

ВПЛИВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА ПРОЦЕСИ АНАЕРОБНОГО ЗБРОДЖУВАННЯ БІОМАСИ АСОЦІАЦІЄЮ АНАЕРОБНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

Н.Б. Голуб¹, А.В. Шинкарчук^{1*}, О.А. Козловець², Ш. Синьхуа³

¹КПІ ім. Ігоря Сікорського, Київ, Україна

²ТОВ “Аква Форсайт”, Київ, Україна

³Інститут нових матеріалів Шаньдунської академії наук, Дзінань, КНР

*Corresponding author: d.m.shav@gmail.com

Received 10 November 2020; Accepted 21 December 2020

Важкі метали, що потрапляють у навколишнє середовище, мають негативний вплив на розвиток живих організмів і родючість ґрунтів. Використання біомаси, одержаної на таких ґрунтах, як субстрату для продукування біогазу є проблематичним, оскільки важкі метали впливають на асоціацію мікроорганізмів-деструкторів та продуцентів метану і, відповідно, на вихід біогазу. Саме тому актуальним є питання впливу окремих іонів металів та їх концентрацій у середовищі на розвиток анаеробної асоціації для виробництва біогазу. Робота присвячена узагальненню досліджень щодо впливу сполук важких металів на процес анаеробного зброджування біомаси та визначення їх граничних концентрацій для функціонування анаеробної асоціації мікроорганізмів. Аналіз літературних джерел показав, що додавання до робочого середовища солей важких металів впливає на процес анаеробного зброджування, який залежить від форми внесеного металу, його концентрації, попередньої адаптації асоціації мікроорганізмів до металу. Вихід біогазу залежить від концентрації елемента, що досліджувався, та наявності інших елементів у субстраті. Досліджено, що допустимі для біосинтезу біогазу концентрації іонів металів становлять: для феруму – 20 г/л Fe⁰ або 500 мг/л K₂FeO₄; для хрому – 50 мг/л Cr³⁺; для купруму – 40 мг/л CuCl₂; для цинку – 40 мг/л ZnCl₂. Отримані в процесі аналізу літератури дані щодо впливу різних концентрацій важких металів на анаеробний процес зброджування дадуть змогу змодельювати та проводити дослідження впливів як окремих іонів важких металів, так і їх комбінації на біотехнологію переробки відходів, що містять такі металами.

Ключові слова: важкі метали; залізо; мідь; цинк; хром; анаеробні мікроорганізми; біогаз.

Вступ

Одним із видів антропогенного навантаження на довкілля є забруднення важкими металами, які токсичні для живих організмів. Термін “важкі метали” позначає метали та металоїди, що мають щільність більше 5 г/см³ [1]. Найпоширенішими забрудниками серед важких металів є: кадмій (Cd), хром (Cr), мідь (Cu), залізо (Fe), свинець (Pb), нікель (Ni) і цинк (Zn), які потрапляють у водойми та ґрунт із газовими викидами та стічними водами підприємств різних галузей промисловості [2–6]. У той же час такі елементи, як ферум, цинк, купрум, кобальт, молібден, ванадій у невеликих кількостях є необхідними для розвитку та підтримання життєдіяльності організмів, оскільки входять до складу ферментів чи активують їх або ж утворюють комплекси з біологічно активними речовинами для прояву їх дії [7].

Токсичність важких металів залежить головним чином від концентрації, ступеня окис-

нення та класу речовини, в якій міститься метал [2]. Також на прояв токсичності впливають такі фактори, як температура, величина редокс-потенціалу розчину (Eh), конкуруючі катіони або аніони, рН, від значення якого залежить розчинність речовини [3, 4]. Сполуки важких металів мають різні механізми впливу на мікроорганізми [5]:

– метали можуть взаємодіяти з електронно-донорними (гідроксильними, карбоксильними, аміно- та сульфгідрильними) групами органічних сполук, змінюючи їх структуру та впливаючи на їх біологічну дію [7];

– метали можуть здійснювати незворотне заміщення двовалентних катіонів активних центрів ферментних систем та інших компонентів клітин, що спричинює пригнічення росту та загибель мікроорганізмів [8];

– метали-окисники чинять шкідливу дію на мікроорганізми за рахунок незворотного окиснення ферментів і структурних компонентів клітин [9];

– метали можуть виступати в ролі анти-метаболітів, інактивуючи їх або прискорюючи їх катаболізм [10];

– важкі метали порушують функції цитоплазматичної мембрани, процесів фотосинтезу й азотфіксації тощо [6, 11].

Найбільш токсичними вважають [5] метали комбінованої дії (тобто ті, які проявляють здатність до заміщення та окиснення), до яких відноситься мідь за рахунок високих значень окисно-відновного потенціалу і здатності до заміщення катіонів у активних центрах ферментів і клітинних структурах.

Вплив важких металів на процес анаеробного зброджування пов'язаний з інгібуванням анаеробної асоціації мікроорганізмів за усіма перерахованими механізмами за рахунок неконтрольованих концентрацій сполук, які містять метали, у сировині, яка зброджується. Через складність анаеробної системи важкі метали можуть бути залучені до багатьох фізико-хімічних процесів, включаючи осадження у вигляді сульфідів (окрім Cr^{3+}), карбонатів і гідроксидів; сорбцію на твердій фракції; формування комплексів у розчині з проміжними метаболітами, субстратами та продуктами, що утворюються під час зброджування; зв'язування з клітинною стінкою бактерій тощо [2].

Стійкість мікроорганізмів до впливу важких металів залежить від їх вмісту в середовищі існування, тобто відбувається адаптація клітин до підвищених концентрацій іонів металів. Стійкість до важких металів може бути конститутивною або індукованою ознакою [12]. Гени, які визначають механізм стійкості, містяться або в хромосомі, або, найчастіше, в плазмідах (плазмідні гени визначають стійкість до CrO_4^{2-} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} та ін.) [3].

Аналіз впливу дії важких металів на продукування відновлюваного джерела енергії – метану – є підґрунтям для створення технології утилізації відходів, що містять важкі метали, з одночасним одержанням біогазу та зниженням антропогенного навантаження на довкілля. Вибір металів обумовлений тим, що вони є одними з найбільш токсичних і поширених та поєднують у собі всі відомі механізми пригнічення металами розвитку мікроорганізмів.

Метою нашої роботи є узагальнення досліджень щодо впливу сполук важких металів на процес анаеробного зброджування біомаси та визначення граничних концентрацій для функціонування анаеробної асоціації мікроорганізмів.

Ферум

Роль феруму в життєдіяльності анаеробної асоціації мікроорганізмів проявляється в його наявності та біологічній дії у складі ферментів: ланцюга перенесення електронів, гідрогеназ, СО-дегідрогенази, метан монооксигенази, NO-редуктази, супероксиддисмутази, нітрит і нітрат редуктаз, нітрогенази тощо [13].

Найбільш прийнятний механізм біодоступності металу заліза пов'язаний із корозією. H_2 , який утворюється, може бути використаний для відновлення CO_2 до метану гідрогенотрофними метаногенами, такими як *Methanococcus thermolithotrophicus*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanospirillum hungatei* [14]. При акумуляції заліза в середовищі мікроорганізми інкапсулюють метал, що може призвести до пошкодження клітинної структури. Концентрація Fe^0 50 г/л є несумісною з розвитком та життєдіяльністю мікроорганізмів [14].

Крім стимулювання анаеробної біодеградації, додавання заліза в біореактор може забезпечити абіотичний спосіб видалення забруднень: редокс-чутливі сполуки можуть відновлюватися безпосередньо на поверхні заліза [14].

Позитивний вплив на життєдіяльність анаеробної асоціації мікроорганізмів при виробництві біогазу мають концентрації іону феруму в межах 4–150 мг/л [15–19]. Так, додавання 500 мг/л K_2FeO_4 до мулу при його анаеробній ферментації підвищує вихід біогазу та метану на 26,6 і 28,4 % відповідно. Додавання ферату калію сприяло кращому розкладанню білків та ефективності конверсії розчинених органічних речовин. Також зменшується вміст H_2S у біогазі, що впливає на вартість десульфурації біогазу [15].

Підвищення швидкості гідролізу та виробництва метану відбувається при анаеробному зброджуванні мулу за додавання заліза [16]. Показано, що додавання заліза підвищує швидкість розкладу білків і целюлози, які є основними компонентами мулу. Порівняно з контрольним зразком при додаванні металу гідроліз білків збільшується на 21,9 %, продукування летких жирних кислот зростає на 37,3 %, виробництво метану – на 43,5 %, коефіцієнт утилізації мулу – на 12,2 %. При цьому на стадії ацидогенезу підвищується кількість ацетату та зменшується частка пропіонату. За допомогою флюоресцентного аналізу було показано, що при додаванні заліза кількість мікроорганізмів, які споживають водень, включаючи гомоацетогени та гідрогенотрофні метаногени, була

вищою, ніж у контрольному зразку, що також призводить до підвищення виходу метану.

Вплив іонів феруму на вихід біогазу також залежить і від класу та форми сполуки, до складу якої входить залізо. При додаванні 20 г/л заліза або 10 г/л магнетиту Fe_3O_4 спостерігається підвищення виходу метану на 20 і 26 % відповідно (з 264,9 до 334,5 мл/г СОР (сухої органічної речовини)) при ферментації 100 г/л свинячого гною протягом 30 діб. Найбільший вихід біогазу та метану характерний за застосування одночасно заліза та магнетиту. За таких умов магнетит сприяє підвищенню виробництва метану за рахунок прямого міжвидового переносу електронів у процесі анаеробного зброджування за наявності заліза. Також встановлено, що додавання заліза зменшує біодоступність йонів Cu^{2+} і Zn^{2+} для засвоювання мікроорганізмами [17].

Додавання одночасно металів заліза та мангану також призводить до посилення гідролізу, метаногенезу та зниження кількості летких жирних кислот у UASB-реакторі [18]. Вихід метану підвищується в 1,45 разу за вмісту 4 г/л заліза та 20 г/л мангану.

У роботі [19] встановлено, що Fe^{2+} у концентрації до 8,1 ммоль/л позитивно впливає на швидкість використання субстрату, яка зростає на 40 % порівняно з контролем (UASB-реактор, 0,25 г ХСК (хімічного споживання кисню)/г VSS (volatile suspended solids) за добу). Однак підвищення концентрації Fe^{2+} до 8,5 ммоль/л гальмує швидкість використання субстрату на 57 % порівняно з процесом при застосуванні 4,0 ммоль/л Fe^{2+} (0,44 г ХСК/г VSS за добу).

Також іони феруму (III) впливають на грануляцію анаеробного мулу за рахунок того, що вони виступають центрами утворення гранул, сприяють збільшенню діаметра гранул та покращенню його зернистості, що приводить до стабілізації швидкості процесу конверсії забруднення за навантаження UASB-реактора від 1,4 до 10,0 г ХСК/л [20].

Інгібування життєдіяльності мікроорганізмів оксидом феруму (II) може бути спричинене його високими концентраціями і, як наслідок, підвищенням значення рН, викликаним корозією, що призводить до умов, які є несумісними з розвитком бактерій [21].

Хлорид заліза (III) використовується як домішка в промисловому виробництві біогазу для осадження сірки, а також для збагачення дігестату, оскільки відомо, що використання дігестату, в якому залізо міститься у великій

кількості, як добрива має свої переваги. Ферум є одним із найважливіших мікроелементів у рості та розвитку рослин та сприяє збільшенню врожаю сільськогосподарських культур [22]. Застосування 5 кг FeSO_4 /га підвищує урожайність твердої пшениці [23]. За сумісного використання з фосфатним добривом 75 кг P_2O_5 /га і 5 кг FeSO_4 /га підвищує урожай зерна твердої пшениці до 3,92 т/га [24].

Отже, додавання іонів феруму в анаеробний реактор у кількості 150–450 мг/л, залежно від складу солі, сприяє переробці сировини та підвищує вихід біогазу, в той час як перевищення вказаної концентрації іонів призводить до інгібування процесу метаногенезу. Негативний вплив високих концентрацій іонів феруму, можливо, пов'язаний із недостатнім надходженням до клітин інших важливих для розвитку та життєдіяльності мікроелементів, таких як цинк, купрум, магній.

Сполуки заліза (метал і магнетит) у значних концентраціях (10 г/л і більше) підвищують виробництво біогазу, що пов'язано з поступовою розчинністю сполуки.

Хром

Хром може існувати в декількох станах окиснення [25]. Найбільш стійкими формами хрому в природному середовищі є Cr(III) та Cr(VI) [26, 27], які мають різну біологічну активність. Cr(III) – важливий мікроелемент, необхідний для метаболізму глюкози, ліпідів й амінокислот, однак у високих концентраціях чинить негативний вплив на клітинні структури. Також іони хрому відіграють регуляторну роль у процесах реплікації та транскрипції в мікроорганізмах [29–33]. При додаванні до середовища хром-метіоніну (III) в концентрації 0,5–1,5 ммоль/л спостерігається активація анаболічних процесів, целюлозо- й амілолітичної активності, росту клітин мікроорганізмів, унаслідок чого збільшується їх маса [34]. Хлорид хрому (III) в концентраціях до 1,0 ммоль/л підвищує приріст біомаси клітин. Підвищення концентрації солей хрому (III) до 2,5 ммоль/л призводить до інгібування гідролітичних процесів та росту клітин.

В анаеробних умовах Cr(VI) може слугувати кінцевим акцептором електронів у дихальному ланцюзі для великого спектра донорів електронів, включаючи вуглеводи, білки, жири, водень, НАД(Ф)Н [26], причому участь у процесі відновлення Cr(VI) в анаеробних умовах

беруть як цитоплазматичні, так і мембранні ферменти [28]. Cr(VI) у 1000 разів токсичніший та мутагенніший, ніж Cr(III), за рахунок здатності до окиснення сполук [35].

У природні водойми сполуки хрому надходять унаслідок недостатнього очищення стічних вод. Хром міститься в промислових стічних водах найчастіше у формі хромату та дихромату. У факультативних та облігатних анаеробах хромат (CrO_4^{2-}) інгібує шлях збродження глюкози за рахунок самовідновлення, завдяки чому відбувається підвищення редокс-потенціалу (від -300 до $+100$ мВ), зниження швидкості росту і загибель клітин [36].

Відновлення Cr(VI) з хромату (CrO_4^{2-}) до $\text{Cr}(\text{OH})_3$ можливе за нейтрального значення рН, оскільки для реакції характерне значення $E_0 = +555$ мВ (при рН 7) і процес проходить у зоні термодинамічної стійкості води (від $+814$ до -414 мВ) [36, 37].

Одним із виробництв, що продукує хромовмісні відходи, є шкіряна промисловість [38, 39]. Високі концентрації сполук хрому спричиняють інгібування процесу збродження. В роботі [40] показано, що вихід біогазу при ферментації відходів, які містять іони хрому (III) у вигляді дубильних сполук у концентрації 790 мг/л, на 20 % менший порівняно з виходом біогазу з відходів без хрому. Ферментацію подрібнених відходів проводили на основі анаеробного мулу з UASB-реактора очистки стічних вод шкіряного виробництва. Однак введення в реактор комплексоутворювачів – щавлевої кислоти й етилендіамін тетраоцтової кислоти – при збродженні хромовмісних відходів підвищує вихід біогазу на 40 % відносно контрольного зразка. Тобто при утворенні комплексів відбувається уповільнене надходження іонів хрому в середовище, що приводить до інтенсифікації процесу утворення біогазу.

Коферментація є одним із найбільш раціональних варіантів одержання біогазу при використанні сировини, яка містить інгібуючі концентрації важких металів. Так, введення косубстрату (відходів рису) при анаеробній переробці хромовмісних відходів шкіряної промисловості (мокрої стружки та осаду від локальної установки очистки стічних вод) підвищує вихід метану в два рази за рахунок зменшення загального вмісту хрому в сировині [41]. Таким чином, іони хрому (III) у незначній кількості

мають стимулюючий вплив на виробництво метану. Вихід біогазу при збродженні хромовмісного осаду з очисних споруд шкіряного заводу підвищується за використання розведення осадами, які не містять іонів хрому (що сприяє мінімізації інгібіторного ефекту), вищої концентрації бактерій при безперервному перемішуванні [42].

Вважається, що мінімальний вміст хрому, який використовується мікроорганізмами як мікроелемент для забезпечення їх розвитку, становить 0,005–50 мг/л залежно від видів та їх попередньої адаптації. Інгібуючою кількістю є вміст у середовищі 28–300 мг/л, а вміст 500 мг/л є токсичним для мікроорганізмів, що призводить до призупинення життєдіяльності та загибелі клітин [43].

Толерантні до хрому мікроорганізми можуть розвиватись за вмісту його в середовищі до 1500 мг/л Cr^{6+} [44]. Мікроорганізми родів *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Acidithiobacillus*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Rhodococcus* та інших можуть здійснювати ефективне відновлення Cr(VI) до Cr(III) [45–47]. Також зниження впливу сполук хрому на мікроорганізми відбувається за рахунок використання ними метаболітів, адсорбції, абсорбції або внутрішньоклітинного накопичення всередині клітини [26].

Купрум і цинк

Відносно іонів цинку мікроорганізми використовують малу кількість ферментів, для яких купрум є кофактором, що, ймовірно, пов'язано з еволюцією, оскільки ферменти, які містять іони Cu(II), з'явилися після критичноокисних захисних ферментів, таких як супероксиддисмутаза та каталаза [48]. В аеробних і факультативно аеробних бактеріях Cu^{2+} також входить до складу білків пластоціаніну, нітросоціаніну, азурину та периплазматичного домену цитохрому з оксидасесуніту (оксидасесуніт II) [49].

Бактерії жорстко регулюють концентрацію цитоплазматичного Cu^{2+} , щоб мінімізувати його токсичну дію, забезпечуючи при цьому достатню кількість протеїнів, які містять купрум (Cu-протеїнів). Своєю чергою Cu-протеїни у бактерій є периплазматичними або позаклітинними, а не цитоплазматичними [50]. Якщо вміст Cu^{2+} стає надто високим для життєдіяльності мікроорганізмів, відбувається включення механізмів захисту клітин:

1) Cue (Cu efflux) система – приводить до зміни конформації периплазматичних білків, що спричиняє трансмембранний експорт Cu^{2+} із бактеріальної клітини в периплазматичний простір або у позаклітинне середовище [51];

2) CsoR (copper sensitive operon) система – приводить до гіперрезистентності до токсичної кількості Cu^{2+} за рахунок пошкодження генів репресорів або регуляторів [52];

3) окиснення Cu (I) для отримання менш токсичного іона Cu (II) [53].

Катіон Cu^{2+} є високопотенційним окисником ($E^0(\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^0) = +338$ мВ). Він також здатний до заміщення двовалентних металів у активних центрах ферментів [50]. Іони Cu (II) можуть відновлюватися мікроорганізмами до Cu (I) і Cu (0) (для редокс-систем, утворених Cu (II), Cu (I), характерні більш низькі значення стандартних потенціалів – +160 мВ для $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ та +518 мВ для Cu^+/Cu^0 [53].

Іони купруму здатні до утворення нерозчинних сполук – сульфідів, фосфатів і карбонатів, можуть взаємодіяти з метаболітами як зовнішніми, так і внутрішніми, що утворюються при переробці субстратів асоціацією мікроорганізмів. Також можуть утворюватися як розчинні комплексні сполуки, так і осади [54].

Мінімальна концентрація іонів купруму як мікроелемента для різних видів мікроорганізмів може варіювати (від 0,01 до 0,3 мг/л). Надлишок іонів купруму впливає на зміну амінокислотного складу пептидів клітинних оболонок бактерій, що впливає на мембранні бар'єри клітин [50–53]. Інгібуючий для клітин вміст іонів купруму в слабкислому середовищі для різних видів коливається в межах 5–150 мг/л, при цьому вміст у середовищі 170–300 мг/л для мікроорганізмів є летальним [43]. Адаптований штам *Cupriavidus gilardii* розвивається за концентрації 400 мг/л [55]. Відома здатність адаптації до високих концентрацій іонів купруму анаеробних асоціацій мікроорганізмів: зброжений осад метантенка стійкий до концентрації 10,0 г/л Cu^{2+} [9].

Додавання CuCl_2 у кількості 10 і 20 мг/л до модельованої стічної води з молочною сироваткою при збродженні за використання змішаної культури метаногенів, збагаченої аеробним осадом стічних вод із виробництва напоїв, зменшує виробництво метану на 21 і 50 % відповідно порівняно з контрольним зразком. Також зменшується якість очищення стічної води. При додаванні 30–40 мг/л CuCl_2 відбувається повне інгібування процесу метаногенезу, а

при 50 мг/л – інгібування спостерігається на стадії ацидогенезу [56].

На процес метаногенезу за високих концентрацій іонів купруму впливають такі фактори, як наявність у середовищі хелатуючих агентів (інгібуючий ефект спостерігається за більш високих концентрацій), щільність мікроорганізмів (із підвищенням концентрації мікроорганізмів підвищується максимально допустимий вміст солі), рН (за нейтрального значення чи незначного залуговування підвищується допустима концентрація іонів купруму), співвідношення іонів феруму та купруму (чим більший вміст іонів феруму, тим вище значення інгібуючої концентрації іонів міді).

Zn входить до складу ферментів, які впливають на фосфатний, вуглеводний, білковий обмін, синтез РНК і рибосом та регуляцію окисно-відновного потенціалу клітин (гідрогенази, форміат дегідрогенази, супероксид дисмутази тощо), він є стабілізатором компонентів мембран, визначаючи їх реактивність [6, 13, 57]. Мінімальна необхідна концентрація цинку для різних видів мікроорганізмів коливається в широких межах. Інгібуючий вміст іонів цинку в середовищі – 3–400 мг/л, токсичний – 250–600 мг/л залежно від видів мікроорганізмів та умов існування [43].

Введення 40 мг/л ZnCl_2 у розчин імітованих стічних вод на основі порошку сироватки (ХСК 33 г/л) знижує вихід метану на 50 % [56]. Однак навіть високі концентрації (120–200 мг/л) хлориду цинку не призводять до повного інгібування метаногенезу чи ацидогенезу, при цьому вважається, що ацидогени більш стійкі до токсичної дії важких металів, ніж метаногени [2].

У дослідженні [58] показано, що концентрація 1,9 мкмоль/л (CuSO_4) зменшувала ріст *Methanococcus maripaludis* на живильному середовищі m141. З підвищенням концентрації відбувається зниження виробництва біомаси. Також збільшення концентрації CuSO_4 (1,9; 4,4 і 6,3 мкмоль/л) призводить до зменшення швидкості виробництва метану ($0,49 \pm 0,22$; $0,31 \pm 0,13$ і $0,181 \pm 0,004$ $\frac{\text{ммоль}}{\text{г} \cdot \text{год}}$ відповідно). Концентрація

1,0 ммоль/л ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) підвищує приріст біомаси *Methanococcus maripaludis*. За концентрацій $\text{Zn} > 2,4$ ммоль/л росту культури не спостерігалось.

Доведено, що підвищення концентрації іонів цинку (1,0 ммоль/л) підвищує здатність культури метаногенів протидіяти токсичній дії

іонів Cu (II) [58]. За одночасної дії підвищених концентрацій іонів Cu^{2+} (6,3 мкмоль/л CuSO_4) і Zn^{2+} (2,4 ммоль/л $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) на *Methanococcus maripaludis* спостерігається ріст культури і продукування CH_4 . Швидкість продукування метану культурою при додаванні 1,0 ммоль/л Zn та 1,9 мкмоль/л Cu зростає більш ніж удвічі й становить $1,07 \pm 0,31$ ммоль/г·год.

Також у роботі [59] показано стійкість бактерії *Metallosphaera sedula* до дії іонів купруму до концентрації 16 ммоль.

Дослідження впливу мінімальних концентрацій важких металів на мезофільні та термофільні умови анаеробного процесу зброджування [60] показало, що у випадку термофільного зброджування живильного середовища на основі глюкози (температура зброджування 55–57 °C) необхідний більший вміст заліза та цинку (4,3 і 2,3 мг/л відповідно) відносно мезофільних умов (температура зброджування 35–37 °C, 1,9 та 0,47 мг/л заліза та цинку відповідно).

Встановлено [2, 17, 46, 56], що дія важких металів (міді, цинку, хрому та феруму) більше впливає на ацетогенні метаногени, ніж на гідрогенотрофні. Також наявність важких металів у середовищі сильніше пригнічує метаногенні мікроорганізми, ніж ацидогенні.

References

- [1] Mudhoo A, Kumar S. Effects of heavy metals as stress factors on anaerobic digestion processes and biogas production from biomass. *Int J Environ Sci Technol*. 2013;10:1383-98. DOI: 10.1007/s13762-012-0167-y
- [2] Zayed G, Winter J. Inhibition of methane production from whey by heavy metals - protective effect of sulfide. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2000;53:726-31. DOI: 10.1007/s002530000336
- [3] Cirne DG, Paloumet X, Bjornsson L, Alves MM, Mattiasson B. Anaerobic digestion of lipid-rich waste: effects of lipid concentration. *Renew Energy*. 2007;32:965-75. DOI: 10.1016/j.renene.2006.04.003
- [4] Abou-Shanab RAI, Van Berkum P, Angle JS. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere*. 2007;68(2):360-7. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2006.12.051
- [5] Tashirev AB, Romanovskaya VA, Rokitko PV, Tashireva AA. Multiple resistance to toxic metals of microorganisms in Antarctic cliffs (Galindez Island). *Ukrainskyi Antarktychnyi Zhurnal*. 2012;10-11:212-21. DOI: 10.33275/1727-7485.10-11.2012.301
- [6] Fashola M, Ngole-Jeme V, Babalola O. Heavy metal pollution from gold mines: environmental effects and bacterial strategies for resistance. *Int J Environ Res Public Health*. 2016;13(11):1047. DOI: 10.3390/ijerph13111047
- [7] Bertini I, Gray HB, Lippard SJ, Valentine J. *Bioinorganic chemistry*. Mill Valley: University Science Books; 1994. 611 p.
- [8] Tashirev AB. Interaction of microorganisms with metals. *Mikrobiologichnyi Zhurnal*. 1994;56(60):89-100.
- [9] Tashirev AB, Galinker EV, Andreyuk EI. Thermodynamic prediction of redox interaction of microorganisms with oxidizing metals (Hg^{2+} , CrO_4^{2-} and Cu^{2+}). *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine*. 2008;4:166-72. Available from: http://nbuv.gov.ua/UJRN/dnanu_2008_4_32
- [10] Gubsky YI. *Biological chemistry*. Kyiv, Ternopil: Ukrmedknyha; 2000. 507 p.
- [11] Topchiiy NM. Influence of heavy metals on photosynthesis. *Physiol Biochem Cult Plants*. 2010;42(2):95-106.
- [12] Ianieva O. Mechanisms of bacteria resistance to heavy metals. *Mikrobiologichnyi Zhurnal*. 2009;71:54-65.
- [13] Dincă M, Moiceanu G, Paraschiv G, Voicu G, Ungureanu N, Toma L, et al. The influence of heavy metals on biogas production during the anaerobic digestion process. In: *Proceedings of the 3rd International Conference on Thermal Equipment, Renewable Energy and Rural Development*; 2014 June 12-14; Mamaia (Romania): University "Politehnica" of Bucharest.

Висновки

Наявність іонів важких металів (феруму, хрому, купруму та цинку) в середовищі залежно від їх кількості має як позитивний, так і негативний вплив на продукування біогазу анаеробною асоціацією мікроорганізмів. Вихід біогазу та метану залежить від складу сполуки, у формі якого міститься іон металу; наявних у середовищі комплексоутворювачів та інших сполук, що змінюють біодоступність іонів; попередньої адаптації асоціації мікроорганізмів до підвищеного вмісту в середовищі іонів даного металу.

Для різних видів анаеробних мікроорганізмів та їх асоціацій існує діапазон вмісту іонів важких металів у середовищі існування, який не впливає негативно на продукування біогазу: для іонів феруму – 4–150 мг/л, оксидів – до 10 г/л, металу – до 20 г/л; для Cr^{3+} – 28–50 мг/л; для Cu^{2+} – 0,3–5 мг/л, для Zn^{2+} – 5–20 мг/л.

На сьогодні не з'ясовано впливу іонів важких металів, які містяться в рослинах, що слугують субстратом для отримання біогазу, тому ця тематика є напрямом для подальших досліджень.

- [14] Wu D, Zheng S, Ding A, Sun G, Yang M. Performance of a zero valent iron-based anaerobic system in swine wastewater treatment. *J Hazard Mater.* 2015;286:1-6. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2014.12.029
- [15] Liu S, Yang G, Fu J, Zhang G. Synchronously enhancing biogas production, sludge reduction, biogas desulfurization, and digestate treatment in sludge anaerobic digestion by adding K_2FeO_4 . *Environ Sci Pollut Res Int.* 2018;25:35154-63. DOI: 10.1007/s11356-018-3438-4
- [16] Feng Y, Zhang Y, Quan X, Chen S. Enhanced anaerobic digestion of waste activated sludge digestion by the addition of zero valent iron. *Water Res.* 2014;52:242-50. DOI: 10.1016/j.watres.2013.10.072
- [17] Liang YG, Li XJ, Zhang J, Zhang LG, Cheng B. Effect of microscale ZVI/magnetite on methane production and bioavailability of heavy metals during anaerobic digestion of diluted pig manure. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2017;24(13):12328-37. DOI: 10.1007/s11356-017-8832-9
- [18] Daddenavar KS, Manganure SA, Hiremath GM. Effect of elemental metals on methanogenesis by treating dairy wastewater. *Int Res J Eng Technol.* 2018;5(7):632-6.
- [19] Gonzalez-Silva BM, Briones-Gallardo R, Razo-Flores E, Celis LB. Inhibition of sulfate reduction by iron; cadmium and sulfide in granular sludge. *J Hazard Mater.* 2009;172:400-7. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2009.07.022
- [20] Vlyssides A, Barampouti EM, Mai S. Influence of ferrous iron on the granularity of a UASB reactor. *Chem Eng J.* 2009;146:49-56. DOI: 10.1016/j.cej.2008.05.011
- [21] Jose MFS, Eric JS, Pedro JJA. Effect of Fe^0 quantity on the efficiency of integrated microbial- Fe^0 treatment processes. *Chemosphere.* 2004;54:823-9. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2003.08.037
- [22] Abbas G, Khan MQ, Khan MJ, Hussain F, Hussain I. Effect of iron on the growth and yield contributing parameters of wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Animal Plant Sci.* 2009;19(3):135-9.
- [23] Ananda N, Patil BN. Influence of zinc, iron and time of nitrogen application on growth, yield and quality of durum wheat. *Karnataka J Agricult Sci.* 2005;18(3):599-603.
- [24] Nataraja TH, Halepyati BK, Desaiand BT. Interactive effect of phosphorus, zinc, and iron on the productivity and nutrient uptake by durum wheat (*Triticum durum* Desf). *Karnataka J Agricult Sci.* 2005;18(4):907-10.
- [25] Garg SK, Tripathi M, Singh SK, Singh A. Pentachlorophenol dechlorination and simultaneous Cr^{6+} reduction by *Pseudomonas putida* SKG-1 MTCC (10510): characterization of PCP dechlorination products, bacterial structure, and functional groups. *Environ Sci Pollut Res.* 2013;20:2288-304. DOI: 10.1007/s11356-012-1101-z
- [26] Malaviya P, Singh A. Bioremediation of chromium solutions and chromium containing wastewaters. *Crit Rev Microbiol.* 2016;42:607-33. DOI: 10.3109/1040841X.2014.974501
- [27] Oliveira H. Chromium as an environmental pollutant: Insights on induced plant toxicity. *J Botany.* 2012;2012:375843. DOI: 10.1155/2012/375843
- [28] Barrera-Díaz CE, Lugo-Lugo V, Bilyeu B. A review of chemical, electrochemical and biological methods for aqueous $Cr(VI)$ reduction. *J Hazard Mater.* 2012;223-224:1-12. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2012.04.054
- [29] Joutey NT, Sayel H, Bahafid W, Ghachtouli NEI. Mechanisms of hexavalent chromium resistance and removal by microorganisms. *Rev Environ Contam Toxicol.* 2015;233:45-69. DOI: 10.1007/978-3-319-10479-9_2
- [30] Zhang S, Hao X, Tang J, Hu J, Deng Y, Xu M, et al. Assessing chromium contamination in red soil: monitoring the migration of fractions and the change of related microorganisms. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(8):2835. DOI: 10.3390/ijerph17082835
- [31] Viti C, Marchi E, Decorosi F, Giovannetti L. Molecular mechanisms of $Cr(VI)$ resistance in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol Rev.* 2014;38(4):633-59. DOI: 10.1111/1574-6976.12051
- [32] Cervantes C, Campos-García J, Devars S, Gutiérrez-Corona F, Loza-Tavera H, Torres-Guzmán JC, et al. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol Rev.* 2001;25(3):335-47. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2001.tb00581.x
- [33] Ramírez-Díaz MI, Díaz-Pérez C, Vargas E, Riveros-Rosas H, Campos-García J, Cervantes C. Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals.* 2008;21(3):321-32. DOI: 10.1007/s10534-007-9121-8
- [34] Pakholkiv NI, Luchka IV, Dzen EO, Kurtyak BM, Chornoshkin BO. Influence of organic and inorganic forms of chromium on cellulolytic and amylolytic activity of cattle rumen microorganisms. *Foothill and Mountain Agriculture and Stockbreeding.* 2013;55(1):165-9.
- [35] Cheung KH, Gu JD. Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: a review. *Int Biodeter Biodegrad.* 2007;59:8-15. DOI: 10.1016/j.ibiod.2006.05.002
- [36] Andreyuk EI, Tashirev AB, Smalko PY. Prediction of the interaction of microorganisms with chromium compounds based on thermodynamic calculations. *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine.* 2003;1:149-56.
- [37] Prasad PVVV, Das C, Golder AK. Reduction of $Cr(VI)$ to $Cr(III)$ and removal of total chromium from wastewater using scrap iron in the form of zerovalent iron(ZVI): Batch and column studies. *Canadian J Chem Eng.* 2011;89(6):1575-82. DOI: 10.1002/cjce.20590

- [38] Kanagaraj J, Velappan KC, Chandra Babu NK, Sadulla S. Solid wastes generation in the leather industry and its utilization for cleaner environment - a review. *J Sci Ind Res.* 2006;65:541-8. DOI: 10.1002/chin.200649273
- [39] Mandan B, Fathima NN, Rao JR, Nair BU. New chromium-zinc tanning agent: A viable option for less chrome technology. *J Am Leather Chem Assoc.* 2002;97:189-96.
- [40] Dhayalan K, Fathima NN, Gnanamani A, Rao JR, Nair BU, Ramasami T. Biodegradability of leathers through anaerobic pathway. *Waste Manag.* 2006;27(6):760-7. DOI: 10.1016/j.wasman.2006.03.019
- [41] Pessuto J, Godinho M, Dettmer A. Biogas production from tannery wastes. Evaluation of isolated microorganisms effect. In: *Proceedings of XXXIII IULTCS Congress; 2015 November 24-27; Novo Hamburgo (Brazil): ABQTIC.*
- [42] Quang LH. Making use of tannery chromium containing sludge as feed for biogas plant [bachelor thesis]. Kokkola: Central Ostrobothnia University of Applied; 2011. 67 p.
- [43] Deublein D, Steinhauser A. *Biogas from waste and renewable resources: an introduction.* Weinheim: Wiley-VCH; 2008. 578 p. DOI: 10.1002/9783527632794
- [44] Suresh G, Ravichandran N, Ramesh B, Suresh A, Siva GV. Isolation and characterization of chromium-tolerant bacteria from chromium-containing waste water. *Bioremed Biodiver Bioavail.* 2011;5(1):22-7.
- [45] Das AP, Mishra S. Biodegradation of the metallic carcinogen hexavalent chromium Cr(VI) by an indigenously isolated bacterial strain. *J Carcinog.* 2010;9:1-6. DOI: 10.4103/1477-3163.63584
- [46] Mishra S, Doble M. Novel chromium tolerant microorganisms: isolation, characterization and their biosorption capacity. *Ecotoxicol Environ Safe.* 2008;71:874-9. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2007.12.017
- [47] Ge S, Zhou M, Dong X, Lu Y, Ge S. Distinct and effective biotransformation of hexavalent chromium by a novel isolate under aerobic growth followed by facultative anaerobic incubation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013;97:2131-7. DOI: 10.1007/s00253-012-4361-0
- [48] Rensing C, Grass G. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol Rev.* 2003;27:197-213. DOI: 10.1016/S0168-6445(03)00049-4
- [49] Dupont CL, Grass G, Rensing C. Copper toxicity and the origin of bacterial resistance - New insights and applications. *Metallomics.* 2011;3:1109-18. DOI: 10.1039/c1mt00107h
- [50] Samanovic MI, Ding C, Thiele DJ, Darwin KH. Copper in microbial pathogenesis: meddling with the metal. *Cell Host Microbe.* 2012;11(2):106-15. DOI: 10.1016/j.chom.2012.01.009
- [51] Palmgren MG, Nissen P. Review P-type ATPases. *Annu Rev Biophys.* 2011;40:243-66. DOI: 10.1146/annurev.biophys.093008.131331
- [52] Festa RA, Jones MB, Butler-Wu S, Sinsimer D, Gerads R, Bishai WR, et al. A novel copper-responsive regulon in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 2011;79:133-48. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07431.x
- [53] Ladomersky E, Petris MJ. Copper tolerance and virulence in bacteria. *Metallomics.* 2015;7(6):957-64. DOI: 10.1039/c4mt00327f
- [54] Kushkevich I, Hnatysh S, Hudz S. Influence of heavy metals on cells of microorganisms. *Bulletin of Lviv University.* 2007;45:3-28. Available from: <http://dl.franko.lviv.ua/faculty/biologh/wis/45/0/1/1.pdf>
- [55] Jungin OS, Belikova EY, Gladka GV, Tashirev AB. Genetic potential of bacteria isolated from cadmium contaminated soils. *Faktyory Eksperymental'noyi Evolyutsiyi Orhanizmyv.* 2018;23:352-6.
- [56] Zayed G, Winter J. Inhibition of methane production from whey by heavy metals - protective effect of sulfide. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2000;53:726-31. DOI: 10.1007/s002530000336
- [57] Mertens J, Degryse F, Springael D, Smolders E. Zinc toxicity to nitrification in soil and soilless culture can be predicted with the same biotic ligand model. *Environ Sci Technol.* 2007;41:2992-7. DOI: 10.1021/es061995+
- [58] Abdel AA., Rittmann SKR., Fino D, Bochmann G. The physiological effect of heavy metals and volatile fatty acids on *Methanococcus maripaludis* S2. *Biotechnol Biofuels.* 2018;11:301. DOI: 10.1186/s13068-018-1302-x
- [59] Dopson M, Baker-Austin C, Koppineedi P, Bond PL. Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic microorganisms. *Microbiology.* 2003;149:1959-70. DOI: 10.1099/mic.0.26296-0
- [60] Takashima M, Shimada K, Speece RE. Minimum requirements for trace metals (Iron, Nickel, Cobalt, and Zinc) in thermophilic and mesophilic methane fermentation from glucose. *Water Environ Res.* 2011;83(4):339-46. DOI: 10.2175/106143010x12780288628895
- [61] Chen M, Cui Y, Bai F, Wang J. Effect of two biogas residues' application on copper and zinc fractionation and release in different soils. *J Environ Sci.* 2013;25(9):1865-73. DOI: 10.1016/s1001-0742(12)60246-0

Н.Б. Голуб¹, А.В. Шинкарчук¹, А.А. Козловец², Ш. Синьхуа³

¹КПИ им. Игоря Сикорского, Киев, Украина

²ООО "Аква Форсайт", Киев, Украина

³Институт новых материалов Шаньдунской академии наук, Дзинань, КНР

ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ПРОЦЕССЫ АНАЭРОБНОГО СБРАЖИВАНИЯ БИОМАССЫ АССОЦИАЦИЕЙ АНАЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Тяжелые металлы, попадающие в окружающую среду, негативно влияют на развитие живых организмов и плодородие почв. Использование биомассы, полученной на таких почвах, в качестве субстрата для продуцирования биогаза является проблематичным, поскольку тяжелые металлы влияют на ассоциацию микроорганизмов-деструкторов и продуцентов метана и, соответственно, на выход биогаза. Именно поэтому актуальным является вопрос о влиянии отдельных ионов металлов и их концентраций в среде на развитие анаэробной ассоциации для производства биогаза. Работа посвящена обобщению исследований влияния соединений тяжелых металлов на процесс анаэробного сбраживания биомассы и определения их предельных концентраций для функционирования анаэробной ассоциации микроорганизмов. Анализ литературных источников показал, что добавление к рабочей среде солей тяжелых металлов влияет на процесс анаэробного сбраживания, который зависит от формы внесенного металла, его концентрации, предварительной адаптации ассоциации микроорганизмов к металлу. Выход биогаза зависит от концентрации исследованного элемента и наличия других элементов в субстрате. Установлено, что допустимые для биосинтеза биогаза концентрации ионов металлов составляют: для железа – 20 г/л Fe⁰ или 500 мг/л K₂FeO₄; для хрома – 50 мг/л Cr³⁺; для меди – 40 мг/л CuCl₂; для цинка – 40 мг/л ZnCl₂. Полученные данные о влиянии различных концентраций тяжелых металлов на анаэробный процесс сбраживания позволяют смоделировать и проводить дальнейшие исследования воздействий как отдельных ионов тяжелых металлов, так и их комбинации на биотехнологию переработки отходов, содержащих такие металлы.

Ключевые слова: тяжелые металлы; железо; медь; цинк; хром; анаэробные микроорганизмы; биогаз.

N.B. Golub¹, A.V. Shynkarchuk¹, O.A. Kozlovets², Sh. Xinhua³

¹Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute, Kyiv, Ukraine

²Aqua Foresight LLC, Kyiv, Ukraine

³Advanced Material Institute, Shandong Academy of Sciences, Jinan, China

INFLUENCE OF HEAVY METALS ON THE PROCESS OF ANAEROBIC FERMENTATION OF BIOMASS BY THE CONSORTIA OF ANAEROBIC MICROORGANISMS

Heavy metals released into the environment have a negative impact on the development of living organisms and soil fertility. The use of biomass obtained on such soils as a substrate for biogas production is problematic since heavy metals affect the consortia of microorganisms-decomposers and methane producers, and, consequently, the biogas yield. Therefore, the effect of certain metal ions and their concentrations in the environment on the development of the anaerobic consortia for biogas production is the topical question. We are aimed to generalize research findings across the influence of heavy metal compounds on the process of anaerobic fermentation of biomass and determination of limiting concentrations for the functioning of the anaerobic consortia. Analysis of the literature has shown that the addition of heavy metal salts to the working medium affects the process of anaerobic fermentation, which depends on the form of the introduced metal, its concentration, the preliminary adaptation of the consortia to the metal. The biogas yield depends on the concentration of the element under study and the presence of other elements in the substrate. It has been established that the allowable concentrations of metal ions are as follows: for iron – 20 g/l Fe⁰ or 500 mg/l K₂FeO₄; for chromium – 50 mg/l Cr³⁺; for copper – 40 mg/l CuCl₂; for zinc – 40 mg/l ZnCl₂. The data obtained on the influence of various concentrations of heavy metals on the anaerobic fermentation process will make it possible to model and conduct further studies of the effects of both individual heavy metal ions and their combinations on the biotechnology of processing waste containing such metals.

Keywords: heavy metals; iron; copper; zinc; chromium; anaerobic microorganisms; biogas.