

УДК 579.66

Д.Г.ЧУХЧИН, Е.А.ВАРАКИН, В.А.РУДАКОВА, Ю.В.ЧУРКИНА, Е.В.НОВОЖИЛОВ*

Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова, Архангельск, 163002

e-mail: biotech@narfu.ru
e.novozhilov@narfu.ru

Анализ окислительной способности микроорганизмов биопленки путем определения их дегидрогеназной активности

Дана оценка общей окислительной способности микроорганизмов активного ила, находящихся в биореакторе в виде прикрепленной микрофлоры (биопленки). С этой целью использован метод определения дегидрогеназной активности (ДГА), основанный на применении метиленового синего в качестве индикатора. Выявлен нелинейный характер кинетической кривой реакции биологического окисления субстрата (глюкозы), который, по-видимому, объясняется особенностями накопления в биомассе медиаторов дыхательного процесса. Оценен запас этих медиаторов окислительно-восстановительных реакций, представлены данные, характеризующие уровень ДГА биопленки (~70 нмоль/мин/мг сухой биомассы, или ~180 нмоль/мин/мг белка). Это значение свидетельствует о высоком окислительном потенциале биопленки активного ила в биореакторах.

Ключевые слова: активный ил, биологическая очистка, биопленка, дегидрогеназная активность, микроорганизмы.

В основе одного из важнейших биотехнологических процессов очистки сточных вод лежит метод аэробной биологической деконтаминации с применением активного ила, представляющего собой сообщество микроорганизмов, родовой и видовой состав которых определяется конкретными условиями. Чрезвычайное разнообразие веществ, содержащихся в стоках, количество и состав которых периодически изменяется, приводит к тому, что на практике часто применяют многоступенчатые схемы очистки сточных вод с использованием биореакторов.

Основу промышленной технологии очистки сточных вод составляет биологическое окисле-

ние загрязнений. Повышение эффективности процессов биологической очистки связано, в частности, с использованием биореакторов с прикрепленной микрофлорой. Эта технология имеет очевидные перспективы, так как позволяет увеличить окислительную способность микроорганизмов и устойчивость их к неблагоприятным факторам, тем самым интенсифицируя процесс очистки и значительно уменьшая прирост биомассы ила [1]. В биореакторе происходит окисление большинства органических, а также некоторых неорганических загрязнений [2].

Биопленка, образованная иммобилизованными клетками микроорганизмов, формируется

Чухчин Дмитрий Германович, Варакин Евгений Александрович, Рудакова Вера Алефтиновна, Чуркина Юлия Викторовна, Новожилов Евгений Всеволодович.

Список сокращений: ВЕ — восстановительная емкость; ДГА — дегидрогеназная активность; МС — метиленовый синий; ОП — оптическая плотность; ТТХ — 2, 3, 5-трифенилтетразолий хлорид; АТФ — аденозинтрифосфат; NAD — никотинамидадениндинуклеотид; NADP — NAD-фосфат.

* Автор для переписки.

на твердой поверхности насадки, погруженной в объем жидкости аэробных биореакторов. Состав микрофлоры ила аэротенков и биопленки при очистке одной и той же сточной воды качественно одинаков, однако имеются различия в соотношении различных видов микроорганизмов. Показателем хорошего состояния биопленки является наличие инфузорий кругловых, брюхоносовых, жгутиковых, червей *Nematoda* и коловраток [3]. Контроль состояния и функционирования клеток возможен по изменению оптической плотности (ОП) суспензии или биопленки путем прямого подсчета клеток или по уровню содержания в клетках аденозинтрифосфата (АТФ).

Способность микроорганизмов разрушать органические загрязнения определяется их концентрацией и активностью ферментных систем. Основная роль принадлежит оксидоредуктазам, которые осуществляют первые этапы разрушения сложных соединений сточных вод до более простых веществ, которые затем подвергаются дальнейшему разложению с помощью других ферментов. Из оксидоредуктаз самыми распространенными являются дегидрогеназы. Суммарная активность данных ферментов является ключевым показателем для оценки физиологического и функционального состояния микроорганизмов [4], характеризуя скорость и глубину процессов биологического окисления, поэтому актуальной является количественная оценка дегидрогеназной активности ила очистных сооружений.

Известен способ определения ДГА, основанный на восстановлении индикатора 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида (ТТХ) с последующим фотометрическим анализом полученного раствора [5]. Данная методика имеет существенные недостатки: многостадийность, длительность и трудоемкость. Она включает применение нескольких реагентов, добавляемых на разных этапах процесса, многократное центрифугирование, термостатирование около 1 ч и выдерживание в течение 20—30 мин перед фотометрированием [4, 5]. В целом условия выполнения анализа не позволяют обеспечить высокую воспроизводимость результатов. В случае нелинейности процесса одно и то же количество ТТХ может быть восстановлено разным количеством фермента. Из-за большой длительности определения эта методика не может быть использована для проведения экспресс-анализов.

Перспективным реагентом для качественного анализа наличия живых и функционирующих клеток является краситель метиленовый синий (МС). Он хорошо растворим в воде, в малых кон-

центрациях слабоокисчен, свободно проникает и удаляется из клеток микроорганизмов. Растворы окисленных производных этого реагента имеют относительно высокую оптическую плотность, в то время как в восстановленном состоянии реактив практически бесцветен. Водород, отщепляемый от окисляемого субстрата в присутствии ферментов, переносится на МС, по степени обесцвечивания которого можно судить об активности окислительных процессов в клетке. Эта реакция применяется для того, чтобы визуально отличить колонии живых от колоний мертвых дрожжей, для качественного определения антибиотиков, витального окрашивания микроорганизмов при микроскопировании [6, 7]. Известен метод определения степени обсеменения непастеризованного молока микрофлорой, основанный на реакции красителя МС в присутствии продуктов жизнедеятельности бактерий [8]. В ряде работ были предприняты попытки автоматизировать данный метод [9, 10].

Ранее был предложен способ количественного определения ДГА микроорганизмов [11], в котором в качестве акцептора водорода был использован МС. Основным преимуществом способа является его оперативность: длительность анализа не превышает 10 мин. Показана применимость этого способа для определения значений общей ДГА ила, взятого из аэротенков очистных сооружений [12].

Целью данной работы было применение этого способа определения ДГА для изучения динамики окислительной способности микроорганизмов в составе биопленки в биореакторе, работающем на первой ступени аэробной биологической очистки сильнозагрязненных сточных вод.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Объект исследования. Использовали образцы биопленки, отобранные из биореактора очистных сооружений одного из предприятий химико-лесного комплекса. В состав стоков наряду с промышленными входят также коммунальные сточные воды в количестве до 10 %. С использованием методики [13] были получены данные о том, что наиболее многочисленным родом в микрофлоре аэробных очистных систем являются бактерии *Pseudomonas*. Кроме бактерий в микрофлоре биопленок присутствуют одно- и многоклеточные эукариотические организмы: инфузории, амёбы, жгутиконосцы, коловратки, нематоды, черви. Методом микроскопирования [13] в биопленке промышленного биореактора обнаружены жгутиконосцы



Рис. 1. Насадка для иммобилизации биопленки микроорганизмов в биореакторе

Bodo putrinus и *Oicomonas*, брюхожесничные инфузории *Aspidisca costata*, одиночные прикрепленные инфузории *Vorticella microstoma*, а при низкой нагрузке — инфузории *Vorticella convallaria*.

Подготовка образцов биопленки для анализа ДГА. Биологическую очистку сточных вод осуществляли в промышленном реакторе, на поверхности насадки которого образовывалась и развивалась биопленка. Насадка представляет собой небольшие полиэтиленовые цилиндры с продольными ребрами, которые увеличивают поверхность соприкосновения биопленки с очищаемой водой (рис. 1). Цилиндры имеют массу 2,10—2,25 г и общую площадь поверхности около 0,052 м². При работе реактора количество биомассы, иммобилизованной на одной насадке, составляло от 3,5 до 4,1 г, в среднем около 3,7 г по сухому веществу.

Насадки с прикрепленной микрофлорой извлекали из биореактора, пробы биопленки отбирали и проводили их подготовку непосредственно перед определением ДГА. Для быстрого отделения образца биопленки был изготовлен специальный пробоотборник. С помощью заточенных кромок пробоотборника отделяли фрагмент пластмассовой насадки площадью 1,0 см² вместе с биопленкой микроорганизмов. При таком способе биомассу отбирали по всей толщине биопленки, которая находилась с двух сторон отделенного фрагмента насадки. Масса образца биопленки составляла примерно 6—8 мг по абсолютно сухому веществу.

Биомассу отделяли от материала насадки, диспергировали вручную в 200 мл дистиллированной воды и определяли в ней концентрацию сухих веществ. В отдельных пробах определяли массовую долю белка по Несслеру [14] и зольность [14, 15], которые составляли соответственно 36—44 % и 13—14 %. В пробе биопленки, которую использовали в дальнейших экспериментах, концентрация сухих веществ после диспергирования была равна 0,036 г/л; массовая доля белка составляла 41,9 % от сухих веществ, зольность — 13,7 %.

Анализ ДГА выполняли в специально изготовленном устройстве [16] (рис. 2). Оно позволяет поддерживать в реакционной ячейке постоянную температуру ($25 \pm 0,1^\circ$), определять ОП суспензии биопленки, производить перемешивание, избегая попадания кислорода в среду. Сточные воды в присутствии суспензии организмов активного ила обладают высокой мутностью, что затрудняет количественное определение окрашенных соединений. В связи с этим измерение ОП проводили при

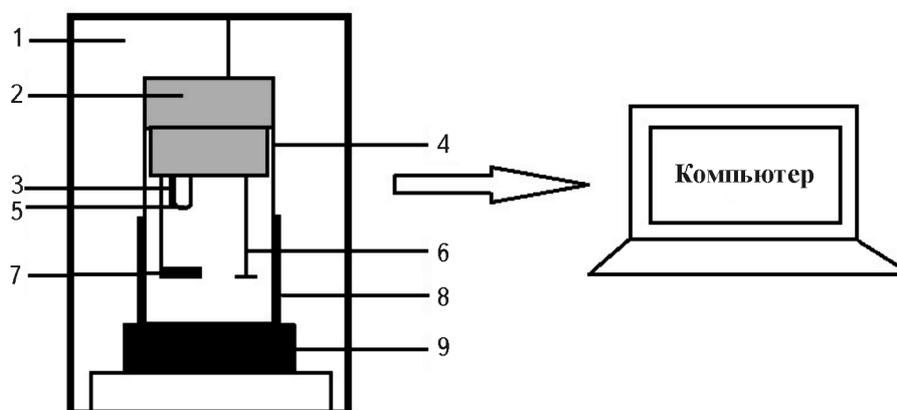


Рис. 2. Схематическое изображение устройства для определения дегидрогеназной активности микроорганизмов: 1 — металлический корпус; 2 — крышка со встроенной системой измерения; 3 — фотодатчик (фотоприемник); 4 — стеклянный стакан для исследуемой пробы; 5 — светодиод; 6 — мешалка; 7 — отражатель света; 8 — металлический стакан, имеющий слой теплоизоляции; 9 — блок для обеспечения термостабилизации пробы

длине волны 660 нм, соответствующей максимуму поглощения МС, что способствовало снижению влияния на ОП микроорганизмов и примесей размером до 2 мкм. С помощью данного устройства для определения ДГА удалось нивелировать эффект многих из возможных помех, в частности, мутности и сорбции красителя, так как в этих условиях фиксируется изменение ОП в одной и той же реакционной среде.

Для калибровки реакционной ячейки устройства строили график зависимости показаний фотодатчика от концентрации МС, которые пропорциональны величине ОП среды [11]*. Проводили аппроксимацию по линейной зависимости и определяли коэффициент тангенса угла наклона касательной к оси абсцисс. Полученное значение, равное 0,025 нмоль, использовали в расчетной формуле для определения ДГА биомассы [11, 12].

Для проведения анализа в измерительную ячейку вносили 60 мл дистиллированной воды, затем при перемешивании вводили 2 мл подготовленной суспензии микроорганизмов биопленки. На определение ДГА было взято 0,072 мг биомассы по сухому веществу, которые содержали 0,030 мг белка. Далее добавляли субстрат (1 мл 10%-ного раствора глюкозы). Объем в ячейке доводили дистиллированной водой до метки. После стабилизации показаний фотодатчика с помощью дозатора вводили 50 мкл 0,2 %-ного раствора МС в качестве акцептора водорода.

Показания прибора фиксировали с интервалом 1 с, кинетику реакции исследовали не более 300 с, так как далее при полном восстановлении всего добавленного количества МС процесс становился нелинейным. Суммарная продолжительность анализа с момента внесения пробы составляла 5—7 мин.

Общая формула для расчета значений ДГА (на линейном участке зависимости) приведена в патенте [11]; в более удобном для расчета виде она представлена ниже:

$$A = \frac{0,025 \cdot K \cdot 60}{t}, \text{ нмоль/мин/мг}, \quad (1)$$

где 0,025 — тангенс угла наклона кривой зависимости количества МС от показаний устройства, нмоль (определен при калибровке) [13, 14]; K — тангенс угла наклона кривой зависимости показаний устройства от продолжительности реакции,

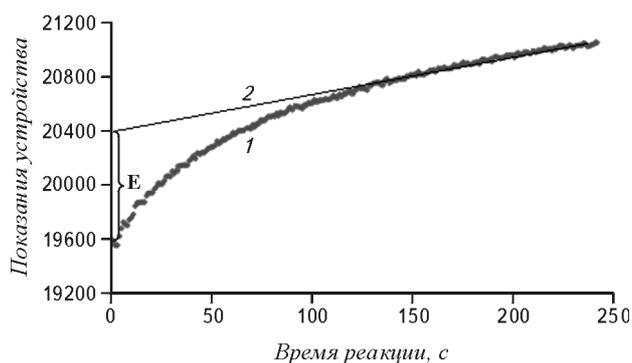


Рис. 3. Зависимость изменения показаний устройства от продолжительности ферментативной реакции окисления метиленового синего биомассой биопленки: 1 — экспериментальная кривая; 2 — касательная к кривой в точке, соответствующей 140 с (установлена экспериментально для данных условий) для определения ВЕ (см. текст ниже)

1/с (рис. 3.); 60 — коэффициент перевода секунд в минуты; m — масса белка в пробе биопленки, взятой на определение ДГА, мг.

Результаты экспериментов воспроизводимы; в каждом опыте проводилось несколько сотен измерений, максимальная погрешность которых составляла менее 5% [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Функция дегидрогеназ состоит в том, что они осуществляют реакцию переноса протонов и электронов от органических соединений (метаболитов) на акцептор, которым является кислород [3]. Ранее было установлено, что при определении ДГА микроорганизмов активного ила, взятого из аэротенков, работающих в аэробном режиме, при избытке субстрата (глюкозы) и акцептора водорода (МС) протекание окислительно-восстановительной реакции имеет линейный характер и определяется только концентрацией и активностью дегидрогеназ [12].

Как известно [2], биопленка активного ила представляет собой довольно объемное образование, ее обычная толщина составляет 0,5—1,0 мм, а максимальная достигает 3 мм. Диффузия кислорода в глубину крупных агрегатов биопленки сильно затруднена, поэтому значительная часть микроорганизмов функционирует в анаэробных условиях.

Количество биомассы, отобранной для анализа, ограничено условиями работы устройства,

* Данные измерительного устройства — это численные показания (безразмерные) аналого-цифрового преобразователя.

главным образом, заданным расходом МС. Толщина биопленки и ее распределение на поверхности насадки, а также концентрация в ней микроорганизмов могут меняться в широких пределах, что затрудняет отбор усредненной пробы биомассы. Использование специального пробоотборника (см. «Условия эксперимента») позволило упростить и вместе с тем стабилизировать количество отбираемого образца биопленки.

Ранее нами была показана линейная кинетика изменения ДГА активного ила, взятого из аэротенков [12]. Однако на начальном этапе окисления МС ферментами биопленки была обнаружена значительная нелинейность течения реакции (см. рис. 3). Наибольшие изменения происходят в интервале 0—60 с, далее наблюдалось постепенное «выпрямление» кинетической кривой. Примерно через 140—180 с после начала измерения характер протекания реакции становился линейным и далее зависел только от концентрации дегидрогеназ.

Наиболее вероятной причиной нелинейного характера полученной зависимости являются биохимические процессы, протекающие в дыхательной цепи клеток микроорганизмов. В процессе жизнедеятельности микроорганизмы с помощью дегидрогеназ катализируют перенос водорода от субстрата к различным медиаторам окислительно-восстановительной реакции (NAD, NADP, флавопротеин, убихинон, различные виды цитохромов и т.д.). Электроны, поступающие в дыхательную цепь, по мере их продвижения от одного переносчика к другому теряют свободную энергию. Значительная часть этой энергии запасается в форме АТФ [3]. При избытке кислорода медиаторы находятся в окисленном состоянии, а скорость реакции окисления субстрата лимитируется активностью и концентрацией дегидрогеназ.

Отклонение от линейной зависимости определяется долей микроорганизмов, функционирующих в анаэробном режиме, а также интенсивностью происходящих дыхательных процессов. При недостатке кислорода скорость реакции окисления субстрата определяется количеством медиаторов в восстановленной форме, запас которых расходуется в первую очередь.

С учетом полученных зависимостей предлагается ввести новую характеристику, которую можно назвать восстановительной емкостью микроорганизмов биопленки. Восстановительная емкость (ВЕ) — это величина, характеризующая наличие в активном иле медиаторов дыхательного процесса, находящихся в восстановленной форме и способных восстанавливать МС. Количественно ВЕ пропорционально величине отрезка E на

оси ординат (см. рис. 3.) и определяется по формуле:

$$BE = \frac{0,025 \cdot E}{m}, \text{ нмоль/мг белка,} \quad (2)$$

где 0,025 — тангенс угла наклона зависимости количества МС от изменений показаний устройства, нмоль; E — отрезок на оси ординат, отсекаемый касательной к кривой зависимости показаний устройства от продолжительности реакции окисления; m — масса белка в пробе биопленки, взятой на определение ДГА, мг.

Для приведенного графика (см. рис. 3) при значении E , равном 800 (см. ось ординат, график на рис. 3), значение восстановительной емкости (ВЕ), рассчитанное по формуле (2), равно 667 нмоль/мг белка. Запас ВЕ микроорганизмов биопленки в промышленном реакторе изменялся в широких пределах от 125 до 1250 нмоль/мг белка.

ВЕ испытывает влияние со стороны изменения концентрации кислорода в биореакторе, увеличения или уменьшения поступления в биореактор легкоокисляемых веществ, интенсивности окислительно-восстановительных процессов в клетках.

В условиях проведения анализа весь запас медиаторов был, по-видимому, использован в реакции окисления МС примерно через 140 с после начала реакции, после чего в клетках микроорганизмов активировались электрон-транспортные системы [17]. Далее скорость реакции, скорее всего, определялась только ДГА микроорганизмов.

Уравнение, описывающее линейный участок кривой в интервале 140—250 с (см. рис. 3), имеет следующий вид:

$$y = 2,53x + 20400$$

с коэффициентом детерминации 0,981.

Количественно ДГА микроорганизмов биопленки в линейной фазе процесса определяли по формуле (1),

$$A = 2,53 \cdot 0,025 \cdot 60 / 0,030 = 127 \text{ нмоль/мин/мг белка.}$$

Результаты нескольких месяцев мониторинга работы промышленного биореактора представлены в таблице.

ДГА ила при очистке сточных вод в аэротенках находилась в интервале 3—11 нмоль/мин·мг белка. Из таблицы видно, что значения ДГА биопленки находятся в интервале 75—300 нмоль/мин·мг белка. Таким образом, ДГА иммобилизованных микроорганизмов в биореакторе превышает ДГА микроорганизмов в аэротенках почти в 30 раз, что объясняет высокую эффективность работы биореактора.

Анализ окислительной активности биопленок очистных сооружений

Дегидрогеназная активность		Восстановительная емкость	
нмоль/мин/мг абс. сух. биомассы	нмоль/мин/мг белка	нмоль/мг абс. сух. биомассы	нмоль/мг белка
31—125	75—300	52—520	125—1250

ВЕ для активного ила аэротенков близка к 0, так как медиаторы дыхательной цепи находятся в окисленном состоянии и не участвуют в реакции восстановления МС.

Таким образом, разработана методика отбора и подготовки проб биопленки активного ила для определения ДГА микроорганизмов в ее составе, оценен характер протекания окислительно-восстановительных процессов в биопленке. Для характеристики биологического окисления в условиях дефицита кислорода предложен новый показатель — восстановительная емкость микроорганизмов биопленки. Показано, что ДГА биопленки может иметь значительно более высокие значения, чем ДГА активного ила в аэротенках, что свидетельствует о ее более высоком окислительном потенциале.

Работа выполнена при финансовой поддержке базовой части государственного задания (проект №3620 Минобрнауки РФ).

Получено 30.09.15

ЛИТЕРАТУРА

1. Максимова Ю.Г. Микробные биопленки в биотехнологических процессах // Биотехнология. — 2013. — № 4. — С. 9 — 23.
2. Сироткин А.С., Шагинурова Г.И., Инполитов К.Г. Агрегация микроорганизмов: флоккулы, биопленки, микробные гранулы. — Казань: Изд-во «Фэн» АН РТ, 2007. — 160 с.
3. Шлегель Г. Общая микробиология. — М.: Мир, 1987. — 567 с.
4. Гюнтер Л.И., Казаровец Н.М. Методика определения дегидрогеназной активности и окислительно-восстановительного потенциала при технологическом контроле за работой аэротенков. — М.: ОНТИ АКХ им. К.Д. Памфилова, 1970. — 16 с.
5. Bhupathiraju, V. K. Application of a tetrazolium dye as an indicator of viability in anaerobic bacteria / V. K. Bhupathiraju, M. Hernandez, D. Landfear, L. Alvarez-Cohen // J. Microbiol. Meth. — 1999. — V. 37. — N 3. — P. 231 — 243.
6. Меледина Т.В., Давыденко С.Г., Васильева Л.М. Физиологическое состояние дрожжей. Учеб. пособие. — СПб.: НИУ ИТМО; ИХиБТ, 2013. — 48 с.
7. МУ 4.2.026-95. Экспресс-метод определения антибиотиков в пищевых продуктах. Методические указания. — М.: Инф.-издат. центр Госкомсанэпиднадзора РФ, 1995. — 20 с.
8. ГОСТ 9225-84. Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа. — М.: Госстандарт СССР, 1986.
9. Lee, Y. A rapid and selective method for monitoring the growth of coliforms in milk using the combination of amperometric sensor and reducing of methylene blue / Y. Lee, H. Wu, C. Hsu, H. Liang, C. Yuan, H. Jang // Sensors and Actuators B: Chemical. — 2009. — V. 141. — N 2. — P. 575 — 580.
10. Ahmad, I. An automatic procedure for rapid online estimation of raw milk quality // I. Ahmad, V. Jindal // LWT - Food Sci. Technol. — 2006. — V. 39. — N 4. — P. 432—436.
11. Чухчин Д.Г., Тупин П.А. Способ количественного определения дегидрогеназной активности микроорганизмов // Патент РФ № 2476598, С12Q 1/32, С12N 9/02. 2013.
12. Чухчин Д.Г., Разработка нового метода оценки ферментативной окислительной способности активного ила / Д.Г. Чухчин, П.А. Тупин, Е.В. Новожилов, О.М. Соколов // ИВУЗ Лесной журнал. — 2010. — № 3. — С. 119—124.
13. Жмур Н.С. Методическое руководство по гидробиологическому и бактериологическому контролю процесса биологической очистки на сооружениях с аэротенками ПНДФ СБ 14.1.77-96. — М.: АКВАРОС, 2009. — 106 с.
14. Попова Г.И., Чуркина Ю.В. Лабораторный практикум по биохимии — Архангельск: Изд-во АГТУ, 2005. — 68 с.
15. ГОСТ Р 50595-93. Вещества поверхностно-активные. Метод определения биоразлагаемости в водной среде. — М.: Госстандарт РФ, 1995.
16. Чухчин Д.Г., Тупин П.А. Устройство для количественного определения скорости цветных ферментативных реакций // Патент РФ № 117149, С12М. 2012.
17. Чекалов В.П. Определение с помощью метиленового синего сорбционной способности и дегидрогеназной активности донных отложений // Экология моря. — 2006. — № 72. — С. 103 — 106.

D.G. CHUKHCHIN, E.A. VARAKIN, V.A. RUDAKOVA,
Yu.V. CHURKINA, and E.V. NOVOZHILOV*

The Lomonosov Northern (Arctic) Federal University, 163002,
Arkhangelsk Russia

e-mail: biotech@narfu.ru
e.novozhilov@narfu.ru

Analysis of Oxidizing Power in Microorganisms of Sludge Biofilm by Measuring their Dehydrogenase Activity

The general oxidizing capacity of active sludge microorganisms occurring in a bioreactor in the form of attached flora (biofilm) has been determined. We used the method of dehydrogenase activity (DHA) determination based on the application of methylene blue as an indicator. A non-linear character of kinetic curves of a substrate (glucose) biological oxidation was observed; putatively, this is a result of the peculiarities of the accumulation of respiratory mediators in the biomass. The reserves of those mediators of redox reactions was assessed, and the data on the biofilm DHA activity (~ 150 nmole/min/mg of dry biomass) are represented. This value testifies to a high oxidation potential of the active sludge biofilm in bioreactors.

Key words: active sludge, biofilm, biological treatment, dehydrogenase activity, microorganisms.

* Author for correspondence.