

ПОДБОР НОСИТЕЛЕЙ И ПАРАМЕТРОВ ИММОБИЛИЗАЦИИ КОНСОРЦИУМА МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ ФОСФАТОВ*

D.D. Belova

SELECTION CARRIERS AND PARAMETERS FOR THE IMMOBILIZATION OF CONSORTIUM OF MICROORGANISMS-DESTRUCTORS OF PHOSPHATES

Белова Д.Д. – асп. каф. бионанотехнологии Кемеровского технологического института пищевой промышленности (университета), г. Кемерово. E-mail: antonina-daria@mail.ru

Belova D.D. – Post-Graduate Student, Chair of Bionanotechnology, Kemerovo Institute of Food Industry Technology (University), Kemerovo. E-mail: antonina-daria@mail.ru

Каждый год в окружающую среду сбрасывается огромное количество загрязняющих веществ, и чистых источников воды становится все меньше. В последнее время значительно увеличилась концентрация фосфатов в бытовых сточных водах. Санитарная норма их содержания в питьевой воде составляет не более 3,5 мг/л, предельно допустимая концентрация для водоемов и рыбохозяйственных производств 0,2 мг/л. Оба значения в настоящее время превышают нормативный показатель и способны оказывать негативное воздействие на организм человека, животных и окружающую среду в целом. Исследование направлено на повышение эффективности биологической очистки сточных вод путем использования иммобилизованной микрофлоры. В работе исследована возможность физической иммобилизации консорциума микроорганизмов-деструкторов фосфатов (*Acinetobacter* sp. B3905, *Bacillus* sp. B5061, *Pseudomonas facilis* G0405BT) на твердые носители (активированный уголь марки БАУ-К, активированный уголь марки ДАК, углеродная ткань «Урал» ТМ-4 и керамзит). Определена сорбционная емкость носителей путем измерения разности концентрации микроорганизмов до и после процесса иммобилизации с помощью спектрофотометрического метода исследования. Проведен подбор оптимальной температуры и продолжительности иммобилизации. Температуру варьировали от 10 до 50 °С, влияние продолжительности процесса оценивали через 1, 2, 4, 6 и 12 ч. Проанализи-

рована возможность культивирования иммобилизованного консорциума в пяти циклах загрузки для оценки воспроизводимости роста культур микроорганизмов при многократном использовании. Практическое применение полученного материала может заключаться в создании биофильтров для очистки промышленных сточных вод от соединений фосфора.

Ключевые слова: фосфаты, сточные воды, эвтрофикация, иммобилизация, микроорганизмы-деструкторы.

Every year a large number of polluting substances are discharged into the environment and clean water sources are becoming less. Recently the concentration of phosphates in domestic sewage has significantly increased. The sanitary norm of their content in drinking water is not more than 3.5 mg/l, the maximum allowable concentration for ponds and fishery production is 0.2 mg/l. Both values exceed the normative index and can have negative impact on human body, animals and the environment as a whole. The study is aimed at increasing the efficiency of biological wastewater treatment by using immobilized microflora. In the study the possibility of physical immobilization of consortium of microorganisms-destroyers of phosphates (*Acinetobacter* sp. B3905, *Bacillus* sp. B5061, *Pseudomonas facilis* G0405BT) on solid carriers (activated carbon BAU-K, activated carbon DAK, Ural carbon fabric TM-4 and expanded clay) was investigated. Sorption capacity of carriers was determined by measuring the difference in the concentration of microorganisms before and after the

*Работа выполнена в рамках договора № 9212ГУ/2015 при поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере.

immobilization process using spectrophotometric method of investigation. The selection of optimal temperature and duration of immobilization was carried out. The temperature varied from 10 to 50 °C, the effect of the duration of the process was evaluated after 1, 2, 4, 6 and 12 hours. The possibility of cultivation of immobilized consortium in five cycles of loading to assess the reproducibility of the growth of cultures of microorganisms under repeated use was analyzed. Practical application of obtained data can consist in the creation of biofilters for purification of industrial wastewater from phosphorus compounds.

Keywords: *phosphates, sewage, eutrophication, immobilization, microorganisms-destructors.*

Введение. Ежегодно в окружающую среду сбрасывается огромное количество загрязняющих веществ, и чистых источников воды становится все меньше. В связи с этим одной из актуальных проблем стал поиск способов удаления биогенных элементов (азота и фосфора) из сточных вод. Биогенные элементы поступают в водоемы совместно с бытовыми, промышленными, сельскохозяйственными стоками и способствуют развитию процесса эвтрофикации [7]. Данный процесс характеризуется бурным ростом водорослей и высших растений, вследствие чего водоем постепенно зарастает, количество органических веществ увеличивается, а концентрация растворенного кислорода уменьшается, что приводит к гибели рыб и других живых организмов. Также повышенная концентрация фосфора в питьевой воде способна оказывать негативное воздействие на организм человека и животных [3].

Растворимый фосфор является основным лимитирующим элементом для процесса эвтрофикации. При концентрации фосфора менее 0,2 мг/л этот процесс не наблюдается. Для предотвращения эвтрофикации водоема экономически целесообразнее и проще удалять соединения фосфора, чем азота [4]. Фосфаты из сточных вод удаляются химическими, физико-химическими и биологическими методами. Применения химического способа стараются избегать из-за высокой стоимости реагентов и возможности вторичного загрязнения. Физико-химические методы не находят широкого практического применения в связи с высокими за-

тратами, необходимыми на осуществление процессов, и сложностью эксплуатации. Биологический метод является наиболее экономически выгодным и безопасным, но не всегда высокоэффективным [5, 6].

Применение иммобилизованных микроорганизмов является одним из способов повышения эффективности биологической очистки сточных вод. При разработке биологического способа очистки существует две основные задачи: первая заключается в освобождении воды от загрязняющих веществ, вторая направлена на очищение воды от суспендированных микроорганизмов. Обе эти задачи решаются при использовании иммобилизованной микрофлоры [1, 2].

Цель работы. Подбор параметров иммобилизации консорциума микроорганизмов-деструкторов фосфатов на разные носители для увеличения показателей эффективности очистки сточных вод.

Объекты и методы исследования. Экспериментальные исследования проводились в лаборатории Научно-исследовательского института биотехнологии (НИИ биотехнологии) при ФГБОУ ВО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности (университет)».

В качестве объектов исследования использовали микроорганизмы-деструкторы фосфатов: *Acinetobacter sp.* В3905, *Bacillus sp.* В5061, *Pseudomonas facilis* Г0405ВТ. Штаммы культивировали на питательной среде, содержащей пептон, мясной экстракт и хлорид натрия, при температуре 30 ± 5 °C и pH $7 \pm 0,5$ в течение 18 ± 2 ч.

В качестве носителей для иммобилизации использовали:

– *активированный уголь марки БАУ-К* производства ООО «ПЗС«Уралхимсорб», г. Пермь, Россия. Размер частиц составляет от 3,6 до 7 мм. Сорбент имеет сильноразвитую общую пористость, широкий диапазон пор и значительную величину удельной поглощающей поверхности;

– *активированный уголь марки ДАК (ГОСТ 6217-74)* производства ООО «АРМАТЕХ», г. Санкт-Петербург, Россия. Обладает хорошей сорбционной емкостью и высокой пористостью;

– *углеродную ткань «Урал» ТМ-4* производ-

ства ОАО «Светлогорск Химволокно», г. Светлогорск, Беларусь. Она изготовлена на основе вискозной технической нити с содержанием углерода 90–99 %. Ткань обладает высокой химической стойкостью к кислотам и щелочам;

– *керамзит* фракции 5–10 мм производства ООО «Керамзит», г. Кемерово, Россия. Экологически чистый пористый материал на основе глины.

Иммобилизацию проводили с помощью *адсорбционного метода*. Для этого готовили суспензию микроорганизмов консорциума концентрацией 10^7 – 10^8 КОЕ/мл. Носители инкубировали с 10 мл суспензии в течение 2 часов при комнатной температуре и постоянном перемешивании 100 об/мин. Адсорбция происходила за счет ионного и электростатического взаимодействия между носителем и поверхностью клетки. Данный вид иммобилизации является наиболее мягким для живых клеток.

Сорбционную емкость носителей определяли по уменьшению концентрации клеток в культуральной жидкости после её инкубации с носителями. Для этого измеряли оптическую плотность суспензии микроорганизмов на спектрофотометре UNICO 1201 (США) с использованием кюветы толщиной 1 см и длиной волны 540 нм. В качестве контроля в первую кювету вносили фосфатный буфер, во вторую – исходную суспензию микроорганизмов, а в третью добавляли 1 мл суспензии и 3 мл фосфатного буфера. В результате измерения определили: $D_{исх} = 1,647$; $D_{обр} = 0,858$.

Чтобы рассчитать количество клеток (мг) в 1 мл суспензии, взвешивали 3 пустых пробирки типа эппендорф и фиксировали среднее значение ($m_0 = 0,9446$ г). Во взвешенные пробирки до-

бавляли по 2 мл суспензии и центрифугировали в течение 5 минут при 12000 оборотах, отбирали супернатант, высушивали образцы при 40 °С до постоянной массы и взвешивали ($m_2 = 0,9461$ г.). Путем подсчета определили, что для оптической плотности $D_{обр} = 0,858$ г масса клеток составляет 0,75 мг.

По завершении процесса адсорбции суспензию микроорганизмов и носители разделяли путем фильтрования через бумажные фильтры типа «красная лента» и определяли оптическую плотность фильтратов ($D_{1ф}$), далее носители промывали фосфатным буфером, фильтровали и снова измеряли оптическую плотность фильтратов после промывки ($D_{2ф}$). Для подсчета количества адсорбированных клеток X (мг/мл) использовали следующие формулы:

$$X = \frac{D_{сор} \cdot 0,75}{D_{обр}} \cdot 10; \quad (1)$$

$$D_{сор} = D_{исх} - (D_{1ф} + D_{2ф}), \quad (2)$$

где $D_{сор}$ – оптическая плотность суспензии после инкубации микроорганизмов и носителя в течение 2 часов; $D_{обр}$ – оптическая плотность исходной суспензии; $D_{исх}$ – оптическая плотность суспензии 1,647 опт. ед.; $D_{1ф}$ – оптическая плотность первого фильтрата, $D_{2ф}$ – оптическая плотность фильтрата после промывки носителей.

Результаты и их обсуждение. Одним из главных показателей при отборе носителей для иммобилизации является их сорбционная емкость. Результаты её исследования представлены в таблице 1 в виде средних значений, полученных не менее чем в трех независимых испытаниях.

Таблица 1

Способность микроорганизмов адсорбироваться на поверхности носителей

Носитель	$D_{1ф}$	$D_{2ф}$	$D_{исх}$	$D_{сор}$	Концентрация клеток X , мг/мл	Сорбционная емкость, мг/г
Активированный уголь марки БАУ-К	0,002	0,000	1,647	1,645	14,379	28,759
Активированный уголь марки ДАК	0,257	0,026	1,647	1,364	11,923	23,846
Углеродная ткань «Урал» ТМ-4	0,328	0,085	1,647	1,234	10,787	21,573
Керамзит	0,094	0,012	1,647	1,541	13,472	26,940

Все исследуемые носители обладают достаточно высокой способностью адсорбировать на своей поверхности клетки микроорганизмов. Однако наилучшие результаты показали активированный уголь марки БАУ-К и керамзит, данные носители использовали при дальнейшем исследовании.

Далее проводили подбор оптимальной температуры и продолжительности иммобилизации. Температуру варьировали от 10 до 50 °С,

влияние продолжительности процесса оценивали через 1, 2, 4, 6 и 12 ч. Результаты учитывали с помощью фотокolorиметрического метода путем измерения оптической плотности при длине волны 600 нм после суточного культивирования иммобилизованных микроорганизмов на выбранной ранее оптимальной питательной среде. Результаты исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2

Подбор оптимальных условий иммобилизации консорциума микроорганизмов-деструкторов фосфатов

Носитель	Продолжительность иммобилизации, ч	Температура, °С	Концентрация микроорганизмов · 10 ⁸ КОЕ/мл	Изменение концентрации биомассы, %
1	2	3	4	5
Активированный уголь марки БАУ-К	1	10	0,28±0,01	-75,65
		20	0,76±0,04	-33,91
		30	1,21±0,06	+5,22
		40	0,87±0,04	-24,35
		50	0,30±0,02	-73,91
	2	10	0,31±0,02	-73,04
		20	0,98±0,05	-14,78
		30	2,17±0,11	+88,70
		40	1,82±0,09	+58,26
		50	0,39±0,02	-66,09
	4	10	0,24±0,01	-79,13
		20	0,91±0,05	-20,87
		30	2,01±0,10	+74,78
		40	1,62±0,08	+40,87
		50	0,38±0,02	-66,96
	6	10	0,22±0,01	-80,87
		20	0,88±0,04	-23,48
		30	1,98±0,10	+72,17
		40	1,41±0,07	+22,61
		50	0,31±0,02	-73,04
12	10	0,21±0,01	-81,74	
	20	0,78±0,04	-32,17	
	30	1,05±0,05	-8,70	
	40	0,87±0,04	-24,35	
	50	0,18±0,01	-84,35	
Керамзит	1	10	0,17±0,01	-85,22
		20	0,46±0,02	-60,00
		30	1,04±0,05	-9,56
		40	1,06±0,05	-7,83
		50	0,14±0,01	-87,83

Окончание табл. 2

1	2	3	4	5
	2	10	0,26±0,01	-77,39
		20	0,78±0,04	-32,17
		30	1,53±0,08	+33,04
		40	1,26±0,06	+9,56
		50	0,23±0,01	-80,0
	4	10	0,29±0,01	-74,78
		20	0,78±0,4	-32,17
		30	1,49±0,07	+29,56
		40	1,10±0,05	-4,34
		50	0,19±0,01	-83,48
	6	10	0,24±0,01	-79,13
		20	0,75±0,04	-34,78
		30	1,59±0,08	+38,26
		40	1,26±0,06	+9,57
		50	0,21±0,01	-81,74
	12	10	0,22±0,01	-80,87
		20	0,67±0,03	-41,74
		30	1,25±0,06	+8,70
		40	0,94±0,05	-18,26
		50	0,13±0,01	-88,69
Контроль	–	–	1,15±0,06	–

Проанализировав полученные результаты, в качестве оптимальных параметров иммобилизации выбрали температуру 30 °С и продолжительность процесса 2 часа, так как при данных значениях наблюдался максимальный прирост биомассы после культивирования.

Важным показателем иммобилизованных микроорганизмов является также возможность

их многократного использования без потери прироста биомассы. Для определения воспроизводимости результатов проводили культивирование иммобилизованной системы при пятикратной смене питательной среды. Результаты учитывали с помощью фотоколориметрического метода, описанного выше (табл. 3).

Таблица 3

Результаты многократного культивирования иммобилизованных микроорганизмов

Носитель	Номер посева	Концентрация микроорганизмов ·10 ⁸ КОЕ/мл
Активированный уголь БАУ-К	1	2,36±0,12
	2	2,32±0,12
	3	2,37±0,12
	4	2,34±0,12
	5	2,33±0,12
Керамзит	1	1,98±0,11
	2	1,94±0,11
	3	1,79±0,11
	4	1,66±0,10
	5	1,64±0,10

Полученные результаты подтверждают возможность многократного (5 циклов) использования иммобилизованного консорциума без значительной потери интенсивности роста культур.

Выводы. Оптимальными носителями для иммобилизации микроорганизмов-деструкторов фосфатов выбраны активированный уголь марки БАУ-К и керамзит. Сорбционная емкость носителей составила 28,759 и 26,940 мг/г соответственно.

Проведен подбор временных и температурных параметров иммобилизации. В качестве оптимальных параметров выбрали температуру 30 °С и продолжительность процесса 2 ч.

Исследована возможность многократного использования иммобилизованного консорциума без потери прироста биомассы.

Практическое применение консорциума микроорганизмов-деструкторов фосфатов, иммобилизованных на твердых носителях (активированном угле марки БАУ-К и керамзите), может заключаться в создании биофильтров в виде колоночных реакторов, заполненных данным материалом, и использоваться для очистки промышленных сточных вод от избыточной концентрации фосфатов и общего фосфора.

Литература

1. Безопасность водных экосистем и проблемы реализации процесса очистки сточных вод от биогенных веществ / *А.В. Козачек, Ю.В. Зеленева, Т.В. Скопинцева* [и др.] // Вестник Тамбовского университета. Сер. Естественные и технические науки. – 2015. – Т. 20. – № 1. – С. 219–222.
2. *Генералова К.Н., Минькова А.А., Олонцев В.Ф.* Адсорбция клеток бактерий на углеродных сорбентах // Вестн. Перм. нац. исслед. политехн. ун-та. Химическая технология и биотехнология. – 2014. – № 2. – С. 53–64.
3. *Гогина Е.С.* Удаление биогенных элементов из сточных вод. – М.: Изд-во МГСУ, 2010. – 120 с.
4. *Дзюба И.П., Маркевич Р.М., Сигиневич Т.М.* Исследование процесса накопления фосфора фосфораккумулирующими бактериями // Тр. БГТУ. Химия, технология органических веществ и биотехнология. – 2011. – Т. 1. – № 4. – С. 182–184.
5. *Лемзикова И.П., Маркевич Р.М.* Потребление фосфатов из среды бактериями активного ила при различных условиях аэрации

// Тр. БГТУ. Химия, технология органических веществ и биотехнология. – 2013. – № 4. – С. 216–218.

6. Разработка технологии очистки сточной воды с использованием иммобилизованной микрофлоры / *Н.В. Кобызева, А.Г. Гатауллин, Н.Н. Силищев* [и др.] // Вестн. Оренб. гос. ун-та. – 2009. – № 1 (107). – С. 104–107.
7. *Скопинцева Т.В., Синельников А.Г.* Проблемы борьбы с эвтрофикацией водоемов в случае сброса фосфорсодержащих сточных вод // Фундаментальные и прикладные исследования в современном мире. – 2014. – Т. 3. – № 8. – С. 27–30.

Literatura

1. Bezopasnost' vodnyh jekosistem i problemy realizacii processa ochistki stochnyh vod ot biogennyh veshhestv / *A.V. Kozachek, Ju.V. Zeleneva, T.V. Skopinцева* [i dr.] // Vestnik Tambovskogo universiteta. Ser. Estestvennye i tehničeskie nauki. – 2015. – T. 20. – № 1. – S. 219–222.
2. *Generalova K.N., Min'kova A.A., Oloncev V.F.* Adsorbicija kletok bakterij na ugličerodnyh sorbentah // Vestn. Perm. nac. issled. politehn. un-ta. Himičeskaja tehnologija i biotehnologija. – 2014. – № 2. – S. 53–64.
3. *Gogina E.S.* Uдалenie biogennyh jelementov iz stochnyh vod. – M.: Izd-vo MGSU, 2010. – 120 s.
4. *Dzjuba I.P., Markevich R.M., Siginevich T.M.* Issledovanie processa nakoplenija fosfora fosforakkumulirujušhimi bakterijami // Tr. BGTU. Himija, tehnologija organičeskikh veshhestv i biotehnologija. – 2011. – T. 1. – № 4. – S. 182–184.
5. *Lemzikova I.P., Markevich R.M.* Potreblenie fosfatov iz sredy bakterijami aktivnogo ila pri različnyh uslovijah ajeracii // Tr. BGTU. Himija, tehnologija organičeskikh veshhestv i biotehnologija. – 2013. – № 4. – S. 216–218.
6. Razrabotka tehnologii ochistki stochnoj vody s ispol'zovaniem immobilizovannoj mikroflory / *N.V. Kobyzeva, A.G. Gataullin, N.N. Silishhev* [i dr.] // Vestn. Orenb. gos. un-ta. – 2009. – № 1 (107). – S. 104–107.
7. *Skopinцева T.V., Sinel'nikov A.G.* Problemy bor'by s jevtrofikaciej vodoemov v sluchae sbrosa fosforsoderzhashhij stochnyh vod // Fundamental'nye i prikladnye issledovanija v sovremennom mire. – 2014. – T. 3. – № 8. – S. 27–30.