжелых металлов: образование специализированных белков (металлотioneин-подобные белки),

низкомолекулярных пептидов (глутатион), фитохелатинов, образование внутриклеточных соединений, клеточной оболочки (имеющей в своем составе пептидогликан и хитин-глюкановый комплекс) [5, 7–9, 11, 12]; при этом происходит связывание тяжелых металлов посредством биосорбции и биоаккумуляции с последующим образованием малотоксичных соединений. Поэтому дрожжи проявляют высокую сорбционную активность по отношению к тяжелым металлам. Кроме того, дрожжи легко культивируются и технологичны.

В своих исследованиях авторы использовали биомассу пивоваренных дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*). На первом этапе исследования в качестве модельной среды использовали сусло. В сусло вводили дрожжи (штамм 1, штамм 2 и штамм 3) в количестве 5 г/дм^3 (в пересчете на сухое вещество) с экспозицией в течение 24 ч при $t = 29^\circ\text{C}$ и $\text{pH} = 5,5$. По всем трем штаммам проводились параллельные исследования. Для определения степени извлечения металлов из сусла в него искусственно вводили соли меди, никеля и цинка (хлориды и сульфаты) до концентраций, в несколько раз превышающих предельно допустимые значения. Концентрации меди, никеля и цинка в сусле составили 15,6; 45,0 и $9,6 \text{ мг/дм}^3$ соответственно. Содержание металлов в сусле до и после их обработки сорбентами определяли методом атомной абсорбционной спектроскопии. Статистическую обработку проводили с использованием лицензионного программного пакета MS Office Excel 2003. Достоверность различия средних значений определяли по критерию Стьюдента. Значения эффективности биосорбции рассчитывали по формуле

$$\text{эффективность, \%} = 100 - \frac{\text{конечная концентрация металла}}{\text{начальная концентрация металла}} \cdot 100.$$

Для выяснения жизнеспособности использовали оригинальную методику подсчета клеток дрожжей в камере Горяева. В результате получили следующие значения по эффективности биосорбции: меди — 82,7 % (штамм 1), 79,5 % (штамм 2), 62,5 % (штамм 3); никеля — 88,2 % (штамм 1), 74,5 % (штамм 2), 66,7 % (штамм 3); цинка — 99,6 % (штамм 1), 77,1 % (штамм 2), 93,8 % (штамм 3). Таким образом, полученные результаты иллюстрируют значительные биосорбционные способности дрожжей этих штаммов, что можно видеть на рис. 1.

Далее для выявления пороговых значений был проведен цикл экспериментов. В качестве жидкой модельной среды использовали пивоваренное сусло, в которое вводили навески солей тяжелых металлов — сульфат меди, сульфат никеля и хлорид цинка. Условия культивирования: $t = 29^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5,5$, время культивирования 24 ч, навеска живых дрожжей в количестве 5 г/дм^3 (в пересчете на сухое вещество).

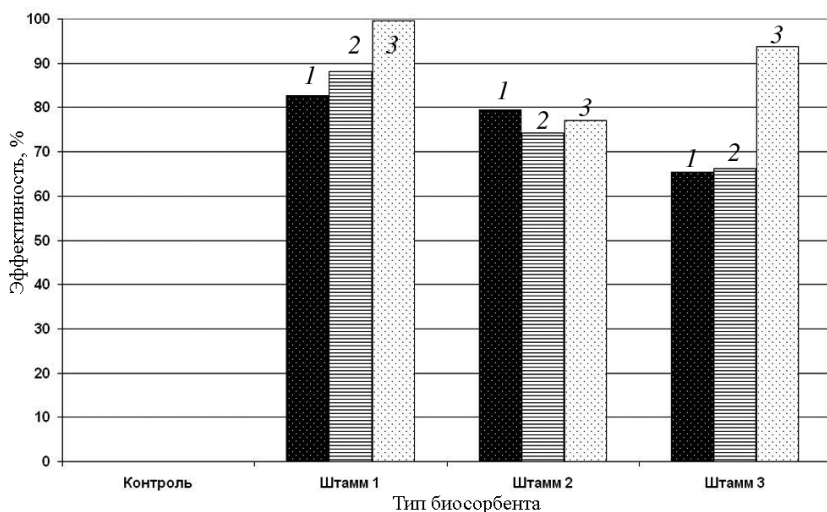


Рис. 1. Эффективность сорбции дрожжами из сула:
 1 – медь; 2 – никель; 3 – цинк

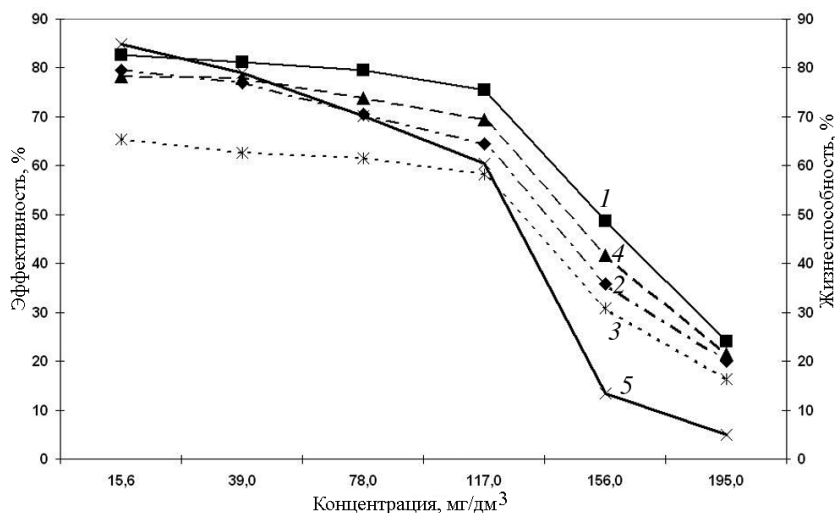


Рис. 2. Зависимость эффективности и жизнеспособности от концентрации меди:
 1 – штамм 1; 2 – штамм 2; 3 – штамм 3; 4 – штаммы MIX; 5 – жизнеспособность

В экспериментах использовались все те же три штамма, что и в предыдущих экспериментах. Кроме того, добавлен качественно новый тип биосорбента – смесь из трех перечисленных штаммов в процентном соотношении: штамм 1 – 50 %, штамм 2 – 20 % и штамм 3 – 30 %. По полученным результатам построены графики (рис. 2, 3 и 4) зависимости эффективности биосорбции и жизнеспособности от концентрации металла. Как видно на рис. 2, наиболее эффективно из модельной среды “медь” сорбируют штамм 1, затем штамм 2 и штаммы MIX (занимают промежуточное положение), чуть менее

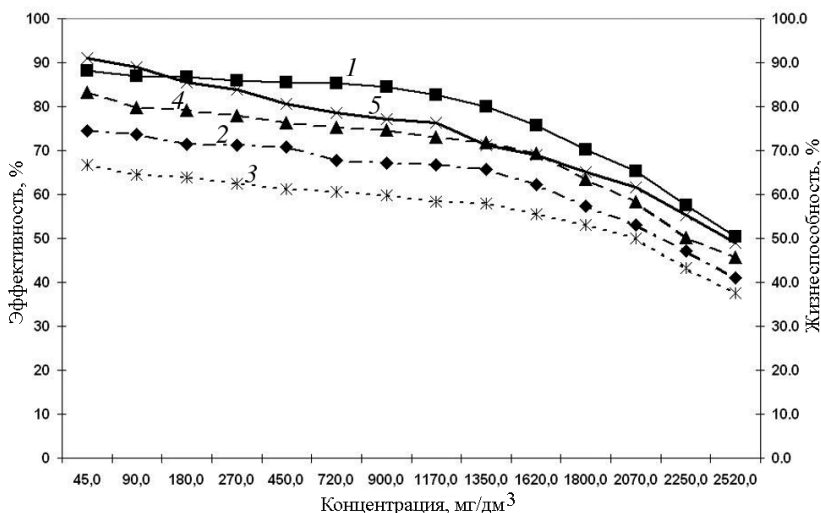


Рис. 3. Зависимость эффективности и жизнеспособности от концентрации никеля:

1 — штамм 1; 2 — штамм 2; 3 — штамм 3; 4 — штаммы MIX; 5 — жизнеспособность

эффективен штамм 3. Наибольшие значения эффективности наблюдаются в диапазоне жизнеспособности от 84,8 % до 60,5 % и концентрации меди в сусле 15,6... 117 мг/дм³. Им соответствуют следующие значения эффективности по убыванию: штамм 1 — 82,7... 75,4 %, штамм 2 — 79,5... 64,4 %, штаммы MIX — 78,2... 69,4 % и штамм 3 — 65,4... 58,3 %. При этом, как видно на рис. 2, происходит плавное убывание эффективности. В области концентрации меди в сусле 117 мг/дм³ наблюдается резкий спад жизнеспособности и резкое снижение эффективности биосорбции, т.е. на этом участке мы наблюдаем пороговые значения.

Из графика на рис. 3 следует, что наиболее эффективно из модельной среды “никель” сорбирует штамм 1, затем штаммы MIX, штамм 2, наименее эффективен штамм 3. При этом наибольшие значения эффективности наблюдаются в диапазоне жизнеспособности от 90,97 % до 71,3 % и концентрации никеля в сусле 45... 1350 мг/дм³. Им соответствуют следующие значения эффективности по убыванию: штамм 1 — 88,2... 80,1 %, штаммы MIX — 83,2... 71,3 %, штамм 2 — 74,5... 65,8 % и штамм 3 — 66,7... 58,0 %. При этом, как видно на рис. 3, сначала происходит плавный спад эффективности, а затем следует более интенсивное убывание.

Из графиков на рис. 4 следует, что наиболее эффективно из модельной среды “цинк” сорбирует штамм 1, затем штаммы MIX и штамм 3 и наименее эффективен штамм 2. Наибольшие значения эффективности наблюдаются в диапазоне жизнеспособности от 98,3 % до 97,9 % и концентрации соли в сусле 9,6... 19,2 мг/дм³.

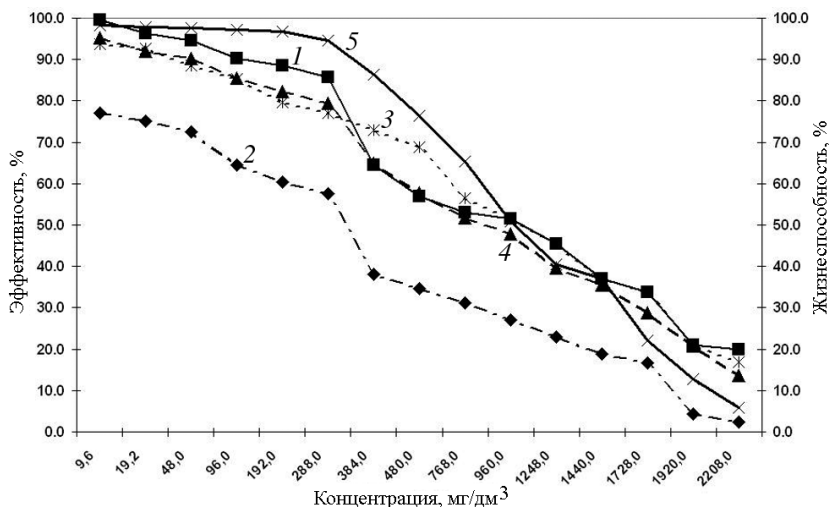


Рис. 4. Зависимость эффективности и жизнеспособности от концентрации цинка:

1 — штамм 1; 2 — штамм 2; 3 — штамм3; 4 — штаммы MIX; 5 — жизнеспособность

Им соответствуют следующие значения эффективности по убыванию: штамм 1 — 99,6... 96,3 %, штаммы MIX — 95,2... 92,1 % и штамм 3 — 93,8... 92,7 % (имеют сопоставимые значения) и штамм 2 — 77,1... 75,2 % (наименьшие значения). При этом высокие значения эффективности сорбции сохраняются до концентрации цинка в сусле 288 мг/дм³ и значений жизнеспособности 94,63 %. Значения эффективности: штамм 1 — 85,8 %, штаммы MIX — 79,5 %, штамм 3 — 77,1 % и штамм 2 — 57,6 %. Как видно на рис. 4, происходит плавное убывание эффективности с нарастанием концентрации цинка в сусле. Таким образом, результаты исследования на данном этапе показали, что активность и селективность процессов биосорбции ионов металлов из растворов определяется особенностями штаммов дрожжей, а также свойствами сорбируемых ионов тяжелых металлов.

На следующем этапе исследования в качестве среды для экспериментов использовали сточную воду с повышенным содержанием тяжелых металлов. Для определения влияния количества дрожжей на сорбцию цинка, никеля и меди в сточные воды вносили дрожжи тех же трех штаммов в количествах от 5,0 до 10,0 г/дм³ (в пересчете на сухое вещество) при времени экспозиции 24 ч и температуре 29 °С; pH сточной воды — 8. После этого образцы сточной воды фильтровали и определяли в них содержание цинка, никеля и меди методом атомной абсорбционной спектроскопии. По полученным данным повышение количества навески дрожжей с 5,0 до 10,0 г/дм³ приводит к незначительному увеличению эффективности биосорбции цинка из сточных вод: штамм 1 — от 96,1 до 98,3 %, штамм 2 — с 95,6 до 97,7 %, штамм 3

— от 95,9 до 98,1 % и штаммы МІХ — от 96,0 до 98,1 %. При этом эффективность сорбции у штаммов 1, 2, МІХ увеличивается на 2,1 %, а у штамма 3 на 2,3 % (значения сопоставимы).

В отношении биосорбции никеля повышение количества навески дрожжей приводит к весьма значительному увеличению эффективности биосорбции из сточных вод: штамм 1 — от 37,7 до 79,3 %, штамм 2 — с 28,3 до 73,6 %, штамм 3 — от 24,5 до 60,4 % и штаммы МІХ — от 28,3 до 75,5 %. При этом эффективность сорбции у штамма 1 увеличивается на 41,5 %, у штамма 2 на 45,3 %, у штамма 3 на 35,8 %, а у штаммов МІХ на 47,2 %.

В отношении биосорбции меди повышение количества навески дрожжей приводит к значительному увеличению эффективности сорбции меди из сточных вод: штамм 1 — от 53,3 до 78,3 %, штамм 2 — с 45,0 до 73,3 %, штамм 3 — от 41,7 до 70,0 % и штаммы МІХ — от 45,0 до 75,0 %. При этом эффективность сорбции у штамма 1 увеличивается на 25,0 %, у штамма 2 на 28,3 %, у штамма 3 на 28,3 %, а у штамма МІХ на 30,0 %.

Дальнейшие исследования были направлены на изучение влияния корректировки среды на эффективность биосорбции цинка, никеля и меди. Сточные воды были откорректированы в трех вариантах: а) рН откорректирована от 8 до 5,5; б) при рН = 8 вводилась сахароза до 1 %; в) рН корректировалась от 8 до 5,5 и вводилась сахароза до 1 %. При этом в сточные воды вносили дрожжи в количестве от 5,0 до 10,0 г/дм³, время экспозиции — 24 ч при температуре 29 °С. По полученным данным относительно биосорбции цинка наблюдается положительная тенденция от корректировки среды. Но при увеличении навески дрожжей с 5,0 до 10,0 г/дм³ и корректировки среды не происходит значительного увеличения эффективности сорбции цинка из сточных вод. Прирост эффективности по данным варианта корректировки (а) составил 1,6... 1,7 %, варианта (б) — 1,1... 1,2 %, варианта (в) — 1,5... 1,7 %, варианта без корректировки среды — 2,1... 2,3 %. Если оценить значение корректировки среды для навесок дрожжей в 5 и 10 г/дм³ в отдельности, сравнивая вариант без корректировки среды и вариант корректировки (в), то получены следующие значения: для 5 г/дм³ прирост составил 0,9... 1,1 %, для 10 г/дм³ — 0,3... 0,5 %. Вариант без корректировки был взят для сравнения как содержащий наименьшие значения эффективности, а вариант (в) — как имеющий наибольшие значения эффективности. Наиболее наглядно данную тенденцию можно увидеть на гистограмме (рис. 5), для построения которой использовались средние значения эффективности всех четырех штаммов дрожжей для навесок в 5 и 10 г/дм³ на основе данных по всем четырем вариантам корректированных сред.

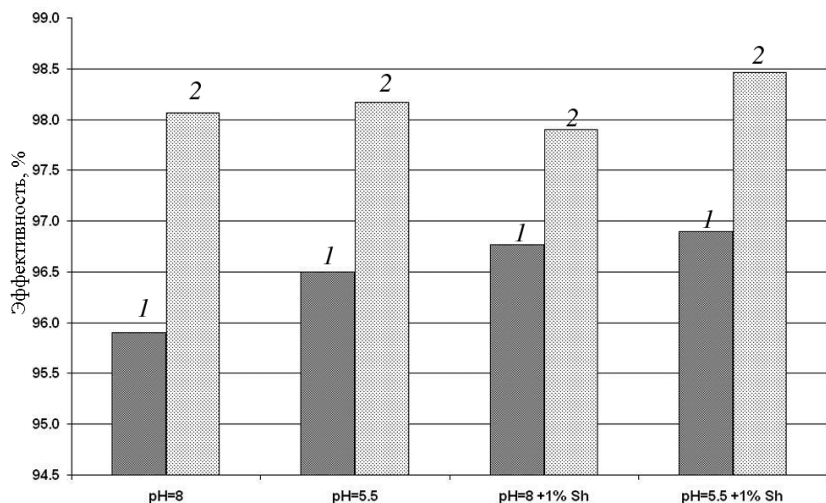


Рис. 5. Гистограммы прироста эффективности по цинку для навесок дрожжей 5 (1) и 10 г/дм³ (2)

По полученным данным относительно биосорбции никеля очевидна положительная тенденция при корректировке среды. В то же время при увеличении навески дрожжей с 5,0 до 10,0 г/дм³ и корректировке среды наблюдается уменьшение эффективности сорбции никеля из сточных вод с увеличением сорбирующей биомассы. Прирост эффективности по данным варианта корректировки (а) составил 41,5... 45,3 %, варианта (б) — 34,9... 37,7 %, варианта (в) — 17,9... 20,8 %, а варианта без корректировки среды — 35,8... 47,2 %. Если оценить влияние корректировки среды для навесок дрожжей 5 и 10 г/дм³, сравнивая вариант без корректировки среды и вариант корректировки (в), то получим следующие значения: для 5 г/дм³ прирост составил 35,8... 41,5 %, для 10 г/дм³ — всего 13,2... 20,8 %. Вариант без корректировки был взят для сравнения как содержащий наименьшие значения эффективности, а вариант (в) — как содержащий наибольшие значения эффективности. Наиболее наглядно данную тенденцию можно увидеть на гистограмме (рис. 6), для построения которой использовались средние значения эффективности всех четырех штаммов дрожжей для навесок 5 и 10 г/дм³ на основе данных по всем четырем вариантам корректированных сред.

По полученным данным относительно биосорбции меди видна положительная тенденция при корректировке среды. Но при увеличении навески дрожжей с 5,0 до 10,0 г/дм³ корректировка среды приводит к уменьшению эффективности сорбции меди из сточных вод с увеличением сорбирующей биомассы. Прирост эффективности по данным варианта корректировки (а) составил 21,7... 26,7 %, варианта (б) — 21,7... 25,0 %, варианта (в) — 16,7... 18,3 %, варианта без корректи-

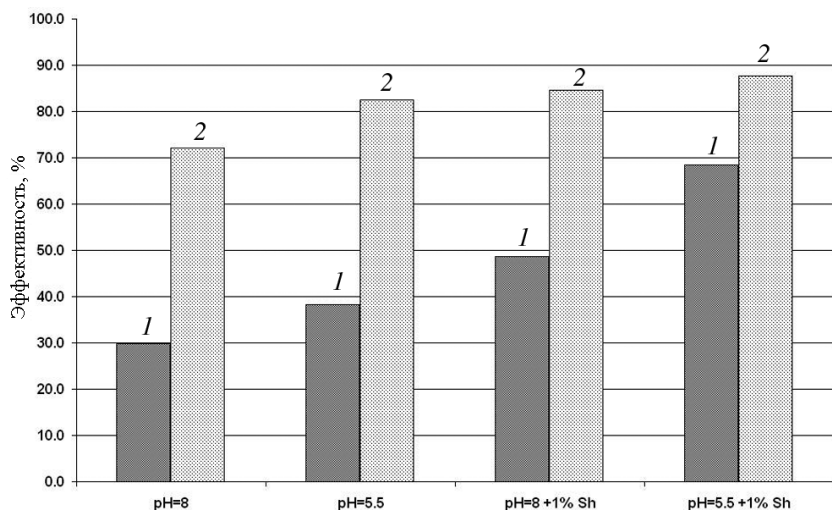


Рис. 6. Гистограммы прироста эффективности по никелю для навесок дрожжей 5 (1) и 10 г/дм³ (2)

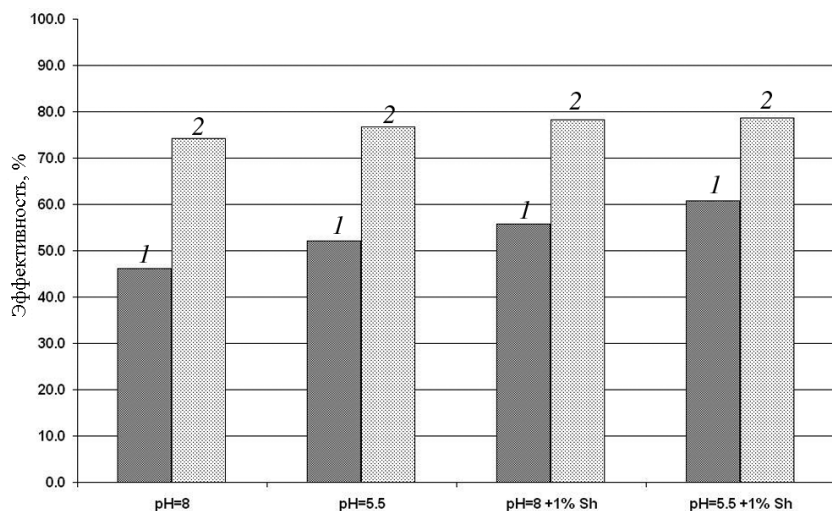


Рис. 7. Гистограммы прироста эффективности по меди для навесок дрожжей 5 (1) и 10 г/дм³ (2)

ровки среды — 25,0...30,0%. Если оценить влияние корректировки среды для навесок дрожжей 5 и 10 г/дм³, сравнивая вариант без корректировки среды и вариант с корректировкой (в), то получим следующие значения: для 5 г/дм³ прирост составил 13,3...16,7%, для 10 г/дм³ — всего 3,3...5,0%. Вариант без корректировки был взят для сравнения как содержащий наименьшие, а вариант (в) — наибольшие значения по эффективности. Наиболее наглядно данную тенденцию можно увидеть на гистограмме, приведенной на рис. 7, для построения которого использованы средние значения эффективности четырех

штаммов дрожжей для навесок 5 и 10 г/дм³ и данные по всем четырем вариантам корректированных сред.

Выводы. При коррекции среды наблюдается явное увеличение биосорбции никеля и меди и незначительное увеличение биосорбции цинка, хотя показатели эффективности биосорбции цинка являются самыми высокими. Также следует отметить, что корректировка среды приносит значительный прирост эффективности для дрожжей с навеской в 5 г/дм³ и гораздо меньший прирост для дрожжей с навеской в 10 г/дм³ в случае никеля и меди.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В и н о г р а д о в С. С. Экологически безопасное гальваническое производство // Под ред. В.Н. Кудрявцева. - М.: Производственно-издательское предприятие "Глобус", 1998. - 302 с.
2. К а р а в а й к о Г. И. Биотехнология металлов // Под ред. Г.И. Каравайко, Дж. Росси, А. Агате, С. Грудев, З.А. Авакян. - М.; Центр международных проектов ГКНТ, 1989. - 375 с.
3. К а р а в а й к о Г. И., З а х а р о в а В. И., А в а к я н З. А., С т р и ж к о Л. С. Селективное извлечение благородных металлов из растворов организмами // Прикл. биохим. и микробиол. - 1996. - Т. 32. - № 5. - С. 562-566.
4. К у л ь с к и й Л. А., С а в л у к О. С., П о т а п ч е н к о Н. Г. Устойчивость микроорганизмов к тяжелым металлам // Химия и технология воды. - 1986. - № 2. - С. 79-89.
5. S o b l e n z A., W o l f K. // FEMS Microbiol. Rev. - 1994. - Vol. 14. - P. 303-308.
6. D i a z r a v i n a M., B a a t h E. Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels // Appl. and Environ. Microbiol. - 1996. - V. 62. - № 8. - P. 2970-2977.
7. F e r r e i r a A. M., C i r i o l o M. R., M a r c o c c i L., R o t i l i o G. // Biochem. J. - 1993. - Vol. 292. - P. 673-679.
8. H a n R. P., Y a n g G. Y., W a n g M. L., Z h a o Z. J. Nickel cation biosorption studies by yeast with dimethylglyoxine spectrophotometry // O. Spectrosc. Spectr. Anal. - 2000. - V. 20. Oct. - P. 220-740.
9. K a r a m u s h k a I., G a d d G. M. Interaction of *Saccharomyces cerevisiae* with gold: toxicity and accumulation // BioMetals. - 1996. - V. 12. - P. 289-294.
10. M o n t s e r r a t D. R., E r l a n d B. Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels // Appl. and Environ. Microbiol. - 1996. - V. 62. - № 8. - P. 2970-2977.
11. O m a r N. B., M e r r o u n M. L., G o n z a l e z m u n o z M. T., A r i a s J. M. Brewery yeast as a biosorbent for uranium // J. Appl. Bacteriol. - 1996. - V. 81. - № 3. - P. 283-287.
12. S i m m o n s P., T o b i n J. M., S i n g l e t o n I. Considerations on the use of commercially available yeast biomass for the treatment of metal-containing effluents // J. Ind. Microbiol. - 1995. - V. 14. - № 3-4. - P. 240.

Статья поступила в редакцию 19.04.2007

Роман Анатольевич Гаранин родился в 1976 г., окончил Калужский государственный педагогический университет им. К.Э. Циолковского в 1998 г. Аспирант Калужского государственного педагогического университета им. К.Э. Циолковского. Автор 8 научных публикаций в области биотехнологии.

R.A. Garanin (b. 1976) graduated from the Kaluga State Pedagogical University n.a. K.E. Tsiolkovskii in 1998. Post-graduate of the Kaluga State Pedagogical University n.a. K.E. Tsiolkovskii. Author of 8 publications in the field of biotechnology.



Игорь Николаевич Лыков родился в 1947 года, окончил Рязанский медицинский институт им. акад. И.П. Павлова в 1970 г. Д-р биолог. наук, профессор кафедры промышленной экологии Калужского филиала МГТУ им. Н.Э. Баумана. Автор 110 научных работ в области биотехнологии.

I.N. Lykov (b. 1947) graduated from the Ryazan' Medical Institute n.a. acad. I.P. Pavlov in 1970. D. Sc. (Biology), professor of department for industrial ecology of the Kaluga Branch of the Bauman Moscow State Technical University. Author of 110 publications in the field of biotechnology.



**В издательстве МГТУ им. Н.Э. Баумана
в 2007 г. вышла в свет книга**

Недашковский В.М. Хартов В.Я.

Микроконтроллеры AVR. Практикум для начинающих. – М.: Изд-во МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2007. – 240 с.

Практикум содержит материалы для изучения микроконтроллеров AVR с архитектурой RISC. Рассмотрены необходимые инструментальные средства – интегрированный пакет для разработки и отладки программ AVR Studio 4, стартовый набор разработчика STK500. Предложен комплект программ для изучения функциональных возможностей микроконтроллеров (27 учебных проектов). Тематика охватывает практически все аспекты архитектуры микроконтроллеров: работу портов, таймеров, арифметическую обработку данных, организацию ввода/вывода по параллельным и последовательным (UART, SPI и I2C) каналам связи, устройств обработки аналоговых сигналов, системы прерывания. Базовые программы могут быть использованы в качестве основы для обучения и самостоятельного программирования на языке Ассемблер AVR в курсовом и дипломном проектировании.

Материалы книги автор использует в учебном процессе в МГТУ им. Н.Э. Баумана.

Для студентов высших и средних специальных учебных заведений, обучающихся по направлению “Информатика и вычислительная техника”.

По вопросам приобретения обращаться по тел. 263-60-45;

e-mail: press@bmstu.ru