

# Пространственное РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АЗОТТРАНСФОРМИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПРОЦЕССЕ БИОФИЛЬТРАЦИИ **СТОЧНЫХ ВОД**

**Представлены результаты идентификации микроорганизмов, участвующих в процессах биотрансформации соединений азота в объеме биофильтрационной системы при биофильтрации коммунально-бытового стока. Качественно и количественно идентифицированы нитрифицирующие, денитрифицирующие и анаммокс-бактерии. Проанализирована корреляция микробного состава микробиоценоза с особенностями потребления субстрата.**

## Введение

**В** настоящее время проблема удаления биогенных элементов из коммунально-бытовых сточных вод остается весьма актуальной. При этом в компактных, модульных системах водоочистки предпочтение отдается биофильтрационным системам благодаря возможности создания в них условий, благоприятных для протекания разнообразных биотрансформаций, в частности, как аэробных, так и анаэробных процессов. Последнее особенно актуально для биотрансформации соединений азота, поскольку для удаления азота ключевым процессом является нитрификация с окислением аммонийного азота в нитриты и нитраты в аэробных условиях с их последующим восстановлением в анаэробных или анаэробных условиях.

Микробиоценоз очистного сооружения является ключевым элементом, определяющим эффективность биологической очистки. Поэтому анализ развития различных групп микроорганизмов в биоценозе очистного сооружения и выявление закономерностей процессов биологического превращения субстрата являются приоритетными направлениями в области исследования процессов очистки сточных вод.

**Т.В. Кирилина\***,  
кандидат технических наук, ассистент кафедры промышленной биотехнологии, ГОУ ВПО Казанский национальный исследовательский технологический университет

**А.С. Сироткин**,  
доктор технических наук, профессор, заведующий кафедрой промышленной биотехнологии, ГОУ ВПО Казанский национальный исследовательский технологический университет

В соответствии с этим цель работы заключалась в выявлении закономерностей распределения микроорганизмов, участвующих в биотрансформации соединений азота, в процессе биофильтрации в объеме биофильтрационной системы и их корреляции с особенностями потребления субстрата.

Метод флуоресцентной *in-situ* гибридизации (FISH), основанный на связывании специфических флуоресцентно окрашенных олигонуклеотидных зондов с комплементарными участками 16S или 23S рРНК биологических объектов, является полезным инструментом для идентификации микроорганизмов в составе микробиоценоза очистных сооружений [1].

## Материалы и методы исследования

**Э**кспериментальные исследования проводились на базе трех последовательно соединенных биофильтров (рис. 1). Биофильтры представляли собой выполненные из органического стекла цилиндрические резервуары высотой 250 мм и внутренним диаметром 90 мм, оснащенные индивидуальными системами аэрации. Нижняя и верхняя части биофильтров оставались свободными от загрузки керамзитом, что обуславливало простоту отбора проб образцов биомассы.

Непрерывный процесс биофильтрации продолжался на протяжении более 120 сут. Гидравлическое время пребывания сточной воды в системе поддерживалось в диапазоне от 6 до 7 ч [2].

Осуществлялась аэрация всех биофильтров. Концентрация растворенного кислорода составляла в среднем 1,0 мг/дм<sup>3</sup>, 3,0 мг/дм<sup>3</sup>

\* Адрес для корреспонденции: tvkirilina@gmail.com

и 3,5 мг/дм<sup>3</sup> на выходе из 1-го, 2-го и 3-го биофильтров, соответственно.

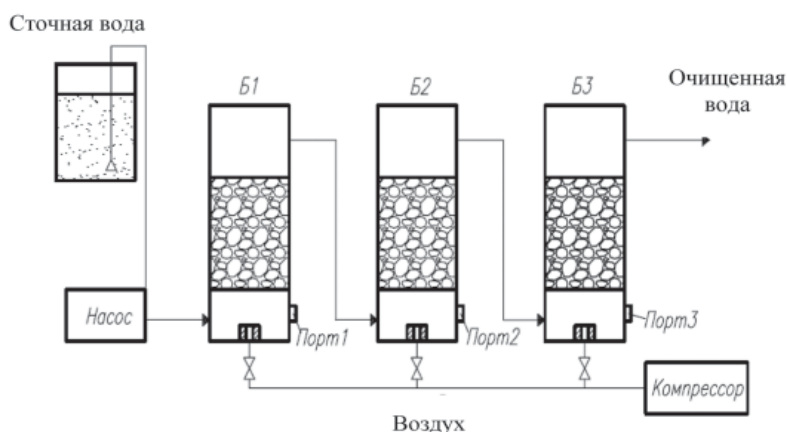
Инокуляция и накопление биомассы на керамзите осуществлялись выдерживанием загрузочного материала в сточной воде городских очистных сооружений в среднем в течение 10 сут. В последующие сутки в биофильтр подавался модельный раствор сточной воды, основные компоненты которого соответствовали характеристике сточной воды (табл. 1) [3].

В процессе непрерывной биофильтрации периодически проводился отбор проб мик-

**М. Денеке,**  
доктор наук,  
руководитель  
научной группы  
водоподготовки  
и водоотведения  
строительного  
отделения факультета  
инженерных наук,  
Университет  
Дуйсбург-Эссен  
(Германия)

робных пленок из биофильтров для последующей идентификации микроорганизмов в их составе. Идентификация микроорганизмов в составе биопленок производилась методом флуоресцентной *in-situ* гибридизации [1]. Для идентификации нитрифицирующих, денитрифицирующих и анаммокс-бактерий использовались генные зонды, указанные в табл. 2 [4].

Для контроля всей совокупности микробных клеток в образцах биопленки использовалось окрашивание раствором 4',6'-диамидино-2-фенилиндолдигидрохлорида (DAPI). Контролируемые показатели потребления субстрата и накопления продуктов метаболизма оценивались по изменению концентрации аммонийного азота, азота нитритов и нитратов. В экспериментах использовались стандартные методы определения вышеуказанных показателей.



**Рис. 1.** Экспериментальная биофильтрационная установка, Б1, Б2, Б3 – биофильтры.

**Таблица 1**

Характеристика сточной воды и ее модельного раствора

Показатель	Сточная вода	Модельный раствор
рН	6,7-7,5	6,7-7,5
ХПК	100-160	100-340
БПК <sub>5</sub> *	65-80	65 до 225
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , мг/дм <sup>3</sup>	18,1-38,5	12,1-40,0
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , мг/дм <sup>3</sup>	не более 1,2	не обнаружено
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , мг/дм <sup>3</sup>	0,3-2,2	не более 2,2
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , мг/дм <sup>3</sup>	5,7-10,2	8,4-13,4

\* БПК<sub>5</sub> = 0,7 БПК<sub>полн</sub>

**Таблица 2**

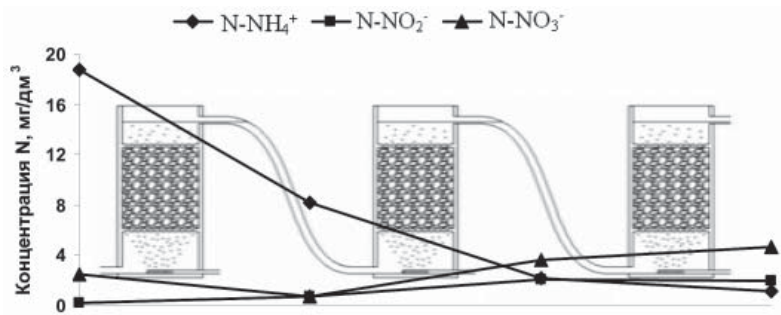
Перечень и характеристика использованных генных зондов

Наименование зонда	Последовательность нуклеотидов 3'-5'	Определяемые микроорганизмы
Nso 1225	CGC CAT TGT ATT ACG TGT GA	все аммонийнокисляющие -протеобактерии
Nso 190	CGA TCC CCT GCT TTT CTC C	
Ntspa 712	CGT CTT CGC CAC CGG CCT TCC	p. Nitrospirae
NIT3	CCT GTG CTC CAT GCT CCG	p. Nitrobacter
Curvi 997	CTC TGG TAA CTT CCG TAC	p. Curvibacter
AZA 645	GCC GTA CTC TAG CCG TGC	p. Azoarcus
Amx 368	CCT TTC GGG CAT TGC GAA	все Anammox-бактерии
Amx 820	AAA ACC CCT CTA CTT AGT GCC C	Brocadia anammoxidans, Kuenenia stuttgartiensis

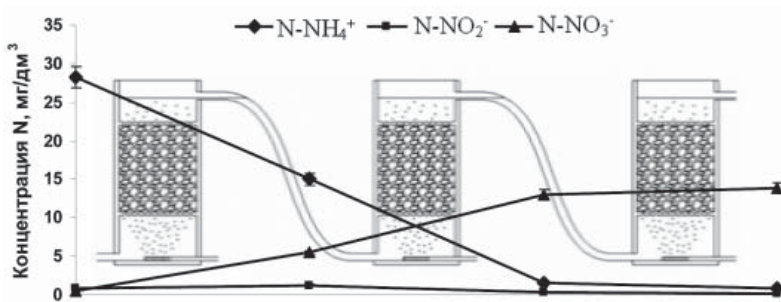
## Результаты и их обсуждение

**В** процессе экспериментальных исследований в составе биопленок системы трех последовательных биофильтров было выявлено наличие аммонийнокисляющих β-протеобактерий, нитритоокисляющих бактерий р. *Nitrospira*, денитрифицирующих бактерий рр. *Curvibacter*, *Azoarcus*, а также анаммокс-бактерий *Brocadia anammoxidans* и *Kuenenia stuttgartiensis*. При этом количество бактерий и форма их существования изменялась и в объеме системы биофильтров и в процессе непрерывной биофильтрации, коррелируя с эффективностью потребления субстрата и накоплением продуктов метаболизма.

На начальном этапе экспериментальных исследований, в период первоначального накопления биомассы в системе была отмечена высокая эффективность удаления аммонийного азота (рис. 2). При этом 58 % от удаляемого количества аммонийного



**Рис. 2.** Кинетика концентрации азота на 12 сут непрерывной биофильтрации.



**Рис. 3.** Кинетика концентрации азота на 118 сут непрерывной биофильтрации.

азота потреблялось гетеротрофным микробиоценозом 1-го биофильтра для клеточного роста, о чем свидетельствовало отсутствие продуктов нитрификации после прохождения этого биофильтра в данный период.

На заключительном этапе 120-ти суточной биофильтрации, по мере адаптации микроорганизмов к условиям, в процессах удаления аммонийного азота в равной степени участвует микробиоценоз 1-го и 2-го биофильтров. При этом если на протяжении всего процесса непрерывной биофильтрации нитриты и нитраты были обнаружены в воде после 2-го и 3-го биофильтров, то накопление азота нитратов в количестве более чем 5 мг/дм<sup>3</sup> уже после прохождения 1-го биофильтра начиная с 118 сут свидетельствует о смещении зон развития нитрифицирующего микробиоценоза на ранние этапы биофильтрации (рис. 3).

*Качественный анализ образцов биопленок биофильтрационной системы*

Нитрифицирующие бактерии

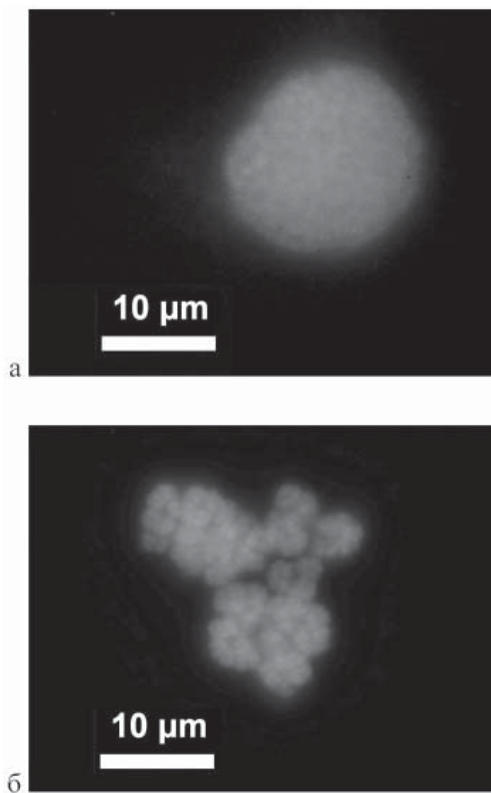
Аммонийокисляющие бактерии (АОБ) представлены, главным образом, сферическими компактными микробными агрегатами бактерий р. *Nitrosomonas* (рис. 4 а), которые, согласно литературным данным, являются доминирующими нитрификаторами, окисляющими аммонийный азот, в системах очистки сточных вод [4].

В составе биопленок на протяжении всего эксперимента не было идентифицировано нитритоокисляющих бактерий (НОБ) р. *Nitrobacter*, что согласуется с информацией о незначительном вкладе бактерий этого рода в процессы очистки коммунально-бытовых стоков [4]. Бактерии р. *Nitrospira* были обнаружены в составе микробных агрегатов сферической и неправильной форм, часть из которых была пронизана узкими «каналами» (рис. 4 б).

Диаметр клеточных агрегатов АОБ, обнаруженных в составе образцов биопленок, культивированных в непрерывном процессе биофильтрации сточных вод, изменялся в диапазоне от 4 мкм до 35 мкм; НОБ – от 4 мкм до 18 мкм (табл. 3).

Обнаружено, что в процессе длительной биофильтрации в 1-м биофильтре количество микробных агрегатов АОБ изменилось от одиночных агрегатов на начальном этапе биофильтрации (12 сут) до их скоплений на последующих этапах, что коррелирует с данными об удалении аммонийного азота, являющегося субстратом для АОБ, и накоплении продуктов их метаболизма – азота нитритов в этот период (рис. 2, 3). При этом наблюдалось увеличение размеров агрегатов в среднем в 3 раза (табл. 3).

Нитритоокисляющие бактерии в составе биопленок этого биофильтра на протяжении



**Рис. 4.** Клеточный агрегат: а – АОБ р. *Nitrosomonas*, зонд Nso 1225 (Cy3, красный); б – НОБ р. *Nitrospira*, зонд Ntspa 712 (Cy3, красный).

всего процесса биофильтрации были обнаружены в составе скоплений микробных агрегатов, размеры которых в процессе биофильтрации увеличились в 2 раза от размеров на начальном этапе (табл. 3).

На протяжении 120-ти суточного процесса непрерывной биофильтрации максимальное количество клеточных агрегатах АОБ и НОБ было идентифицировано в составе биоценоза образцов биопленок 2-го биофильтра, о чем свидетельствует и эффективность удаления аммонийного азота и азота нитритов в этом биофильтре. На протяжении всего эксперимента АОБ были обнаружены в составе скоплений крупных (табл. 3) агрегатов, размеры которых в процессе эксперимента увеличивались в среднем в 2 раза. Размеры микробных агрегатов НОБ уменьшились относительно обнаруженных на начальном этапе в среднем в 2 раза, но их количество увеличилось в десятки раз.

В 3-м биофильтре в течение 40 сут от начала биофильтрации наблюдалось увеличение размеров микробных агрегатов АОБ и НОБ в среднем в 1,5 раза. В последующие сутки были обнаружены лишь отдельные мелкие агрегаты (до 4 мкм) и бактериальные клетки. Данный факт обусловлен ингибированием нитрификаторов 3-го биофильтра продуктами нитрификации, активно протекающим во 2-м биофильтре (рис. 3) и обуславливающим снижение рН сточной воды, поступающей в 3-й биофильтр, до 5,8 при увеличении нагрузки по аммонийному азоту с 20 мг/дм<sup>3</sup> до 30 мг/дм<sup>3</sup> (рис. 2. 3).

В составе образцов биопленок 3-го биофильтра количество нитрификаторов уменьшалось в процессе эксперимента. Так, в начале исследований АОБ и НОБ были представлены скоплениями крупных микробных агрегатов, а на завершающем этапе – отдельными бактериальными клетками и небольшими одиночными агрегатами.

#### Денитрифицирующие бактерии

Согласно экспериментальным результатам, на 12 сут непрерывной биофильтрации в системе трех биофильтров были идентифицированы отдельные бактериальные клетки денитрификаторов р. *Curvibacter*. Начиная с 43 сут биофильтрации в объеме биомассы системы трех биофильтров были обнаружены денитрифицирующие бактерии рр. *Curvibacter*, *Azoarcus*.

Бактерии р. *Curvibacter* представлены как отдельными бактериальными клетками, так и клеточными агрегатами (рис. 5 а). Бактерии р. *Azoarcus* обнаружены, главным образом, в форме отдельных бактериальных клеток (рис. 5 б).

**Таблица 3**

Идентификация нитрифицирующих бактерий в процессе биофильтрации сточной воды

Бактерии	Место отбора образцов биопленки	Форма существования микробных клеток		
		Отдельные клетки	Микробные агрегаты	
			Диаметр, мкм	Скопления/одиночные
12 сут непрерывного процесса биофильтрации сточной воды				
р. <i>Nitrosomonas</i>	1 биофильтр	-	до 5	одиночные
	2 биофильтр	-	до 16	скопления
	3 биофильтр	-	до 12	скопления
р. <i>Nitrospira</i>	1 биофильтр	-	до 8	скопления
	2 биофильтр	-	до 18	скопления
	3 биофильтр	-	до 11	скопления
43 сут непрерывного процесса биофильтрации сточной воды				
р. <i>Nitrosomonas</i>	1 биофильтр	-	до 4	скопления
	2 биофильтр	-	до 18	скопления
	3 биофильтр	-	до 20	одиночные
р. <i>Nitrospira</i>	1 биофильтр	-	до 14	скопления
	2 биофильтр	-	до 10	одиночные
	3 биофильтр	+	-	-
84 сут непрерывного процесса биофильтрации сточной воды				
р. <i>Nitrosomonas</i>	1 биофильтр	-	до 10	скопления
	2 биофильтр	-	до 30	скопления
	3 биофильтр	+	до 4	-
р. <i>Nitrospira</i>	1 биофильтр	-	до 4	скопления
	2 биофильтр	-	до 10	скопления
	3 биофильтр	-	до 9	скопления
118 сут непрерывного процесса биофильтрации сточной воды				
р. <i>Nitrosomonas</i>	1 биофильтр	-	до 15	скопления
	2 биофильтр	-	до 35	скопления
	3 биофильтр	+	до 4	одиночные
р. <i>Nitrospira</i>	1 биофильтр	-	до 17	скопления
	2 биофильтр	-	до 12	скопления
	3 биофильтр	+	до 4	-

### Анаммокс-бактерии

Отдельные бактериальные клетки *Brocadia anammoxidans* и *Kuenenia stuttgartiensis* были обнаружены в составе биоценоза биопленок всех трех биофильтров экспериментальной системы. Бактериальные клетки имеют характерную для анаммокс-бактерий «бубликообразную» форму (рис. 6). На завершающем этапе экспериментальных исследований, в частности, начиная с 84 сут биофильтрации в биоценозе образцов биопленок 3-го биофильтра не было идентифицировано анаммокс-бактерий.

### Количественный анализ образцов биопленок биофильтрационной системы

Результаты подсчета всей совокупности бактериальных клеток в составе биоценоза образцов биопленок, иммобилизованных на поверхности керамзита, биофильтрационной системы на 70 сут непрерывного эксперимента представлены на рис. 7.

Результаты определения количественного состава азоттрансформирующих микроорганизмов по результатам FISH-анализа, представлены на рис. 8.

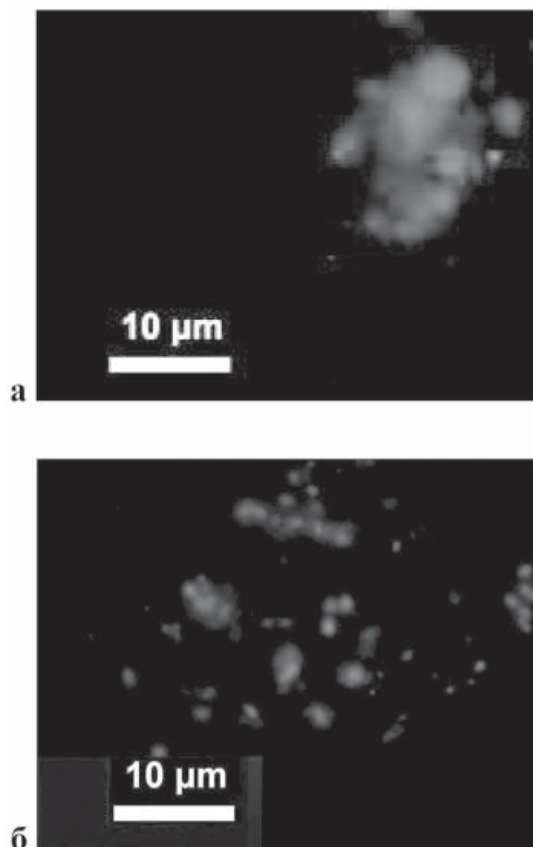


Рис. 5. Денитрифицирующие бактерии в составе образцов биопленок 2-го биофильтра на 43 сут непрерывной биофильтрации: а – р. *Curvibacter*, зонд Curvi 997 (СуЗ, красный); б – р. *Azoarcus*, зонд AZA 645 (СуЗ, красный).

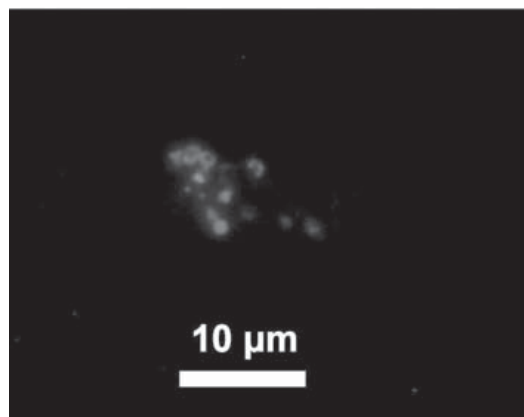


Рис. 6. Анаммокс-бактерии в составе образцов биопленок 2-го биофильтра на 84 сут непрерывной биофильтрации, зонд Amx 820 (СуЗ, красный).

Результаты количественной идентификации свидетельствуют о том, что численность нитрифицирующих бактерий (рис. 8) на порядок ниже, чем гетеротрофных бактерий (рис. 7), а количество НОБ в системе превосходит количество АОБ в среднем в 4,5 раза (рис. 8). Полученные данные наглядно подтверждают известный факт лимитирования процесса нитрификации 1-й стадией с окислением аммонийного азота в азот нитритов за счет меньшей чувствительности нитритоокисляющих бактерий к токсикантам и более высокой скорости роста [5]. При этом наибольшее количество АОБ и НОБ обнаружено во

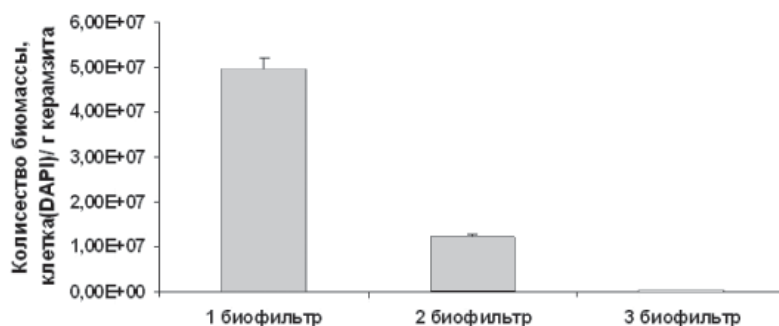


Рис. 7. Количество микробных клеток в составе образцов биопленок системы трех биофильтров.

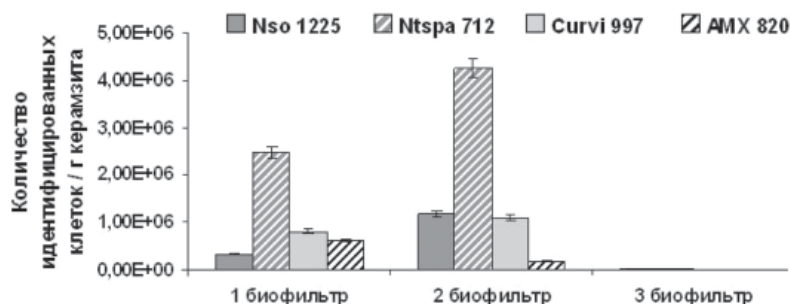


Рис. 8. Количество клеток нитрифицирующих, денитрифицирующих и анаммокс-бактерий в составе образцов биопленок системы трех биофильтров.

2-м биофилт্রে, что согласуется с результатами удаления аммонийного азота и накопления азота нитратов в этот период.

Количество денитрифицирующих бактерий было практически одинаково в 1-м и 2-м биофилтрах, что связано с наличием анаэробных микрозон в объеме биопленок этих реакторов, доступности органических веществ и нитратов. В целом, количество денитрификаторов рр. *Curvibacter*, *Azoarcus* в системе уступает количеству нитрификаторов рр. *Nitrosomonas*, *Nitrospira* в 2 раза.

Наибольшее количество анаммокс-бактерий обнаружено в составе образцов биопленок 1-го биофилтра, что связано с присутствием, главным образом, в этом реакторе, в объеме развитой гетеротрофной биопленки анаэробных микрозон, необходимых для существования этих бактерий. При этом в системе в целом анаммокс-бактерий в 4,2 раза меньше, чем денитрификаторов.

Незначительное количество бактериальных клеток характеризует 3-й биофилтр. При этом количество в нём АОБ, НОБ, денитрифицирующих и анаммокс-бактерий оценочно составляло 6 %, 15 %, 5 % и 1 %, соответственно, от общего количества клеток (рис. 7).

## Заключение

Таким образом, проанализировано пространственное распределение авто- и гетеротрофных азототрансформирующих микроорганизмов в объеме биофилтрационной системы в процессе биофилтрации. В условиях аэрируемой биофилтрации наряду с нитрифицирующими бактериями качественно и количественно идентифицированы анаэробные микроорганизмы – денитрифицирующие и анаммокс-бактерии, участвующие

## Ключевые слова:

биофилтрация, соединения азота, азототрансформирующие

щие в процессах комплексной биотрансформации соединений азота.

*Работа выполнена при поддержке аналитической ведомственной целевой программы Министерства образования и науки Российской Федерации «Развитие научного потенциала высшей школы (2009-2011 гг.)» и научно-исследовательской стипендии Германской службы академических обменов (DAAD) (2010-2011 гг.).*

## Литература

1. Pernthaler J. Fluorescence in situ hybridization. Method in microbiology: marine microbiology / J. Pernthaler, F.O. Glöckner, W. Schönhuber, R. Amann. London, 2002. 127 p.
2. Кирилина Т.В. Биофилтрация сточных вод для комплексного удаления органических веществ и аммонийного азота / Т.В. Кирилина, А.С. Сироткин, Г.И. Шагинурова, Л.И. Сейтгапова // Экология и промышленность России. 2010. № 9. С. 14-17.
3. Кирилина Т.В. Оценка условий процесса биофилтрации сточных вод для глубокого удаления соединений азота и фосфора / Т.В. Кирилина, А.С. Сироткин, Л.И. Сейтгапова, Т.Х. Чан, Н.Х.К. Он // Вода: химия и экология. 2011. № 1. С. 24-28.
4. Nielsen P.H. FISH Handbook for Biological Wastewater Treatment. Identification and quantification of microorganisms in activated sludge and biofilms by FISH / P.H. Nielsen, H. Daims, H. Lemmer. London: IWA Publishing, 2009. 123 p.
5. Жмур Н.С. Технологические и биохимические процессы очистки сточных вод на сооружениях с аэротенками. М.: Акварос, 2003. 512 с.

T.V. Kirilina, A.S. Sirotkin, M. Deneke

## NITROGEN TRANSFORMING MICROORGANISMS IN WATER BIOFILTRATION

Data on microorganism identification in the process of nitrogen biotransformation in bulk of biofiltration in household stream flow have been presented in the article. Nitrifying, denitrifying, and anammox-

bacteria have been qualitatively and quantitatively identified. The correlation between the microbial composition of the microbiota with the consumption patterns of the substrate has been analyzed.

**Key words:** biofiltration, nitrogen compounds, nitrogen transforming microorganisms, fluorescence in-situ, hybridization