

ОТРИМАННЯ МАГНІТОКЕРОВАНОГО БІОСОРБЕНТУ НА ОСНОВІ МІКРООРГАНІЗМІВ АКТИВНОГО МУЛУ

С.В. Горобець¹, К.А. Гетманенко¹, Д.С. Пономаренко^{1*}, О.В. Ковальов², І.В. Боровик³

¹КПІ ім. Ігоря Сікорського, Київ, Україна

²Комунальне підприємство “Славутич-Водоканал”, м. Славутич, Україна

³Комунальне підприємство “Чернігівводоканал”, м. Чернігів, Україна

*Corresponding author: ds.ponomarenko97@gmail.com

Received 14 November 2018; Accepted 13 December 2018

Проблематика. Забруднення стічних вод важкими металами є характерним для багатьох галузей промисловості, і їх видалення є важливим для екологічної безпеки довкілля. Як недорогий і екологічно нешкідливий сорбент можна застосовувати відходи біомаси, зокрема надлишковий активний мул, утилізація якого зазвичай є основною статтею затрат на утримання водоочисних споруд. Сорбенти з магнітними властивостями можуть бути вилучені швидким і ефективним методом магнітної сепарації. З огляду на те, що механізм біомінералізації біогенних магнітних наночастинок (БМН) єдиний для представників усіх царств живих організмів, важливо дослідити, яка частка мікроорганізмів активного мулу є потенційними продуцентами БМН.

Мета. Мета роботи полягає в пошуку потенційних продуцентів БМН серед мікроорганізмів активного мулу з використанням методів порівняльної геноміки, а також в отриманні магнітокерованого біосорбенту (МКБС) та дослідженні його ефективності у вилученні іонів Fe²⁺ із розчину солі FeSO₄ (500 мг/л).

Методика реалізації. Для оцінки ступеня подібності білків біомінералізації БМН у магнітотаксисної бактерії *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 та мікроорганізмів активного мулу використано методи попарного та множинного вирівнювання з використанням вільної в доступі програми BLAST (National Center for Biotechnological Information, США). Для отримання магнітокерованого біосорбенту на основі мікроорганізмів активного мулу використовували метод високоградієнтної магнітної сепарації (ВГМС).

Результати. Проведений біоінформаційний аналіз показав, що серед досліджуваних мікроорганізмів активного мулу, геноми яких у базі даних GenBank NCBI розшифровано на 25 % і більше, потенційними продуцентами БМН виявились усі мікроорганізми (*Stentor coeruleus*, *Bodo saltans*, *Sphaerotilus natans*, *Beggiatoa alba* B18LD, *Oscillatoria acuminata* PCC 6304, *Oscillatoria* sp. PCC 10802, *Oscillatoria nigroviridis* PCC 7112, *Rivularia* sp. PCC 7116, *Anabaena* sp. CRKS33, *Anabaena* sp. WA113, *Anabaena* sp. AL93, *Anabaena* sp. PCC7108, *Anabaena* MDT 14b, *Thiothrix nivea* DSM 5205, *Duganella zooglooides* ATCC 25935). Серед них 12 мікроорганізмів є потенційними продуцентами внутрішньоклітинних кристалічних БМН. Показано, що ефективність сорбції іонів Fe²⁺ біомасою активного мулу, не розділеною на високоградієнтному магнітному сепараторі, магнітокерованою та немагнітокерованою фракціями активного мулу не відрізняється.

Висновки. Результати проведених досліджень показали, що з відходів біомаси, зокрема з надлишкового активного мулу, можливо створювати магнітокерований сорбент без додаткового магнітомічення штучними магнітними наноа частинками, що дає змогу вилучати цей сорбент методами ВГМС у швидкісному режимі. Результати дослідження сорбції іонів Fe²⁺ МКБС на основі мікроорганізмів активного мулу експериментально підтверджують рівнозначність ефективності сорбції магнітокерованою, немагнітокерованою фракціями активного мулу та біомасою активного мулу, до якої не застосовували ВГМС; ефективність сорбції становить більше 97 %.

Ключові слова: активний мул; біогенні магнітні наночастинок; біомінералізація; *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1; Мат-білки; біосорбція; магнітокерований біосорбент; високоградієнтна магнітна сепарація.

Вступ

Підвищений вміст важких металів характерний для більшості промислових стічних вод [1]. У водоймах підвищена концентрація важких металів може призводити до низки не-

сприятливих наслідків: пригнічення або вимирання водних організмів, надмірного розвитку водоростей (“цвітіння”). Забруднення важкими металами ґрунтів призводить до уповільнення росту рослин, до низки метаболічних порушень і, як наслідок, до зниження якості сільськогос-

подарських харчових продуктів [1]. Для тварин і людини підвищений вміст важких металів у воді та продуктах харчування призводить до численних метаболічних порушень, розвитку ракових пухлин, пошкодження внутрішніх органів і нервової системи, а в найбільш важких випадках – до смерті [2]. Більшість каналізаційних очисних споруд із використанням у технології активного мулу орієнтовані на видалення органічних забрудників, а видалення важких металів розглядається як побічний корисний ефект [3]. Для видалення важких металів застосовують низку методів: хімічну преципітацію, електрокоагуляцію, мембранне розділення, іонний обмін тощо, але перевага надається адсорбції як найбільш дешевому і ефективному методу [1, 4].

Як один із недорогих та екологічно нешкідливих матеріалів-сорбентів використовують відходи біомаси, зокрема надлишкову біомасу активного мулу з водоочисних споруд [5–10]. Близько 45 млн т активного мулу на рік піддаються знешкодженню як відходи [11]. Висушений активний мул має високу питому поверхню і є ефективним сорбентом різних сполук, у т.ч. важких металів [1, 12]. Останнім часом він набув поширення в очищенні води, зокрема, активно вивчається його здатність до біосорбції важких металів [3, 7, 13–19].

Активний мул складається з широкого спектра організмів, які трансформують забруднення і очищують стічні води в результаті біосорбції, біохімічного окиснення. До його складу входять бактерії, гриби, актиноміцети, діатомові, зелені, евгленові та вольвоксові водорості, джгутикові, саркодові, інфузорії та дрібні багатоклітинні (первинно- і вториннопорожнинні черви, павукоподібні, коловертки тощо). Важливо зазначити, що в складі активного мулу присутні тільки аеробні або аеротолерантні організми, адже для підтримання мікроорганізмів у зваженому стані застосовують інтенсивну аерацію [20].

Відомо, що низка мікроорганізмів мають феримагнітні властивості [21–26], що дає змогу вилучати їх методом високоградієнтної магнітної сепарації (ВГМС) у швидкісному режимі [27]. З огляду на це важливо дослідити можливість вилучати мікроорганізми активного мулу з робочих середовищ за допомогою методів ВГМС, що дасть можливість значно здешевити процес очистки стічних вод [28].

Зважаючи на те що механізм біомінералізації біогенних магнітних наночастинок (БМН)

єдиний для представників усіх царств живих організмів (бактерій, архей та еукаріотів [29–31]), важливо дослідити, чи є мікроорганізми активного мулу потенційними продуцентами БМН.

Мета роботи полягає в пошуку потенційних продуцентів БМН серед мікроорганізмів активного мулу та класифікації останніх за типом внутрішньої структури (кристалічна чи аморфна) та місцем локалізації БМН (зовнішньо- чи внутрішньоклітинна) з використанням методів порівняльної геноміки, а також в отриманні магнітокерованого біосорбенту (МКБС) та перевірці його ефективності у вилученні іонів важких металів із води. Виявлення потенційних продуцентів БМН серед мікроорганізмів активного мулу дасть змогу інтенсифікувати біотехнологічний процес видалення важких металів зі стічних вод, а також оцінити перспективність використання технологій магнітної сепарації для інтенсифікації процесів водоочищення.

Матеріали і методи

Метод біоінформаційного аналізу для пошуку гомологів білків серед мікроорганізмів активного мулу. Для дослідження використовували геноми і протеоми мікроорганізмів активного мулу, розшифровані на 25 % і більше в базі даних GenBank of National Centre for Biotechnological Information (NCBI, США) [32]. Вирівнювання геномів мікроорганізмів активного мулу проводили з геномом магнітотаксисної бактерії (МТБ) *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, для якої процес біомінералізації БМН найбільш докладно вивчено на генетичному рівні [33, 34]. У дослідженні використано методи попарного та множинного вирівнювання амінокислотних послідовностей, дослідження було проведено з використанням вільної в доступі програми BLAST (NCBI) [35].

Проведено порівняння амінокислотних послідовностей білків групи Mat, без яких неможлива біомінералізація БМН у *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 [36], з геномами мікроорганізмів активного мулу.

Для аналізу результатів дослідження використано такі показники: значення *E*-числа (тобто кількості вирівнювань з такою або кращою вагою вирівнювання, яку можна знайти випадково в базі даних певного розміру), *Ident* – відсоток перекривання амінокислотних послідовностей, у межах яких проводиться вирівнювання, *Length* – кількість ідентичних

амінокислотних залишків білків, що порівнюються, при оптимальному вирівнюванні та функції білків, що вирівнювались [36, 37].

Здатність до утворення БМН із певними властивостями було оцінено відповідно до класифікації БМН, наведеної в [26]. За властивостями та локалізацією БМН поділяють на чотири групи (табл. 1).

Таблиця 1: Класифікація організмів за властивостями біогенних магнітних наночастинок і місцем їх локалізації відносно клітини [26]

| Гомологи білків МТБ у неМТБ | Зовнішньоклітинні аморфні БМН (1 група) | Зовнішньоклітинні кристалічні БМН (2 група) | Внутрішньоклітинні аморфні БМН (3 група) | Внутрішньоклітинні кристалічні БМН (4 група) |
|-----------------------------|---|---|--|--|
| MamA | – | + | – | + |
| MamB | + | + | + | + |
| MamM | + | + | + | + |
| MamO | – | – | + | + |
| MamE | – | – | + | + |
| MamK | – | – | + | + |

Отримання магнітокерowanego біосорбенту на основі мікроорганізмів активного мулу методом високоградієнтної магнітної сепарації. За біологічний матеріал було взято зразки активного мулу з аеротенків, з аварійного мулового майданчика комунального очисного підприємства “Чернігівводоканал” (м. Чернігів, Україна). Концентрація активного мулу становила 1,85 г/л.

Для проведення ВГМС готували суспензію, яку розводили водою до кінематичної в'язкості $1,51 \cdot 10^{-6} \text{ м}^2/\text{с}$ ($t = 5 \text{ }^\circ\text{C}$). Отриману суспензію на основі біомаси мікроорганізмів активного мулу пропускали через високоградієнтний магнітний сепаратор із високоградієнтною феромагнітною насадкою (сітка з коміркою $0,5 \times 0,5 \text{ мм}$ згорнута в рулон), напруженість зовнішнього магнітного поля – 2000 Е. Робоча рідина ламінарно протікала через високоградієнтний магнітний сепаратор зі швидкістю 10 мл/хв. Мікроорганізми активного мулу, які затримались на насадках у високоградієнтному магнітному сепараторі, вимивали невеликою кількістю води та висушували в сушильній шафі за $t = 105 \text{ }^\circ\text{C}$ протягом 3-4 год до сталої ваги.

Експериментальна установка для відділення магнітокерowanego фракції з активного мулу зображена на рисунку.

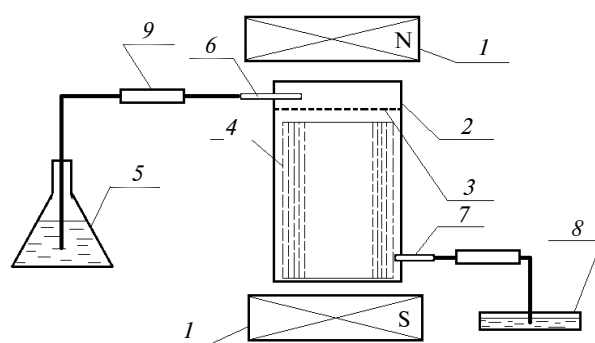


Рисунок: Схема експериментальної установки для проведення високоградієнтної магнітної сепарації: 1 – магнітна система установки, 2 – робочий об'єм сепаратора, 3 – перфорована пластина для розподілення потоку рідини, 4 – феромагнітна насадка (сітка з низьковуглецевої сталі), 5 – ємність для робочої рідини, 6 – вхідний патрубок, 7 – вихідний патрубок, 8 – ємність для скидання немагнітокерowanego фази, 9 – регулятор швидкості потоку рідини

Методика проведення біосорбції магнітокерowanego біосорбенту. Сорбція проводилася висушеною біомасою активного мулу, розділеною методом ВГМС на магнітокерowanego та немагнітокерowanego фракції.

Процес біосорбції здійснювали при механічному перемішуванні 180 об/хв, тривалість сорбції – 40 хв. Вихідна концентрація іонів Fe^{2+} у розчині – 50 мг/л. Концентрація біосорбенту – 500 мг/л. Час відбору проб – 2, 5, 20, 30 хв.

Після відбору проби фільтрували через фільтр “синя стрічка” та визначали залишкову кількість іонів Fe^{2+} .

Методика вимірювання сорбційної здатності магнітокерowanego біосорбенту. Визначення залишкового заліза в розчині відбувалося за методикою фотометричного визначення заліза з ортофенантроліном у поверхневих і стічних водах. Фотометричні методи аналізу – кількісні та якісні методи визначення хімічних компонентів за інтенсивністю випромінювання (ультрафіолетового, інфрачервоного або видимого), засновані на вибіркового поглинанні в певних областях, що обумовлене компонентами розчину або сполуками з відповідними реагентами.

Визначення загального заліза відбувається за КНД 211.1.4.034-1995 [38]. Метод базується на взаємодії двовалентного заліза з 1,10-ортофенантроліном з утворенням червоного комплексу з максимумом світлопоглинання за довжини хвилі 540 нм. Відновлення заліза (III) до заліза (II) проводили за допомогою гідроксиламіну. Пропорційна залежність між світлопоглинанням та концентрацією заліза зберігається в діапазоні $0,05\text{--}2,0 \text{ мг}/\text{дм}^3$ заліза (II) [38].

Результати

Вирівнювання амінокислотних послідовностей білків мікроорганізмів активного мулу з білками МТБ *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1.

У роботі проведено порівняння амінокислотних послідовностей білків групи Mam, без яких не-

можлива біомінералізація БМН у *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, з протеомами мікроорганізмів активного мулу бази даних GenBank NCBI.

Вирівнювання білків МТБ MamA, MamB, MamM, MamE, MamO та MamK, без яких неможлива біомінералізація БМН, та білків мікроорганізмів активного мулу наведені в табл. 2.

Таблиця 2: Порівняння білків групи Mam магнітотаксисної бактерії *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 і протеомів мікроорганізмів активного мулу

| Досліджуваний організм | Повнота геному | E-число | | | | | |
|--|----------------|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | Ident (%) | | | | | |
| | | Length, a.k. | | | | | |
| | | Білки <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1 | | | | | |
| | | MamA | MamB | MamM | MamO | MamE | MamK |
| <i>Stentor coeruleus</i> | ● | 1e-12 | 4e-05 | 8e-06 | 0,059 | 8e-04 | 3e-04 |
| | | 25 | 26 | 30 | 23 | 35 | 21 |
| | | 208 | 93 | 87 | 178 | 46 | 197 |
| <i>Bodo saltans</i> | ● | 4e-10 | 3e-10 | 3e-06 | 0,30 | 0,014 | 0,033 |
| | | 25 | 35 | 24 | 50 | 32 | 19 |
| | | 171 | 83 | 257 | 26 | 73 | 196 |
| <i>Sphaerotilus natans</i> | ● | 0.007 | 5e-34 | 7e-28 | 1e-09 | 1e-33 | 1e-04 |
| | | 23 | 30 | 31 | 27 | 44 | 23 |
| | | 98 | 265 | 268 | 164 | 177 | 300 |
| <i>Beggiatoa alba</i> B18LD | ● | 6e-11 | 3e-42 | 6e-34 | 1e-10 | 2e-43 | 0,022 |
| | | 23 | 29 | 27 | 30 | 47 | 22 |
| | | 188 | 276 | 281 | 174 | 172 | 350 |
| <i>Oscillatoria acuminata</i> PCC 6304 | ● | 2e-12 | 1e-07 | 3e-21 | 1e-11 | 5e-36 | 9e-13 |
| | | 27 | 24 | 28 | 30 | 50 | 27 |
| | | 157 | 236 | 277 | 146 | 167 | 313 |
| <i>Oscillatoria sp.</i> PCC 10802 | ● | 3e-17 | 1e-09 | 7e-17 | 3e-10 | 1e-32 | 3e-10 |
| | | 24 | 25 | 28 | 33 | 47 | 25 |
| | | 201 | 279 | 281 | 168 | 166 | 311 |
| <i>Oscillatoria nigro-viridis</i> PCC 7112 | ● | 3e-13 | 4e-06 | 1e-17 | 1e-06 | 3e-35 | 5e-11 |
| | | 26 | 23 | 26 | 28 | 44 | 27 |
| | | 175 | 271 | 276 | 145 | 180 | 313 |
| <i>Rivularia sp.</i> PCC 7116 | ● | 4e-12 | 1e-12 | 2e-20 | 3e-08 | 5e-32 | 9e-08 |
| | | 24 | 24 | 28 | 30 | 35 | 26 |
| | | 184 | 189 | 270 | 144 | 300 | 313 |
| <i>Anabaena sp.</i> CRKS33 | ● | 6e-13 | 4e-12 | 2e-14 | 2e-06 | 4e-29 | 4e-07 |
| | | 24 | 23 | 26 | 26 | 38 | 27 |
| | | 181 | 300 | 287 | 144 | 248 | 314 |
| <i>Anabaena sp.</i> WA113 | ● | 4e-12 | 2e-12 | 3e-18 | 7e-04 | 3e-29 | 2e-07 |
| | | 28 | 23 | 27 | 24 | 42 | 27 |
| | | 181 | 303 | 291 | 145 | 184 | 314 |
| <i>Anabaena sp.</i> AL93 | ● | 1e-09 | 9e-12 | 7e-04 | 5e-09 | 4e-33 | 2e-09 |
| | | 22 | 25 | 23 | 32 | 43 | 27 |
| | | 186 | 275 | 180 | 145 | 176 | 314 |
| <i>Anabaena sp.</i> PCC7 108 | ● | 7e-10 | 1e-11 | 9e-29 | 1e-07 | 3e-31 | 2e-06 |
| | | 26 | 27 | 31 | 31 | 42 | 27 |
| | | 156 | 184 | 279 | 145 | 177 | 314 |
| <i>Anabaena</i> MDT 14b | ● | 3e-09 | 2e-11 | 2e-21 | 1e-08 | 5e-33 | 0.29 |
| | | 22 | 25 | 28 | 33 | 43 | 27 |
| | | 198 | 275 | 281 | 144 | 176 | 100 |
| <i>Thiothrix nivea</i> DSM 5205 | ● | 3e-07 | 2e-36 | 1e-29 | 2e-10 | 4e-37 | 3e-84 |
| | | 22 | 29 | 28 | 27 | 41 | 37 |
| | | 114 | 258 | 286 | 155 | 225 | 328 |
| <i>Duganella zoogloeoides</i> ATCC 25935 | ● | 9e-10 | 2e-07 | 2e-04 | 7e-09 | 2e-35 | 6e-04 |
| | | 25 | 24 | 26 | 28 | 45 | 23 |
| | | 146 | 199 | 96 | 174 | 164 | 298 |

Також було здійснено порівняння функцій білків біомінералізації МТБ *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 та білків-гомологів мікроорганізмів активного мулу (табл. 3).

Отримання магнітокерованої фракції активного мулу методом високоградієнтної магнітної сепарації. За допомогою установки для ВГМС було проведено розділення активного мулу на магнітокеровану та немагнітокеровану фракції.

Вихід магнітокерованої фракції за масою становив 24 % від загальної маси активного мулу.

Дослідження сорбційної здатності магнітокерованого біосорбенту на основі мікроорганізмів активного мулу. Для дослідження використано магнітокеровану та немагнітокеровану фракції активного мулу, розділені ВГМС, а також біомасу активного мулу, до якої не застосовували ВГМС. Результати наведено в табл. 4.

Таблиця 3: Функції білків біомінералізації біогенних магнітних наночастинок групи Mam магнітотаксисної бактерії *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 та функції білків гомологів у мікроорганізмів активного мулу

| Досліджуваний організм | Білки МТБ <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1 | | | |
|--|---|---|---|---|
| | MamA – білок із TPR-доменом | MamB, MamM – транспортери катіонів Co, Zn, Cd, Fe, Ni | MamO – серинова протеаза з PDZ-доменом | Mam E – серинова протеаза з PDZ-доменом |
| <i>Bodo saltans</i> | Гіпотетичний білок | Транспортер катіонів | Трансмембранний білок | Гіпотетичний білок |
| <i>Anabaena sp.</i> MDT 14b | Протеїнкіназа | Транспортер катіонів | Серинова протеаза | |
| <i>Anabaena sp.</i> AL93 | Гіпотетичний білок | Транспортер катіонів | Серинова протеаза | |
| <i>Anabaena sp.</i> CRKS33 | Гіпотетичний білок | Транспортер катіонів | Серинова протеаза | |
| <i>Anabaena sp.</i> PCC7108 | Білок із TPR-повторами | Транспортер катіонів | Білок із PDZ-доменом | |
| <i>Anabaena sp.</i> WA113 | Гіпотетичний білок | Транспортер катіонів | Серинова протеаза | |
| <i>Duganella Zoogloeooides</i> ATCC 25935 | Білок із TPR-повторами | Транспортер катіонів | Білок із PDZ-доменом | |
| <i>Rivularia sp.</i> PCC 7116 | Білок із TPR-повторами | Транспортер катіонів | Трипсиноподібна серинова протеаза з PDZ-доменом | Білок із PDZ-доменом |
| <i>Oscillatoria acuminata</i> PCC 6304 | Білок із TPR-повторами | Транспортер катіонів | Гіпотетичний білок | Білок із PDZ-доменом |
| <i>Oscillatoria sp.</i> PCC 10802 | Білок із TPR-повторами | Транспортер катіонів | Гіпотетичний білок | Білок із PDZ-доменом |
| <i>Oscillatoria nigro-viridis</i> PCC 7112 | Білок із TPR-повторами | Транспортер катіонів | Білок із PDZ-доменом | |
| <i>Sphaerotilus natans</i> | Білок PilW, тип 4 | Транспортер катіонів | 2-алкеналь редуктаза | |
| <i>Beggiatoa alba</i> B18LD | Білок із TPR-повторами | Транспортер катіонів | Білок із PDZ-доменом | Серинова ендпротеаза DegQ-сімейства |
| <i>Thiothrix nivea</i> DSM 5205 | Білок із TPR-повторами | Транспортер катіонів | Білок із PDZ-доменом | |

Таблиця 4: Ефективність сорбції іонів Fe²⁺ магнітокерованого біосорбенту на основі мікроорганізмів активного мулу

| Сорбент | Час відбору проб, хв | Концентрація іонів Fe ²⁺ , мг/дм ³ | Ефективність вилучення Fe ²⁺ , % |
|--|----------------------|--|---|
| Активний мул, до якого не застосовували ВГМС | 0 | 12,9 ± 0,1 | – |
| | 5 | 0,181 ± 0,002 | 98,6 |
| | 10 | 0,271 ± 0,005 | 97,9 |
| | 20 | 0,258 ± 0,004 | 98,0 |
| | 30 | 0,232 ± 0,003 | 98,2 |
| Магнітокерована фракція активного мулу | 0 | 13,3 ± 0,1 | – |
| | 5 | 0,027 ± 0,001 | 99,8 |
| | 10 | 0,027 ± 0,001 | 99,8 |
| | 20 | 0,040 ± 0,002 | 99,7 |
| | 30 | 0,053 ± 0,002 | 99,6 |
| Немагнітокерована фракція активного мулу | 0 | 13,2 ± 0,1 | – |
| | 5 | 0,026 ± 0,001 | 99,8 |
| | 10 | 0,040 ± 0,002 | 99,7 |
| | 20 | 0,053 ± 0,002 | 99,6 |
| | 30 | 0,040 ± 0,002 | 99,7 |

Обговорення

Результати проведеного біоінформаційного аналізу мікроорганізмів активного мулу показали, що потенційними продуцентами БМН є всі 15 досліджених мікроорганізмів, геноми яких у базі даних GenBank NCBI розшифровано на чверть і більше.

Точно класифікувати можливо 12 представників із досліджених мікроорганізмів активного мулу (*Beggiatoa alba* B18LD, *Oscillatoria acuminata* PCC 6304, *Oscillatoria sp.* PCC 10802, *Oscillatoria nigro-viridis* PCC 7112, *Rivularia sp.* PCC 7116, *Anabaena sp.* CRKS33, *Anabaena sp.* WA113, *Anabaena sp.* AL93, *Anabaena sp.* PCC7108, *Anabaena* MDT 14b, *Thiothrix nivea* DSM 5205, *Duganella zoogloeoidea* ATCC 25935): вони є потенційними продуцентами внутрішньоклітинних кристалічних БМН і відносяться до 4-ї групи (див. табл. 1).

Для мікроорганізмів *Stentor coeruleus*, *Bodo saltans*, *Sphaerotilus natans* класифікація за властивостями та локалізацією БМН неможлива, адже їх геноми в базі даних GenBank NCBI секвеновано не повністю (див. табл. 1).

Результати порівняння функцій білків біомінералізації МТБ *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 та білків-гомологів мікроорганізмів активного мулу показали, що функції білків біомінералізації БМН групи Mam МТБ *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 та функції білків гомологів у мікроорганізмів активного мулу збігаються (див. табл. 3). Це дає підставу стверджувати про їх участь у процесах біо-

мінералізації в цих організмах. Ефективність вилучення важких металів активним мулом у цьому дослідженні корелює з дослідженнями, що проводилися раніше [1, 10, 15, 17]: всі вони показували ефективність 50–90 % залежно від типу металу та фізичних умов проведення сорбції.

Більшість мікроорганізмів активного мулу, що є потенційними продуцентами БМН, – це флокулянти. Зокрема, *Duganella zoogloeoidea*, *Beggiatoa alba* і *Thiothrix nivea* є найбільш типовими їх представниками, що присутні в переважній більшості мікробних композицій активного мулу в значній кількості. Оскільки флокулянти становлять основну масу мікроорганізмів активного мулу, то їх масова частка як потенційного МКБС у загальній біомасі може досягати 90–97 % [20].

Результати ефективності сорбції іонів Fe²⁺ МКБС на основі мікроорганізмів активного мулу експериментально підтверджують рівнозначність ефективності сорбції магнітокерованою, немагнітокерованою фракціями активного мулу та біомасою активного мулу, до якої не застосовували ВГМС. З урахуванням того, що магнітокерована фракція може бути відділена ВГМС у швидкісному режимі, більш доцільним є використання саме її як біологічного сорбенту. Отримані результати також дають підстави стверджувати доцільність подальших досліджень сорбції магнітокерованою фракцією активного мулу іонів інших металів з метою визначення ефективності комплексної сорбції.

Висновки

Методами порівняльної геноміки показано, що серед досліджених 15 мікроорганізмів активного мулу, геноми яких у базі даних GenBank NCBI розшифровані більш ніж на 25 %, усі 15 мікроорганізмів є потенційними продуцентами БМН, з них 12 представників (*Beggiatoa alba* B18LD, *Oscillatoria acuminata* PCC 6304, *Oscillatoria sp.* PCC10802, *Oscillatoria nigro-viridis* PCC 7112, *Rivularia sp.* PCC 7116, *Anabaena sp.* CRKS33, *Anabaena sp.* WA113, *Anabaena sp.* AL93, *Anabaena sp.* PCC7108, *Anabaena* MDT 14b, *Thiothrix nivea* DSM 5205, *Duganella zoogloeoides* ATCC 25935) є потенційними продуцентами внутрішньоклітинних кристалічних БМН. Для мікроорганізмів *Stentor*

coeruleus, *Bodo saltans*, *Sphaerotilus natans* класифікація за властивостями та локалізацією БМН неможлива, оскільки їх геноми в базі даних GenBank NCBI секвеновано не повністю.

Проведені дослідження показали, що ефективність сорбції іонів Fe^{2+} магнітокерованою, немагнітокерованою фракціями активного мулу та біомасою активного мулу, до якої не застосовували ВГМС, не відрізняється. Це дає підставу стверджувати, що використання магнітокерованої фракції активного мулу є перспективним, екологічно нешкідливим способом виготовлення сорбенту, який можна отримувати з відходів біомаси, зокрема з надлишкового активного мулу, що допоможе скоротити затрати на утримання водочисних споруд.

References

- [1] Aslan S, Yildiz S, Ozturk M. Biosorption of Cu^{2+} and Ni^{2+} ions from aqueous solutions using waste dried activated sludge biomass. *Pol J Chem Tech.* 2018;20(3):20-8. DOI: 10.2478/pjct-2018-0034
- [2] Yayintas OT, Yilmaz S, Turkoglu M, Dilgin Y. Determination of heavy metal pollution with environmental physicochemical parameters in waste water of Kocabas Stream (Biga, Canakkale, Turkey) by ICP-AES. *Environ Monit Assess.* 2007 Apr;127(1-3):389-97. DOI: 10.1007/s10661-006-9288-4
- [3] Pagnanelli F, Mainelli S, Bornoroni L, Dionisi D, Toro L. Mechanisms of heavy-metal removal by activated sludge. *Chmosphere.* 2009 May;75(8):1028-34. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.01.043
- [4] Gorobets SV, Kasatkina TP, Gorobets OYu, Ukrainetz AI, Goyko IYu. Intensification of copper and chrome ions sorption by yeast of *Saccharomyces cerevisiae* in the magnetic field. *Kharchova Promyslovist.* 2004;3:107-9.
- [5] Jianlong W, Yi Q, Horan N, Stentiford E. Bioadsorption of pentachlorophenol (PCP) from aqueous solution by activated sludge biomass. *Bioresour Technol.* 2000 May;75(2):157-61. DOI: 10.1016/S0960-8524(00)00041-9
- [6] Liu D, Tao Y, Li K, Yu J. Influence of the presence of three typical surfactants on the adsorption of nickel (II) to aerobic activated sludge. *Bioresour Technol.* 2012 Dec;126:56-63. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.09.025
- [7] Pamukoglu MY, Kargi F. Removal of copper(II) ions from aqueous medium by biosorption onto powdered waste sludge. *Process Biochem.* 2006 May;41(5):1047-54. DOI: 10.1016/j.procbio.2005.11.010
- [8] Wei D, Zhang K, Wang S, Sun B, Wu N, Xu W, et al. Characterization of dissolved organic matter released from activated sludge and aerobic granular sludge biosorption processes for heavy metal treatment via a fluorescence approach. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2017 March;124:326-33. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.03.018
- [9] Yuncu B, Sanin FD, Yetis U. An investigation of heavy metal biosorption in relation to C/N ratio of activated sludge. *J Hazard Mater.* 2006 Sep 21;137(2): 990-7. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2006.03.020
- [10] Zhou Y, Zhang Z, Zhang J, Xia S. New insight into adsorption characteristics and mechanisms of the biosorbent from waste activated sludge for heavy metals. *J Environ Sci.* 2016 Jul;45:248-56. DOI: 10.1016/j.jes.2016.03.007
- [11] Zhang Q, Hu J, Lee DJ, Chang Y, Lee YJ. Sludge treatment: Current research trends. *Bioresour Technol.* 2017 Nov;243:1159-72. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.07.070
- [12] Perez-Elvira SI, Nieto Diez P, Fdz-Polanco F. Sludge minimisation technologies. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 2006 Nov;5:375-98. DOI: 10.1007/s11157-005-5728-9
- [13] Nuhoglu Y, Oguz E. Removal of copper(II) from aqueous solutions by biosorption on the cone biomass of *Thuja orientalis*. *Prosess Biochem.* 2003 June 30;38:1627-31. DOI: 10.1016/S0032-9592(03)00055-4
- [14] Hammaini A, González F, Ballester A, Blázquez ML, Muñoz JA. Biosorption of heavy metals by activated sludge and their desorption characteristics. *J Environ Manage.* 2007 Sep;84(4):419-26. DOI: 10.1016/j.jenvman.2006.06.015
- [15] Kargi F, Cikla S. Biosorption of zinc(II) ions onto powdered waste sludge (PWS): Kinetics and isotherms. *Enzyme Microb. Technol.* 2006 March;38(5):705-10. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.11.005
- [16] Laurent J, Casellas M, Pons MN, Dagot C. Cadmium biosorption by ozonized activated sludge: The role of bacterial flocs surface properties and mixed liquor composition. *J Hazard Mater.* 2010 Nov 15;183(1-3):256-63. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2010.07.019

- [17] Ong SA, Toorisaka E, Hirata M, Hano T. Comparative study on kinetic adsorption of Cu(II), Cd(II) and Ni(II) ions from aqueous solutions using activated sludge and dried sludge. *Appl Water Sci.* 2013 March;3:321-25. DOI: 10.1007/s13201-013-0084-3
- [18] Rao PR, Bhargavi C. Studies on biosorption of heavy metals using pretreated biomass of fungal species. *Int J Chem Chem Eng.* 2013;3(3):171-80.
- [19] Yang C, Wang J, Lei M, Xie G, Zeng G, Luo S. Biosorption of zinc (II) from aqueous solution by dried activated sludge. *J Environ Sci.* 2010;22(5):675-80. DOI: 10.1016/S1001-0742(09)60162-5
- [20] Zhmur NA. Technological and biochemical processes of wastewater treatment at buildings with aeration tanks. Moscow: Aquaros; 2003. 512 p.
- [21] Sakaguchi T, Burgess JG, Matsunaga T. Magnetite formation by a sulphate-reducing bacterium. *Nature.* 1993;365:47-9. DOI: 10.1038/365047a0
- [22] Blakemore R. Magnetotactic bacteria. *Science.* 1975 Oct 24;190(4212):377-9. DOI: 10.1126/science.170679
- [23] Frankel RB, Blakemore RP, Wolfe RS. Magnetite in freshwater magnetotactic bacteria. *Science.* 1979 Mar 30;203(4387):1355-6. DOI: 10.1126/science.203.4387.1355
- [24] Bazylinski DA, Frankel RB. Magnetosome formation in prokaryotes. *Nat Rev Microbiol.* 2004 Mar;2(3):217-30. DOI: 10.1038/nrmicro842
- [25] Vainshtein M, Suzina N, Kudryashova E, Ariskina E. New magnet-sensitive structures in bacterial and archaeal cells. *Biol Cell.* 2002 Feb;94(1):29-35. DOI: 10.1016/S0248-4900(02)01179-6
- [26] Gorobets OYu, Gorobets SV, Sorokina LV. Biomineralization and synthesis of biogenic magnetic nanoparticles and magnetosensitive inclusions in microorganisms and fungi. *Funct Mater.* 2014;21(4):427-36. DOI: 10.15407/fm21.04.427
- [27] Gorobets SV, Mikhailenko NA. High-gradient ferromagnetic matrices for purification of wastewaters by the method of magnitoelectrolysis. *J Water Chem Technol.* 2014;36(4):153-9. DOI: 10.3103/S1063455X14040018
- [28] Gorobets SV, Mykhailenko NA, Makarchuk OV, Dontsova TA, Astrelin IM. Purification of aqueous media by magnetically operated saponite sorbents. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies.* 2015;4/10(67):13-20. DOI: 10.15587/1729-4061.2015.46573
- [29] Gorobets OYu, Gorobets SV, Gorobets YuI. Biogenic magnetic nanoparticles: biomineralization in prokaryotes and eukaryotes. In: *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology.* 3rd ed. New York: CRC Press; 2014. p. 300-8.
- [30] Gorobets OYu, Gorobets SV, Gorobets YuI. Biomineralization of intracellular biogenic magnetic nanoparticles and their expected functions. *Naukovi Visti NTUU KPI.* 2013;3:28-33.
- [31] Gorobets O, Gorobets S, Koralewski M. Physiological origin of biogenic magnetic nanoparticles in health and disease: from bacteria to humans. *Int J Nanomed.* 2017 Jun 12;12:4371-95. DOI: 10.2147/IJN.S130565
- [32] National Center for Biotechnology Information [Internet]. Bethesda, Maryland, U.S.: NCBI; 1988. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- [33] Ullrich S, Kube M, Schübbe S, Reinhardt R, Schöler D. A Hypervariable 130-kilobase genomic region of *Magnetospirillum gryphiswaldense* comprises a magnetosome island which undergoes frequent rearrangements during stationary growth. *J Bacteriol.* 2005 Nov; 187(21):7176-84. DOI: 10.1128/JB.187.21.7176-7184.2005
- [34] Schübbe S, Würdemann C, Peplies J, Heyen U, Wawer C, Glockner F, et al. Transcriptional organization and regulation of magnetosome operons in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Appl Environ Microbiol.* 2006 Sep;72(9):5757-65. DOI: 10.1128/AEM.00201-06
- [35] National Center for Biotechnology Information. BLAST Assembled Genomes [Internet]. Bethesda, Maryland, U.S.: NCBI; 1988. Available from: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>
- [36] Schüler D, Baeuerlein E. Iron-limited growth and kinetics of iron uptake in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch Microbiol.* 1996 Nov;166(5):301-7. DOI: 10.1007/s002030050387
- [37] Li W, Pio F., Pawłowski K, Godzik A. Saturated BLAST: an automated multiple intermediate sequence search used to detect distant homology. *Bioinformatics.* 2000 Dec;16(12):1105-10. DOI: 10.1093/bioinformatics/16.12.1105
- [38] Ukrainian Scientific Centre for the Protection of Waters. Guidance document 11.1.4.023-95. Method of determination of biochemical oxygen consumption after n days (BSC) in natural and sewage waters. Kyiv: Ukrainian Scientific Centre for the Protection of Waters; 1995.

С.В. Горобец, К.А. Гетманенко, Д.С. Пономаренко, А.В. Ковальцов, И.В. Боровик

ПОЛУЧЕНИЕ МАГНИТОУПРАВЛЯЕМОГО БИОСОБЕНТА НА ОСНОВЕ МИКРООРГАНИЗМОВ АКТИВНОГО ИЛА

Проблематика. Загрязнение тяжелыми металлами сточных вод характерно для многих сфер промышленности, и их удаление является важной проблемой для экологической безопасности окружающей среды. В качестве недорогого и экологически безопасного сорбента можно применять отходы биомассы, в частности излишки активного ила, утилизация которого часто являет-

ся основной статьей затрат на поддержание водоочистительных сооружений. Сорбенты с магнитными свойствами могут быть быстро и эффективно извлечены методом магнитной сепарации. Поскольку механизм биоминерализации биогенных магнитных наночастичек (БМН) един для представителей всех царств живых организмов, важно исследовать, какая часть микроорганизмов активного ила является потенциальными продуцентами БМН.

Цель. Цель работы состоит в поиске потенциальных продуцентов БМН среди микроорганизмов активного ила с использованием методов сравнительной геномики, а также в получении магнитоуправляемого биосорбента и исследовании его эффективности в извлечении ионов Fe^{2+} из раствора соли $FeSO_4$ (500 мг/л).

Методика реализации. Для оценки степени подобия белков биоминерализации биогенных магнитных наночастиц у бактерии *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 и микроорганизмов активного ила применены методы попарного и множественного выравнивания с использованием программы в свободном доступе BLAST (National Centre for Biotechnological Information, США). Для получения магнитоуправляемого биосорбента на основе активного ила использовали метод высокоградиентной магнитной сепарации (ВГМС).

Результаты. Проведенный биоинформационный анализ показал, что среди исследованных микроорганизмов активного ила, геномы которых в базе данных GenBank NCBI расшифрованы на 25 % и больше, потенциальными продуцентами БМН оказались все микроорганизмы (*Stentor coeruleus*, *Bodo saltans*, *Sphaerotilus natans*, *Beggiatoa alba* B18LD, *Oscillatoria acuminata* PCC 6304, *Oscillatoria sp.* PCC 10802, *Oscillatoria nigro-viridis* PCC 7112, *Rivularia sp.* PCC 7116, *Anabaena sp.* CRKS33, *Anabaena sp.* WA113, *Anabaena sp.* AL93, *Anabaena sp.* PCC7108, *Anabaena MDT 14b*, *Thiothrix nivea* DSM 5205, *Duganella zoogloeooides* ATCC 25935). Среди них 12 микроорганизмов – потенциальные продуценты внутриклеточных кристаллических БМН. Показано, что эффективность сорбции Fe^{2+} биомассой активного ила, не разделенной на высокоградиентном магнитном сепараторе, магнитоуправляемой и немагнитоуправляемой фракциями активного ила не отличается.

Выводы. Результаты проведенных исследований показали, что из отходов биомассы, в частности из избыточного активного ила, можно создать магнитоуправляемый сорбент без дополнительного магнитомечения искусственными наночастицами, что позволяет извлекать этот сорбент методами ВГМС в скоростном режиме. Результаты исследования сорбции ионов Fe^{2+} МУБС на основе микроорганизмов активного ила экспериментально подтверждают равнозначность эффективности сорбции магнитоуправляемой, немагнитоуправляемой фракциями активного ила и биомассой, к которой не была применена ВГМС; эффективность сорбции составляет более 97 %.

Ключевые слова: активный ил; биогенные магнитные наночастицы; биоминерализация; *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1; Мам-белки; биосорбция; магнитоуправляемый биосорбент; высокоградиентная магнитная сепарация.

S.V. Gorobets, K.A. Hetmanenko, D.S. Ponomarenko, O.V. Kovalyov, I.V. Borovyk

ACTIVATED SLUDGE BIOMASS AS MAGNETIC BIOSORBENT

Background. Heavy metal pollution is a typical issue for a number of industries, and their removal is crucial for the environmental ecology. Biomass can be used as cheap and eco-friendly sorbent, for example excess activated sludge, because its utilization is a major expense in water treatment. Sorbents with magnetic properties can be extracted using fast and efficient magnetic separation method. Mechanism of biomineralization biogenic magnetic nanoparticles (BMN) is proved to be general for all three domains, so it is important to study what amount of activated sludge microorganisms are potential BMN producers.

Objectives. The objective of this study is to determine potential BMN producers among microorganisms of activated sludge using methods of comparative genomics, to obtain magnetic biosorbent and investigate its efficiency in Fe^{2+} removal from $FeSO_4$ solution (500 mg/L).

Methods. For estimating homologies between biomineralization proteins of *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 and microorganisms of activated sludge were used methods of pairwise and multiple genomic sequence alignment using free access tool BLAST (National Centre for Biotechnological Information, USA). For obtaining magnetic sorbent from activated sludge biomass high gradient magnetic separation was used.

Results. Bioinformatic analysis showed, that among studied microorganisms of activated sludge, whose genomes are sequenced per 25% and more, all appeared to be potential BMN producers (*Stentor coeruleus*, *Bodo saltans*, *Sphaerotilus natans*, *Beggiatoa alba* B18LD, *Oscillatoria acuminata* PCC 6304, *Oscillatoria sp.* PCC 10802, *Oscillatoria nigro-viridis* PCC 7112, *Rivularia sp.* PCC 7116, *Anabaena sp.* CRKS33, *Anabaena sp.* WA113, *Anabaena sp.* AL93, *Anabaena sp.* PCC7108, *Anabaena MDT 14b*, *Thiothrix nivea* DSM 5205, *Duganella zoogloeooides* ATCC 25935), 12 of them – potential producers of intracellular crystalline BMN. It was shown, that Fe^{2+} removal efficiency is equal for non-separated activated sludge and both magnetic and non-magnetic fractions.

Conclusions. Results show that excess sludge biomass can be used to obtain magnetic sorbent, which can be made without the use of extra magnetization with artificial magnetic nanoparticles. This allows extracting sorbent using methods of high gradient magnetic separation. Sorption results of Fe^{2+} for magnetically labelled biosorbent on the base of activated sludge microorganisms experimentally proves equal efficiency of magnetically labelled, non-labelled fractions and biomass which was not exposed to HGMS and is higher than 97%.

Keywords: activated sludge; magnetic nanoparticles; biomineralization; *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1; Mam-proteins; biosorption, magnetic sorbent; high gradient magnetic separation.