

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного

На правах рукопису

ПАТРАУЧАН МАРІАННА АРКАДІВНА

БАКТЕРІАЛЬНА ДЕСТРУКЦІЯ КАТІОННИХ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ
РЕЧОВИН ПРИ АНАЕРОБНІЙ ОЧИСТЦІ СТИЧНИХ ВОД

Спеціальність 03.00.07 мікробіологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1996

HB 33.046

ЛННБ України ім.В.Стефаніка

Дисерта



00761178 (U)

Робота виконана в Інституті

ім. А.В.Думанського НАН України

Наукові керівники: доктор біологічних наук, професор
С.С.СТАВСЬКА

Науковий консультант: кандидат хімічних наук, с.н.с.
В.В.ТРАЧЕВСЬКИЙ

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Ю.Р.МАЛАШЕНКО
доктор біологічних наук, професор
В.М.УДОД

Провідна організація: Київський Державний Університет
Тараса Шевченка

Захист відбудеться 18 жовтня 1995 р. о 10 год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.01.81.01 в Інституті мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України.

В дисертацію можна ознайомитись у бібліотеці Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України.

Автореферат розісланий "16" вересня 1995 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук

Пуріш

Л.М.Пуріш

ЛННБ ім. В. Стефаніка
АН України

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ.

Актуальність проблеми. Забруднення біосфери токсичними ополуками - продуктами різноманітних хімічних синтезів - має сьогодні глобальний характер і може призвести до неворотних екологічних порушень. Дуже серйозну загрозу для довкілля і, в тому числі, води становлять катіонні поверхнево-активні речовини (КПАР). Це пов'язано з постійним збільшенням масштабів виробництва даних ополук і з їх повсюдним господарським та побутовим використанням. Специфіка використання КПАР як дезинфектантів, флотореагентів, антикорозійних, емульгуючих, змочуючих та піноутворюючих препаратів. зумовляє попадання основної частини виробленої продукції в стічні води. З відомих 4-х класів ПАР катіонні мають найбільш виражені бактерицидні властивості і вважаються найбільш токсичними.

Попадання ПАР у відкриті водоймища призводить до погіршення органолептичних властивостей води, негативно впливає на процеси її самоочищення, глибоко діє на гідробіонтів. Клінічна картина отруєння КПАР організму людини характеризується ураженням нервової системи, шлунково-кишкового тракту. Крім того, КПАР негативно впливають на шкіру, викликаючи сильні алергічні реакції, атрофічні явища. Таким чином, присутність КПАР у водоймищах дуже небезпечна і може призвести до екологічної катастрофи. У зв'язку з цим проблема очистки стічних вод і запобігання потраплянню КПАР у довкілля став особливою гострою і актуальною.

Вирішення цієї проблеми укладатиметься такими особливостями КПАР, як повільне біохімічне окислення, відносно висока стійкість до хімічної дії кислот, лугів, солей, а також висока піноутворююча здатність.

Розв'язати проблему очистки промислових і побутових стоків з високим вмістом КПАР можливо лише за допомогою нових біотехнологій, серед яких найбільш екологічно безпечною і ефективною є мікробіологічна. Метод мікробіологічної очистки стічних вод базується на використанні високоактивних культур мікроорганізмів-деструкторів, здатних руйнувати КПАР у концентраціях, що в десятки разів перевищують гранично допустимі концентрації цих речовин, прийняті для подачі на біологічні очисні споруди.

Розроблені аеробні мікробіологічні методи очистки стічних вод від КПАР. Однак в даний час особливо актуальним є створення малоенерговних біотехнологій очистки. Саме такі перспективи відкриває розробка та застосування анаеробних методів. Основними перевагами анаеробних процесів, у порівнянні з аеробними, є їх економічність і можливість ефективної очистки висококонцентрованих стічних вод.

Мета і завдання досліджень. Метою роботи було одержання високоактивних культур бактерій-деструкторів, що утилізують катіонні ПАР і напівпродукти їх промислового синтезу в анаеробних умовах; вивчення процесів анаеробної бактеріальної деструкції КПАР і напівпродуктів їх синтезу, дослідження основних закономірностей бактеріальної трансформації молекул цих сполук у процесі їх анаеробної утилізації та розробка біотехнології анаеробної очистки стічних вод виробництва КПАР.

У зв'язку з цим основними завданнями досліджень було:

- встановити можливість анаеробного бактеріального руйнування напівпродуктів синтезу азотвмісних КПАР типу четвертинних амонієвих сполук (ЧАС) - алкіддиметиламіну (АДМА);
- вивчити можливість анаеробної бактеріальної деструкції

азотвмісних КПАР (катаміну АБ, оксиду АДМА);

- селекціонувати високоактивні культури бактерій, здатних утилізувати катамін АБ, оксид АДМА і АДМА як єдині джерела вуглецю, азоту та енергії;

- вивчити культурально-морфологічні, фізіолого-біохімічні особливості та деструктивну активність виділених культур, провести їх ідентифікацію;

- вивчити процес руйнування катаміну АБ, оксиду АДМА і АДМА за різних умов культивування бактерій-деструкторів;

- розробити методологію азотоосування методу ЯМР на ядрах ^{13}C , ^1H , ^{14}N , ^{17}O для вивчення процесів анаеробної деструкції;

- дослідити закономірності трансформації азоту молекул коензимиотиків селекціонованими мікробоценозами, які утилізують АДМА і КПАР;

- визначити проміжні і кінцеві продукти деструкції та дослідити шляхи бактеріального перетворення АДМА в анаеробних умовах;

- визначити умови деградації КПАР і АДМА у складі реальних та модельних стічних вод;

- розробити технологічну схему локальної очистки стічних вод виробництва КПАР у анаеробних умовах.

Наукова новизна. Вперше встановлена можливість анаеробної бактеріальної деструкції АДМА, катаміну АБ та оксиду АДМА. Селекціоновано 9 культур бактерій-деструкторів, здатних використовувати в анаеробних умовах азотвмісні КПАР і АДМА як єдині джерела вуглецю, азоту та енергії. Культури були ідентифіковані як *Bacillus laterosporus*, *B. coagulans*, *B. circulans* А, *B. polymyxa* (АДМА); *B. alvei*, *B. circulans* О (оксид АДМА);

Aeromonas hydrophila subsp. *anaerogenes*, B. species, B. *circulans* K (катамін АБ).

Вивчена залежність ефективності анаеробної деструкції КПАР і АДМА від умов культивування бактерій-деструкторів.

Розроблена методологія застосування методів ЯМР на ядрах ^1H , ^{13}C , ^{14}N , ^{17}O для вивчення процесів анаеробної бактеріальної деструкції коенобіотиків. Вперше встановлені основні особливості анаеробної трансформації азоту молекул азотвмісних КПАР і напівпродукту їх синтезу при мікробній утилізації цих ополук. Визначені проміжні та кінцеві продукти; досліджені шляхи анаеробного бактеріального руйнування АДМА.

Практичне значення. Селекціоновані високоактивні культури бактерій-деструкторів, що руйнують АДМА, катамін АБ, оксид АДМА в анаеробних лабораторних біореакторах проточного типу з утворенням екологічно прийнятних продуктів, і можуть бути використані для очистки стічних вод виробництва КПАР.

Вивчено залежність ефективності очистки стічних вод від умов культивування бактерій. Розроблена технологічна схема локальної анаеробної очистки стічних вод від азотвмісних КПАР і напівпродуктів їх промислового синтезу.

Випробування. Основні положення дисертаційної роботи доповідались і обговорювались на міжнародній конференції "Біологія і біотехнологія очистки води" (листопад, 1992, м. Полтава), на I Українському з'їзді мікробіологів (вересень, 1993, м. Одеса), на ювілейній науково-практичній конференції "Біологія і біотехнологія очистки довкілля" (вересень-жовтень, 1993, м. Київ), на міжнародній конференції "Біоколоїд 95" (червень, 1995, м. Київ).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 5 робіт.

Структура дисертації. Дисертація включає вступ, огляд літератури, розділ "Об'єкти і методи досліджень", результати власних досліджень і їх обговорення (6 розділів), висновки. Робота викладена на 181 сторінці машинописного тексту, містить 29 таблиць, 27 рисунків, 9 фотографій. Вібліографія складає 244 найменування.

Декларація особистої участі. Робота дисертантом виконана самостійно. Розробка методики використання методів ЯМР виконані автором на базі лабораторії спектроскопічних досліджень ІКХХВ.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.

ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.

В роботі використовували технічні катіонні поверхнево-активні речовини (КПАР) типу четвертинних амонієвих сполук (ЧАС): катамін АБ, оксид алкілдиметиламіну виробництва МНПО "Синтез", напівпродукти промислового синтезу КПАР - алкілдиметиламін (АД-МА) виробництва Волгодонського хімаводу та реальну отічну воду Волгодонського хімаводу.

Для одержання високоефективних культур бактерій-деструкторів використовували спрямовану послідовну трьохетапну селекцію. Джерелом одержання накопичувальних культур були вброжений осадочних споруд і зразки ґрунту, що попередньо довгий час контактував з КПАР і був відібран на території заводу МНПО "Синтез". Культивування проводили у скляних флаконах і ґрунтовій колонці без доступу повітря.

Після іммобілізації селекціонованих накопичувальних культур на полівінілспиртових волокнах (ПВС) проводили подальшу селекцію при безперервному культивуванні. Для цього використовували

анаеробні лабораторні біореактори проточного типу, що окладалися з трьох послідовно з'єднаних окляних колон, щільно закритими гумовими корками. У біореактори за допомогою перистальтичних насосів подавали реальну стічну воду з АДМА, розведена до значень ХПК 900-5100 мг/дм³ (біореактор А), 500-2600 мг/дм³ (В), 300-19000 мг/дм³ (С). Початкове середовище для установок В і С додатково містило, відповідно, сульфат і нітрат (3 г/дм³). У біореактори О і К подавали модельну стічну воду, яка містила, відповідно, оксид АДМА 290-1300 мг/дм³ і катамін АВ 40-1400 мг/дм³. Температура культивування мікрофлори біореактора К - 20⁰С, біореакторів А,В,С,О - 45⁰С. Як джерело фосфору вносили Na₂HPO₄ у концентрації, розрахованій із співвідношення ХПК : Р - 400 : 1, оптимального для культивування анаеробних бактерій (Раскмауг, 1980). Додаткове джерело азоту у середовища не вносили.

Здатність селекціонованих мікробних асоціацій біореакторів використовувати коенобіотики як єдине джерело вуглецю і азоту вивчали в умовах періодичного культивування у анаеробних флаконах на синтетичних середовищах. За інкуляції проводили проби носіїв в іммобілізованому на них мікрофлором, що були відібрані в перших ступенях біореакторів А, В, С, О і біореактору К. Концентрації катіонних ПАР визначали за допомогою екотрекційно-фотометричного методу (Лурье, Рибникова, 1974). Для кількісної характеристики вмісту АДМА у середовищі використовували метод визначення високомолекулярних амінів (ВМА) (Коренман, 1975). Для якісного визначення окислювально-відновного потенціала (ОВП) розчинів використовували 0,2% розчин індикатора реазуріну. Аналіз газоподібних метаболітів проводили за допомогою хро-

матографу ЛХМ-8МД. Кількісний вміст неорганічних іонів NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , S^{2-} , SO_4^{2-} визначали загальноприйнятими методами хімічного аналізу виробничих отічних вод (Лур'є, Рыбникова, 1974).

Здатність мікробоценову А здійснювати денітрифікацію досліджували при культивуванні мікрофлори установки А на селективному середовищі (Stolp, 1981). Джерелом вуглецю був пентанол (1 г/дм³).

Виділення селекціонованих культур проводили на МПА, синтетичному середовищі, г/дм³: Na_2HPO_4 - 1, KCl - 0,5, агар-агару - 20, в кожному окремому випадку єдиними джерелами вуглецю і азоту були АДМА фракції C_{10-16} - 0,1, катамін АБ - 0,3, оксид АДМА - 0,2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки бактерій вивчали загальноприйнятими методами (Герхардт та ін., 1983). Таксономічне положення виділених мікроорганізмів встановлювали за визначниками Бергі (7,8 видання), а також за оригінальною роботою В.В.Смірнова (1983).

Для культивування мікроорганізмів та їх асоціацій використовували аеробну та анаеробну техніку (Вайнштейн та ін., 1988, Жиліна та ін., 1978, Hungate, 1969). З метою вивчення деструктивної активності окремих культур та їх штучно сформованих асоціацій проводили періодичне і безперервне культивування бактерій на синтетичних середовищах в анаеробних та аеробних умовах. Обчислювали значення середньої питомої швидкості деструкції коенобіотиків за час t_1-t_0 за формулою: $\mu_{cp} = \frac{\ln X_1 - \ln X_0}{t_1 - t_0}$ де X_1 , X_0 - концентрація коенобіотику при часі культивування t_1 , t_0 , відповідно.

Для визначення оптимальних режимів роботи біореакторів

(концентрація коенобіотиків, час перебування) аналізували ХПК рідини, концентрацію ВМА, КПАР, а також рН, Eh (Лур'є, Рыбникова, 1974, Коренман, 1975, Герхардт та ін., 1983).

Виділення та ідентифікацію проміжних та кінцевих продуктів анаеробної бактеріальної деструкції АДМА здійснювали за допомогою Фур'є-спектрометра ЯМР СКР-200.

СЕЛЕКЦІЯ БАКТЕРІЙ - ДЕСТРУКТОРІВ АДМА, ОКСИДУ АДМА І КАТАМІНУ АБ В АНАЕРОБНИХ УМОВАХ.

Для одержання культур бактерій - деструкторів стійких до біоруйнування КПАР і АДМА ми використовували послідовну селекцію, яка включає три етапи:

- 1) селекція накопичувальних культур,
- 2) іммобілізація одержаних накопичувальних культур на інертних носіях,
- 3) селекція мікроорганізмів при безперервному культивуванні в умовах збільшення концентрації коенобіотиків, зменшення часу перебування рідини у системі, відсутності кисню (повітря).

Селекцію накопичувальних культур вели у трьох напрямках: при внесенні як термінальних акцепторів електронів нітрату натрію (культура С), сульфату натрію (к-ра В) і при відсутності таких (к-ри А, О, К). Одержано п'ять накопичувальних культур: три з них (А, В, С) - на реальній стічній воді з АДМА, дві (К і О) - на синтетичних середовищах з технічними КПАР: катаміном АБ і оксидом АДМА, відповідно. Показано, що використання ґразків ґрунту, який попередньо довгий час контактував з КПАР, як вихідного об'єкту одержання культур накопичення, а також ведення процесу в умовах безперервного культивування значно прискорює селекцію.

Всі одержані накопичувальні культури виявилися стійкими до дії високих концентрацій коенобіотиків (ХПК реального стоку в АДМА - 3600 мг/дм³, концентрація оксиду АДМА - 250, катаміну АВ - 170 мг/дм³ при періодичному культивуванні і 400 - 1780 мг/дм³ у ґрунтовій колонці) і здатними руйнувати дані оподуки у безкисневих умовах.

ВИВЧЕННЯ ДЕСТРУКЦІЇ АДМА, ОКСИДУ АДМА І КАТАМІНУ АВ,
СЕЛЕКЦІОНОВАНИМИ МІКРОБОЦЕНОЗАМИ ПРИ ПРОТОЧНОМУ І
ПЕРІОДИЧНОМУ КУЛЬТИВУВАННІ.

В результаті подальшої селекції накопичувальних культур у біореакторах А, В, С, О, К були одержані відповідні мікроце-
нози, що активно руйнують АДМА і КПАР у анаеробних умовах.

Мікроценоз А очищує реальну стічну воду зі значенням ХПК 900-5100 мг/дм³ на 82-80%. Деструкція ВМА при цьому окладає 98-100% (табл.1). З метою посилення руйнування коенобіоту вивчали вплив можливих термінальних акцепторів електронів на активність анаеробної бактеріальної деструкції АДМА. Селекціо-
новані в присутності сульфату і нітрату мікроценози В і С та-
кож ефективно очищали реальну стічну воду від АДМА. Але активні процеси сульфат- і нітратредукції (СР і НР) у відповідних анае-
робних біореакторах зафіксовані не були. Ріст мікроценозів А, В, С у періодичних умовах на анаеробних синтетичних середови-
щах, що містили сольову основу і 100-150 мг/дм³ АДМА фракції С₁₀₋₁₆, свідчив про їх здатність утилізувати АДМА як єдине джерело вуглецю, азоту і неспроможність використовувати при ць-
ому сульфат і нітрат як термінальні акцептори електронів. Конт-
рольні експерименти показали, що мікроценози В і С містять,

Таблиця 1.

Деструкція АДМА у реальній стічній воді в анаеробному біореакторі А при відсутності додаткових акцепторів електронів.

Рідина, що подається		Рідина, що витікає		Очистка за ХПК, %	
ХПК, мг/дм ³	БМА, мг/дм ³	ХПК, мг/дм ³	БМА, мг/дм ³		БМА,
900	120	200	1,5	79	99,8
2500	140	600	0,8	76	99,9
3000	210	680	1,7	80	99,2
3600	280	760	3	80	98,9
4200	350	1600	6,5	62	98,1
5100	400	1300	6,0	75	98,5

Примітка. Час перебування 84 - 89 г.

відповідно, сульфат- і нітратредукуючу мікрофлору. Було досліджено також, що АДМА фракцій С₁₀₋₁₆, С₁₇₋₂₀ (200 мг/дм³) інгибує сульфідоутворення музейним штамом *Desulfovibrio desulfuricans* 1368.

Таким чином, відсутність активних процесів СР і НР в умовах анаеробної очистки реальних та модельних стічних вод від АДМА пов'язана або з неможливістю використання АДМА фракцій С₁₀₋₁₆, С₁₇₋₂₀ як донора електронів для таких процесів, або з інгибуючим впливом третинних амінів на нітрат- і сульфатредуктазну активність мікроорганізмів, як це відомо для четвертинно-амонієвих сполук (ЧАС) (Виевскій, 1994, Белоглазов та ін., 1991).

Було вивчено анаеробну деструкцію оксиду АДМА і катаміну АБ селекціонованими мікробоценозами О і К. У анаеробному проточному біореакторі О очистка модельної стічної води від оксиду АДМА відбувалася на 81-99 % (табл.2). При різних режимах експлуатації біореактору концентрація КПАР складала 360-1300 мг/дм³. Анаеробне руйнування катаміну АБ мікробоценозом К відбувалося у біореакторі при вихідних концентраціях КПАР 60-1400 мг/дм³ на 77-99 % (табл.3).

Було доведено здатність обох мікробоценозів руйнувати від-

повідні КПАР, використовуючи їх як єдині джерела вуглецю і азоту при періодичному культивуванні у анаеробних умовах.

Таблиця 2.

Деструкція оксиду АДМА в анаеробному проточному біореакторі.

Концентрація КПАР, мг/дм ³		Очистка від КПАР, %	Час перебування, доба
Рідина, що подається	Рідина, що витікає		
350	10	97	37
360	8	98	26
430	7	98	26
900	8	99	17
1250	27	97	17
1290	90	93	7
430	12	97	6
500	56	89	6
570	107	81	6

Таблиця 3.

Деструкція катаміну АБ мікробоценозом анаеробного біореактора.

Концентрація КПАР, мг/дм ³		Очистка від КПАР, %	Час перебування, доба
Рідина, що подається	Рідина, що витікає		
80	7	88	15
160	15	91	15
200	24	88	15
215	20	91	13
380	3	99	13
320	75	77	9
750	137	82	9
800	183	77	9
920	180	80	9
1040	208	80	9
1400	183	87	9

ВИДІЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ БАКТЕРІЙ - ДЕСТРУКТОРІВ АДМА, ОКСИДУ АДМА І КАТАМІНУ АБ.

Зі складу селекціонованих мікробоценозів нами було виділено 9 культур бактерій-деструкторів. Вивчено їх культурально-морфологічні і фізіолого-біохімічні ознаки. Всі бактерії виявилися грам-негативними факультативно-анаеробними паличками, здатними знижувати значення ОПН при рості на синтетичних середовищах і МПБ. Деструктори АДМА були ідентифіковані як *Bacillus laterosporus*, *B. coagulans*, *B. circulans* A, *B. polymyxa*. Вивчено деструктивну активність чистих культур при періодичному культивуванні. Найактивнішою культурою виявилася *Bacillus laterosporus* (рис.1). Культури, що руйнують оксид АДМА, були ідентифіковані як *B. alvei* і *B. circulans* O; катамін АБ - *Aeromonas hydrophila* subsp. *anaerogenes*, *Bacillus species*, *B. circulans* K. Максимальні концентрації оксиду АДМА і катаміну АБ, при яких відбувається їх анаеробна деградація виділеними культурами, становлять, відповідно, 185 мг/дм³ і 180, 240, 313 мг/дм³ для різних культур (рис.2). При вивченні деструктивної активності селекціонованих культур бактерій в анаеробних та аеробних умовах було виявлено, що у більшості випадків культури більш ефективно руйнують ксенобіотики анаеробно.

Таким чином, всі виділені культури бактерій є деструкторами АДМА і КПАР, що використовують дані ксенобіотики як єдині джерела вуглецю і азоту.

ПЕРЕТВОРЕННЯ СПЛУК АЗОТУ У ПРОЦЕСІ АНАЕРОБНОЇ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ДЕСТРУКЦІЇ АДМА, ОКСИДУ АДМА І КАТАМІНУ АБ.

Оскільки сім груп катіонних ПАР з восьми іонувчих в азотмісними і представлені амінами, їх оксидами та амонієвими сполуками, важливо було вивчити закономірності перетворення сполук азоту у процесі анаеробної мікробної деградації АДМА, оксиду АДМА і катаміну АБ та виявити їх загальні риси.

Конц. АДМА, мг/дм³

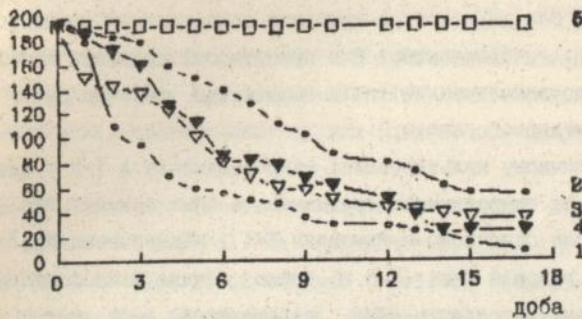


Рисунок 1. Анаэробна деструкція АДМА чистими культурами при періодичному культивуванні: 1 - *Bacillus laterosporus*, 2 - *B. coagulans*, 3 - *B. circulans* A, 4 - *B. polymyxa*, 5 - контроль.

Конц. КПАР, мг/дм³

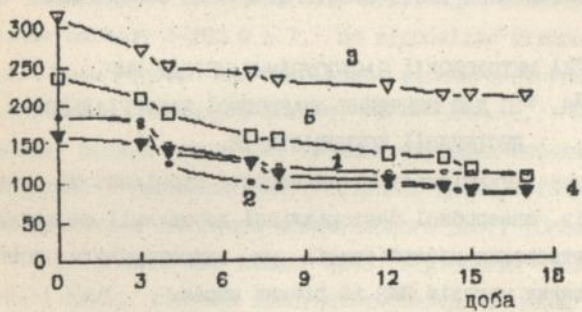


Рисунок 2. Анаэробна деструкція оксиду АДМА (1-3) і катеміну АБ (4,5) чистими культурами при періодичному культивуванні: 1 - *Bacillus alvei*, 2 - *B. circulans* O, 3 - *Bacillus* sp., 4 - *Aeromonas hydrophila* subsp. anaerogenes, 5 - *B. circulans* K.

Показано, що в ході очиски реальної стічної води від АДМА у біореакторі А без додаткового внесення термінальних акцепторів електронів і у біореакторі В в присутності сульфату відбувалося поступове накопичення іонів амонію (до 100 мг/дм^3) і утворення молекулярного азоту.

При періодичному культивуванні мікроценозів А і В у анаеробних умовах на синтетичних середовищах в АДМА фракції O_{10-16} також відбувалося одночасне руйнування ВМА і накопичення NH_4^+ у рідині та N_2 у газовій фазі (рис.3). Тобто, обидва мікроценози здійснювали повну деградацію АДМА, перетворюючи азот аміну у амонійний та молекулярний.

Анаеробна деструкція оксиду АДМА і катаміну АБ селекціонованими мікроценозами О і К, чистими культурами та їх штучно сформованими асоціаціями при безперервному і періодичному культивуванні на синтетичних середовищах, де КІАР були єдиними джерелами вуглецю і азоту, супроводжувалася утворенням молекулярного азоту. Накопичення іонів амонію кількісно зафіксовано не було.

РОЗРОБКА МЕТОДОЛОГІЇ ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДУ ЯМР ^1H , ^{13}C , ^{14}N , ^{17}O ДЛЯ ВИВЧЕННЯ АНАЕРОБНОЇ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ДЕСТРУКЦІЇ КСЕНОБІОТИКІВ.

Для визначення функціональної належності проміжних та кінцевих продуктів анаеробної бактеріальної деструкції та шляхів мікробного перетворення ксенобіотиків ми запропонували комплексне застосування методів ЯМР на різних ядрах.

Було показано, що технічний препарат АДМА більш, ніж на 95% являє собою сполуку $\text{N}(\text{CH}_3)_2\text{C}_{13}\text{H}_{27}$. Домішкою є аміни з іншою довжиною вуглецевого ланцюга.

Спектри ЯМР ^1H , ^{13}C і ^{14}N проб, відібраних після 72-годинного перебування рідини у біореакторі, в порівнянні з даними спектрів АДМА, доводять повну деструкцію ксенобіотика асоціаці-

бу бактерій-деструкторів.

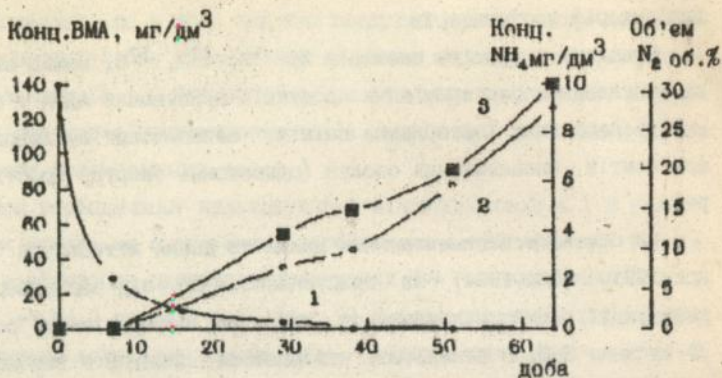
Виходячи з аналізу спектрів ЯМР ^1H , ^{13}C , ^{17}O , можна вказати на іонування серед проміжних продуктів руйнування АДМА у біореакторі первинних і вторинних амінів, ненасичених вуглеводневих фрагментів, кисневмісних сполук (одноатомні спирти, прості ефіри).

На основі експериментальних даних та даних літератури (Саганов, 1991, King, 1984) ми припускаємо, що під час анаеробної деструкції АДМА відбуваються гомо- чи гетеролітичні розриви β -зв'язку C-C. В результаті утворюються сполуки з високою реакційною здатністю, що зумовлює проходження різноманітних реакцій, у тому числі спряжених з розривом зв'язків C-N, що, можливо, також відбувається за схемою гомо- і гетеролітичного розпаду.

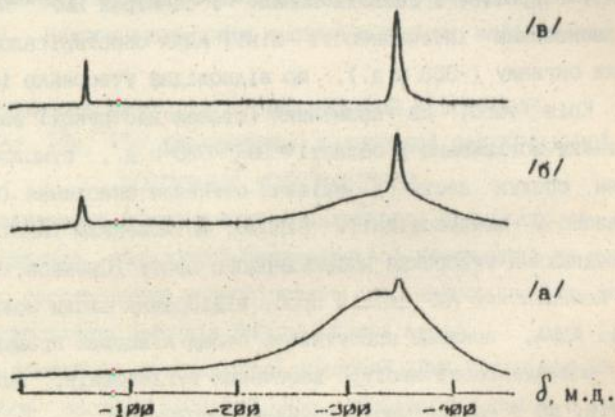
Поряд з окисно-відновними, відбуваються кислотно-основні реакції гідролізу і дегамінування. У спектрах ЯМР ^{14}N (рис.4) зі зменшенням інтенсивності лінії АДМА спостерігалось підсилення сигналу (-353 м.д.), що відповідає утворенню іонів амонію. Крім того, на проміжних етапах деструкції зафіксовано зростання поглинання в області -30- -320 м.д., зумовлене утворенням сполук азоту зі змінним ступенем окислення (гідразо-, гідразоно-, азенпохідні). Відомо, що молекули таких сполук є попередниками утворення молекулярного азоту (Саганов, 1991).

Комплексійний ЯМР аналіз проб, відібраних після повної деструкції АДМА, показав присутність серед кінцевих продуктів амонію, молекулярного азоту, насичених вуглеводнів, одноатомних спиртів, що є екологічно безпечними сполуками.

Застосування розробленої методології ЯМР аналізу дозволило вивчити динаміку розподілу протонів, кисню, вуглецю, азоту між проміжними та кінцевими продуктами анаеробного бактеріального руйнування АДМА; дало можливість підтвердити здійснення двох



Рисонок 3. Зменшення концентрацій АДМА (1), амонію (2) та утворення молекулярного азоту (3) під час періодичного культивування мікробіоценозу А.

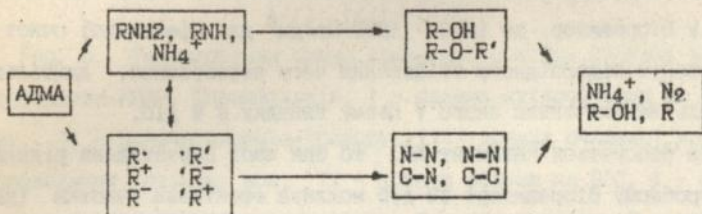


Рисонок 4. Зміни форм існування азоту за 36 (а), 48 (б), 72 години (в) за даними ЯМР ¹⁴N.

шляхів перетворення азоту АДМА:

- 1) $N(\text{АДМА}) \rightarrow \text{дезамінування} \rightarrow \text{NH}_4^+$,
- 2) $N(\text{АДМА}) \rightarrow -N-N-, -N-N- \rightarrow \text{N}_2$

та припустити узагальнену схему деструкції АДМА:



РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОЧИСТКИ СТИЧНИХ ВОД
ВИРОБНИЦТВА КПАР.

Биділені 9 культур - деструкторів АДМА, оксиду АДМА і катаміну АВ були використані при розробці анаеробного мікробіологічного способу локальної очистки стічних вод виробництва КПАР. На їх основі було сформовано асоціації, що містили культури у рівному співвідношенні, і в анаеробних біореакторах здійснювали очистку реальної та модельних стічних вод.

Асоціація бактерій - деструкторів АДМА очищала реальну стічну воду зі значенням ХПК 1200 - 5000 мг/дм³ до 200 - 1100 мг/дм³. РМА (190 - 600 мг/дм³) при цьому повністю руйнувалися. Проаналізовано залежність очистки від вихідної концентрації забруднювача та часу перебування стічної рідини у біореакторі. Визначено, що збільшення значень ХПК рідини, що подається у біореактор, до 4000 мг/дм³, дозволяє очищати воду на 78 - 88 % (час перебування 84 години). При цьому РМА на виході відсутні, а ХПК складає 200 - 480 мг/дм³, що дозволяє здійснювати її доочистку у системі біологічних очисних споруд (БОС).

Одержано ефективну очистку модельної стічної води від ок-

ЛІБ ім. В. Стефаніка
АН України

оксиду АДМА. Час перебування 6-7 діб забезпечує руйнування 500 мг/дм³ КІАР на 97 %, а залишкове забруднення 15 мг/дм³ не перевищує гранично допустимих концентрацій оксиду АДМА для подачі на БОС. Підвищення концентрації коенобіотика у воді, що подається у біореактор, до 1000 - 1300 мг/дм³ для ефективної очистки потребує відповідного збільшення часу перебування, найбільш оптимальним значенням якого у цьому випадку є 9 діб.

Що стосується катаміну АВ, то при часі перебування рідини у анаеробному біореакторі 13 діб можлива ефективна очистка (до 99 %) стічної води, що містить до 1000 мг/дм³ КІАР. Зменшення часу перебування, хоча і забезпечує високий показник очистки (96,8% , 91%), але при цьому рівень залишкового забруднення перевищує 20 мг/дм³, що неприпустимо для подальшої доочистки на БОС.

Одержані результати дали нам змогу запропонувати біотехнологію локальної мікробної анаеробної очистки стічних вод виробництва КІАР. Для впровадження запропонованої біотехнології нами розроблена технологічна схема очистки стічних вод виробництва КІАР (рис.5), згідно якої стоки з цеху по виробництву КІАР (оксиду АДМА та катаміну АВ), а також цеху по виробництву попередників промислового синтезу КІАР (АДМА) надходять у приймальний резервуар (накопичувач), а звідти - самопливом в усереднювач. В усереднювачі стічні води розводяться до відповідних вихідних характеристик (ХПК стоку з АДМА до 1200-4000 мг/дм³, концентрація КІАР до 1000 мг/дм³). Сюди ж із баку з реагентами подається джерело фосфору. Концентрація Na_2HPO_4 у стічній рідині розраховується із співвідношення ХПК:Р=400:1. В усереднювачі стік постійно перемішується за допомогою насоса. Після цього потік

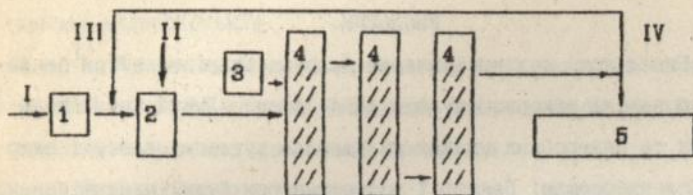


Рис. 5. Технологічна схема локальної очистки стічних вод виробництва КПАР. Специфікація: I - подача стічної води на очистку, II - подача джерела фосфору, III- подача очищеної води для ровведення стічних вод, IV - подача рідини на БОС. 1 - приймальний резервуар (накопичувач), 2 - уосереднювач, 3 - розплідник, 4 - анаеробний біореактор із завантаженням, 5 - БОС.

стічної води самопливом чи за допомогою насосу спрямовується у анаеробний біореактор. Анаеробний біореактор являє собою герметично закритий трьохсекційний резервуар. У прямокутних секціях реактору вміщуються завантаження - рами, на яких закріплена склотканина або синтетичне волокно ПВС. Час перебування у анаеробному біореакторі стічної води, що містить АДМА - 84 години, отоку, що містить оксид АДМА - 6-9 діб, катамін АВ - 13 діб. Температурні умови у перших двох випадках термофільні (44⁰С), у останньому випадку - мезофільні (20⁰С). Пусковий режим - 100 - 120 діб.

Після мікробіологічної очистки із анаеробного біореактора частина води може бути використана для ровведення основного потоку стічних вод виробництва КПАР, який надходить на локальну мікробіологічну очистку. Друга частина надходить у біологічні очисні споруди.

ВИСНОВКИ.

1. Внаслідок селекції вперше були одержані культури бактерій, що здатні використовувати АДМА, оксид АДМА і катамін АБ в аеробних та анаеробних умовах як джерела вуглецю, азоту і енергії. Селекціоновані бактерії - деструктори були ідентифіковані як *Bacillus laterosporus*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. polymyxa* (АДМА); *B. alvei*, *B. circulans* (оксид АДМА); *Aeromonas hydrophila* subsp. *anaerogenes*, *B. species*, *B. circulans* (катамін АБ).

2. Встановлено, що асоціація бактерій *Bacillus laterosporus*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. polymyxa* в анаеробних умовах очищає стічну воду від АДМА при значеннях ХПК 1200 - 4000, концентрації ЕМА 150 - 600 мг/дм³ на 80 - 88, 100%, відповідно, при часі перебування 84 години.

3. Показано, що асоціація бактерій *Bacillus alvei*, *B. circulans* анаеробно руйнує катамін АБ на 95 - 99 % при концентрації КПАР 400-1000 мг/дм³ і часі перебування 13 діб.

4. Встановлено, що асоціація бактерій *Aeromonas hydrophila* subsp. *anaerogenes*, *Bacillus* sp., *B. circulans* очищає модельну стічну воду від оксиду АДМА при концентрації КПАР 300-570 мг/дм³ і часі перебування 6-7 діб в анаеробному біореакторі на 88-97% .

5. Досліджено, що у процесі анаеробної деструкції АДМА, відбувається трансформація азоту молекули з утворенням аммонійного та молекулярного азоту. Азот молекул оксиду АДМА і катаміну АБ перетворюється до молекулярного азоту.

6. Розроблено методологію азотосування методу ЯМР на ядрах ¹H, ¹³C, ¹⁴N, ¹⁷O для вивчення бактеріальної анаеробної дест-

рукції коенобіотиків.

7. Доведено, що внаслідок анаеробної мікробної очистки модельної стічної води відбувається повне руйнування АДМА та утворення екологічно прийнятних продуктів.

8. Розроблено технологічну схему локальної мікробної очистки стічних вод виробництва КПАР в анаеробних умовах.

Список робіт, надрукованих за темою дисертації.

1. Радченко О.С., Таранова Л.А., Патраучан М.А. Роль анаеробних бактерій в аэробном биореакторе, очищающем сточную воду от исходных продуктов синтеза КПАВ//Химия и технология воды.- 1992.-14, N7.-С.552-557.

2. Радченко О.С., Патраучан М.А. Микробная очистка сточных вод от алкилдиметиламинов в анаэробных условиях// Химия и технология воды.- 1994.-16, N6.-С. 667-672.

3. Радченко О.С., Патраучан М.А., Ставокая С.С. Микрофлора биореактора, очищающего сточную воду от алкилдиметиламинов// Химия и технология воды.-1994.-16, N6.-С.673-677.

4. Патраучан М.А., Радченко О.С. Микробная очистка сточных вод от алкилдиметиламинов в анаэробных условиях. Тез. докл. Междунар. конф. "Биология и биотехнология очистки воды", Полтава, 1992.-С.41.

5. Радченко О.С., Патраучан М.А. Микробная деструкция катина АБ в анаэробных условиях. Тез. допов. I з'їзду Українського мікробіол. товариства, Одеса// Мікробіол. журнал.-1994.-58, N4.-С.89.

АНОТАЦІЯ.

Патраучан М. А. Бактериальная деструкция катионных поверхностно-активных веществ при анаэробной очистке сточных вод.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности "микробиология - 03.00.07", Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного, Киев, 1995.

Защищено 5 научных работ, которые содержат результаты теоретических и экспериментальных исследований. Установлена возможность анаэробного бактериального разрушения АДМА, оксида АДМА и катамина АБ. Впервые селекционированы, выделены и идентифицированы высокоактивные культуры бактерий-деструкторов АДМА (*Bacillus laterosporus*, *B. coagulans*, *B. circulans* А, *B. polymyxa*), оксида АДМА (*B. alvei*, *B. circulans* D), катамина АБ (*Aeromonas hydrophila* subsp. *anaerogenes*, *Bacillus* sp., *B. circulans* К). С помощью разработанной методологии комплексного ЯМР анализа на ядрах ^1H , ^{13}C , ^{14}N , ^{17}O изучен состав промежуточных и конечных продуктов анаэробной бактериальной трансформации изучаемых коенобиотиков. Все продукты деструкции (аммоний, молекулярный азот, насыщенные углеводороды, одноатомные спирты) являются экологически безопасными для окружающей среды оседлениями. Разработана технологическая схема локальной анаэробной микробной очистки сточных вод производства КПАВ.

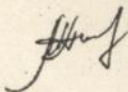
Ключевые слова: микробценоз, анаэробный биореактор, селекция, бактерии-деструкторы, катионные поверхностно-активные вещества.

Patrauchan M.A. Bacterial destruction of cationic surfactants within anaerobic sewage purification.

The thesis competing for Philosophical Degree, speciality 03.00.07 - microbiology, Institute of Microbiology and Virology, Kiev, 1995.

It is defended 5 scientific paper, which contain theoretical and experimental researches results. It is determined the possibility of anaerobic bacterial ADMA, oxide ADMA, katamin AB destruction. The highly active bacteria - destructors strains, which utilising ADMA (*Bacillus laterosporus*, *B. coagulans*, *B. circulans* A, *B. polymyxa*), oxide ADMA (*B. alvei*, *B. circulans* O), katamin AB (*Aeromonas hydrophila* subsp. *anaerogenes*, *Bacillus* sp., *B. circulans*) are selected, isolated and identified at the first time. With using of the elaborated NMR (^1H , ^{13}C , ^{14}N , ^{17}O) analyse methodology the products of detergents anaerobic bacterial destruction are studied. All products of destruction (ammonium, molecular nitrogen, uniatomic alcohols, saturated hydrocarbons fragments) are ecologically harmless. The technological scheme of local anaerobic microbial sewage treatment from cationic surfactants is development.

Key-words: microbocenos, anaerobic bioreactor, selection, bacteria-destructors, cationic surfactants.



Підписано до друку 13.IX.95р. формат 60x84/16
Папір друк. Умов. друк. л. 1,0. Тираж 100 примірник. Заказ №1341

Надруковано ЦУОП ДНПІ "Плодвінконсерв" м. Київ, Саксаганського, 1

443182

AB 33.046