

Аэробная **БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЧИСТКА** СТОЧНЫХ ВОД в УСЛОВИЯХ ГРАНУЛООБРАЗОВАНИЯ АКТИВНОГО ИЛА

II. ГРАНУЛООБРАЗОВАНИЕ АКТИВНОГО ИЛА в УСЛОВИЯХ КОНТРОЛИРУЕМОГО ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА

Стабильность характеристик активного ила при изменении параметров стока и воздействии факторов окружения во многом влияет на поддержание и повышение эффективности существующих аэробных установок биологической очистки сточных вод. Устойчивые сообщества, наблюдаемые в биопленках и анаэробных гранулах активного ила, представляют собой примеры систем с относительно стабильными морфологией и биоценотической структурой. Гранулированный аэробный ил, полученный нами в условиях оксидативного стресса, – другой пример устойчивого биоценоза, который может использоваться для повышения эффективности систем биологической очистки. Показано, что такой ил обладает высокой очищающей способностью, повышенной стабильностью его характеристик в условиях воздействия неблагоприятных факторов окружения. Рассмотрены условия формирования и вклад стрессорных воздействий в процессы образования устойчивых гранул.

Введение

Образование гранулированного активного ила (АИ) в некоторых режимах биологической очистки сточных вод, в частности, в отъемно-доливном режиме в соответствующем реакторе (Sequencing Batch Reactor, SBR) [1, 2], представляет интерес для дальнейшего совершенствования систем биологической очистки, для уменьшения вспухаемости и пенообразования ила, улучшения его седиментационных свойств во вторичном отстойнике, повыше-

Н.С. Хохлачев,
аспирант, ФГБОУ
ВПО Российский
химико-техно-
логический уни-
верситет им. Д.И.
Менделеева

ния концентрации ила в очистном сооружении, снижения адгезионной способности к мембранам при очистке в мембранных биореакторах [3–5]. Ранее нами было изучено гранулообразование ила в условиях аэрации среды и использования отъемно-доливного режима очистки, аналогичного в SB-реакторах, и было показано, что внесение пероксида водорода в среду с гранулообразующим илом, предварительно пассированным к H_2O_2 , приводило к существенному повышению скорости гранулообразования и устойчивости новообразованных гранул [6]. Такой прием с внесением пероксида водорода был применен в связи с тем, что, как нами было установлено, внесение H_2O_2 в ферментационную среду или в сточную воду в определенных условиях может улучшить показатели ферментации и процесса биологической очистки [7, 8]. Учитывая, что в распаде гранул аэробного ила важную роль может играть дефицит кислорода во внутренних зонах гранул, можно также предположить, что внесенный H_2O_2 , более эффективно проникая внутрь гранул и распадаясь там с выделением кислорода, тем самым способствует стабилизации гранул аэробного ила.

Пероксид водорода относят к источникам активных форм кислорода, сублетальные концентрации которых, действуя на живые клетки и организмы, вызывают состояние оксидативного стресса [9].

Обитая в сооружениях биологической очистки, микроорганизмы АИ постоянно подвергаются тем или иным видам стрессовых воздействий. В то же время факторам регуляции состояния сообществ, в основе которых лежат стрессовые воздействия, зачастую не уделяют должного внимания в работах, посвященных исследованию сооб-

*Адрес для корреспонденции: ae-kuz@yandex.ru

ществ микроорганизмов, в частности, применительно к очистке сточных вод.

Среди разнообразия стрессовых ситуаций, в которых может оказаться сообщество микроорганизмов, выделяют голодание, изменение газового состава среды, условий освещения и температуры, механическое повреждение, осмотический и рН-шок, УФ-излучение, ионизирующую радиацию, действие различных окислителей (окислительный или оксидативный стресс), токсичных веществ. Окислительный стресс рассматривается как одно из наиболее распространенных физиологических состояний клетки при повреждении клеточных структур, в частности, активными формами кислорода, которые могут играть важную роль в качестве вторичных мессенджеров в функционировании клеток отдельных микроорганизмов, микробных сообществ, процессах трансформации загрязнений различного происхождения [9].

Кроме отрицательного действия различных факторов стресса возможным является и положительное действие таких факторов при определенных условиях [7, 10–12]. В частности, положительное действие оксидативного стресса, индуцированного внесением H_2O_2 , наблюдалось при добавлении в среду субкритических концентраций пероксида водорода [7, 8, 11].

В типичных условиях стрессовые воздействия выводят сообщество микроорганизмов АИ из динамического равновесия, меняют микробиологический состав и физиологическое состояние микроорганизмов, что приводит к снижению качества очищенной воды. Так, применительно к гранулообразованию АИ была показана важность механического стресса. В ряде работ, где определялось влияние гидродинамического фактора на образование гранул АИ, значение этого фактора, как стресс-фактора, доходило до 50 % [10, 13, 14]. Весьма вероятно, что большое влияние на образование гранул оказывает направление потока жидкости в реакторе и его скорость [15, 16]. С учетом данного фактора для получения аэробных гранул АИ в работе [17] было предложено изменить гидродинамический режим с дополнением конструкции очистного биореактора выносным насосом для организации вертикального перемешивания. Однако такое вертикальное перемешивание, впрочем, как и любой другой фактор, увеличивающий критерий Рейнольдса, также ведет к увеличению механического стресса. Учитывая, что физиологический от-

С.В. Калёнов, кандидат технических наук, доцент кафедры биотехнологии, ФГБОУ ВПО Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева

О.С. Занина, студентка, ФГБОУ ВПО Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева

А.Е. Кузнецов*, кандидат технических наук, доцент, заместитель заведующего кафедрой биотехнологии, ФГБОУ ВПО Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева

вет микробных клеток на стрессовые воздействия во многих случаях перекрестный, т.е. микроорганизмы, приобретая устойчивость к одним стресс-факторам, становятся устойчивыми к другим [9], можно предполагать, что обнаруженное нами положительное воздействие пероксида водорода на гранулообразование может быть обусловлено и повышением устойчивости гранул к механическому стрессу.

Таким образом, контроль неблагоприятных факторов, избирательное усиление или подавление действия их на сообщества микроорганизмов может служить средством управления сообществом и совокупными свойствами АИ, что может привести к улучшению показателей очистки.

Данные о положительном воздействии пероксида водорода на гранулообразование, полученные нами ранее [6], послужили основой для проведения более детальных исследований биологической очистки с аэробным гранулированным илом в условиях оксидативного стресса, что и являлось целью настоящей работы.

Материалы и методы исследования

Исходный активный ил

Использовались:

1) АИ №1, отобранный из очистных сооружений Вороновского завода по получению солода (**ВЗПС**, пос. Вороново, Московская обл.); активность ила постоянно поддерживалась путем пересевов на стоки ВЗПС или модельный сток и аэрирования ила со стоком в колбах на качалке;

2) ил №2, полученный смешением образцов ила, отобранных из городской канализационной системы, эвтрофицированного и неэвтрофицированного прудов, речного ила, АИ аэротенка городских очистных сооружений; активность ила постоянно поддерживалась путем пересевов на модельный сток и аэрирования ила со стоком в колбах на качалке.

Модельные стоки

Использовались:

1) модельный сток пивоварения (сток №1), приготовленный разбавлением пива «Балтика 0», ХПК 1000 мг/л.

2) модельный хозяйственно-бытовой сток (сток №2), полученный смешением отвара водных вытяжек из отмеренных количеств продуктов питания с ХПК 400 ± 50 мг O_2 /л, PO_4^{3-} 5 ± 1 мг/л, $N_{общ}$ 25 ± 3 мг/л.

Методика пересева образцов активного ила

Формирование гранул аэробного ила и культивирование АИ изучалось в периодических условиях с циклическим режимом очистки, как это было описано нами ранее [6].

Аэробный ил культивировали при аэрации на шейкере при 180–200 об/мин в конических колбах объемом 250 мл при рабочем объеме иловой взвеси 100 мл при температуре 20–25 °С, рН 6,8–8,5. Объем исходного посевного материала, представляющего отстоявшийся осадок хлопьев ила, составлял 30 мл. Для поддержания активности ила пересевы проводились, как правило, 1 раз в 4–7 сут. В ходе пересева содержащую ил среду переносили в мерный цилиндр, отстаивали в течение 5–10 мин., затем сливали 60–70 мл надосадочной жидкости. Осевший ил заливали новой порцией сточной воды до объема 100 мл, переносили обратно в коническую колбу и ставили на шейкер.

В ходе периодического процесса культивирования определяли рН, оптическую плотность, концентрацию ХПК бихроматным методом [18], фосфатов по стандартной методике [21], оценивали морфологию хлопьев и новообразующихся микробных гранул по микроскопической картине АИ.

Для изучения влияния H_2O_2 на очистку и гранулообразование путем последовательных пересевов (пассирования) вели контрольные линии АИ — без добавления H_2O_2 , и с добавлением H_2O_2 . В последнем случае через определенное количество пересевов получали АИ, более устойчивый к внесению пероксида по сравнению с контрольным, непассированным илом. Пероксид водорода вносили в среду по ходу процесса в виде 10 % H_2O_2 (в момент пересева ила или через 1–4 ч после пересева). Каждая линия поддерживалась в двух повторностях. Температура, аэрация, объем среды и колб, условия освещения во всех линиях были одинаковы. Другие компоненты вносили в зависимости от целей эксперимента. Проба с илом для измерений отбиралась до внесения H_2O_2 .

Учет фактора освещения среды видимым светом

Популяции микроорганизмов, в норме нечувствительные к видимому свету, в условиях оксидативного стресса приобретают чувствительность даже к фоновому лабораторному освещению видимым светом, что, в частности, наблюдалось в наших экспериментах с дрожжевыми культурами [7].

Появление такой чувствительности, по видимому, может быть объяснено фоторепарацией с активированием ферментов фототиаза, участвующих в ответе клеток на действие мягкого ультрафиолета [19, 20]. Как было показано нами ранее, освещение среды культивирования наряду с пассивированием популяции микроорганизмов при действии стрессора (пероксида водорода) является одним из ключевых факторов улучшения показателей ферментации и процесса биологической очистки в этих условиях [7, 8]. Поэтому исследования проводились с учетом фактора освещения содержимого колб фоновым светом лабораторного помещения. При проведении исследований помещение лаборатории большую часть суток освещалось, источниками освещения служило естественное боковое оконное освещение, а также искусственный свет люминесцентных ламп. Освещенность на поверхности стола, на котором стояли шейкеры с колбами, составляла в среднем 500 лк, что соответствует удельной величине энергии падающего света не более 100 мВт/л. Колбы, которые необходимо было защитить от света, тщательно заворачивали в фольгу, остальные колбы оставляли на шейкере при дневном либо искусственном освещении. Каждый вариант опыта проводился в 3–5 повторностях с освещением и без освещения содержимого колб. По результатам измерений сравнивали скорость снижения уровня остаточного ХПК при внесении H_2O_2 в сточную воду с гранулированным илом на фоне воздействия и без воздействия света.

Оборудование

Для аэрации использовались шейкеры Ш8 с термостатом Т8 (НПФ «Флоби», г. Москва), Heidolph Unimax 2010. В шейкере Ш8 перемешивание среды осуществляется за счет сложного орбитального движения платформы с колбами в горизонтальной и вертикальной плоскости. В шейкере Heidolph Unimax 2010 перемешивание среды осуществляется за счет орбитального движения платформы только в горизонтальной плоскости.

Значения рН измерялись рН-метром SevenCompact рН/Ion S220, Mettler Toledo. Морфология АИ изучалась с помощью оптического микроскопа Микромед-2 (вариант 2-20), 100x10 иммерсионный объектив. Уровень освещенности среды (колб) измерялся люксметром/УФ-радиометром ТКА-01/3.

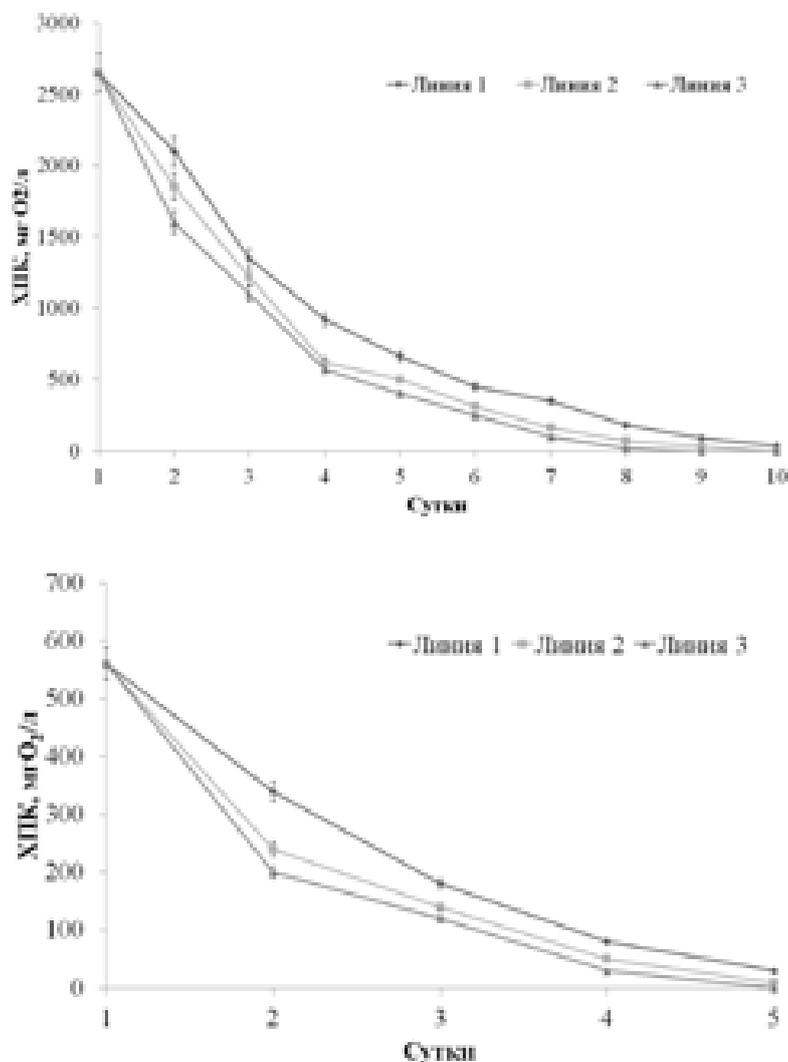


Рис. 1. Изменение величины ХПК в зависимости от продолжительности биоокисления (сут) и линии аэробного ила при разовом внесении H_2O_2 и освещении содержимого колб. А — $XPK_{исх.} = 2650$ мг $O_2/л$. Б — $XPK_{исх.} = 560$ мг $O_2/л$.

Результаты и их обсуждение

Биологическая очистка модельного стока пивоварения

Первоначально исследования вели с модельным стоком на основе пива «Балтика 0» (сток №1) с АИ №1, исходно взятым из очистных сооружений ВЗПС.

Путем последовательных пересевов поддерживались 3 линии аэробного ила.

Линия 1: контрольный, непассированный к H_2O_2 аэробный ил вносился в колбу с модельным стоком без внесения пероксида водорода.

Линия 2: аэробный ил, пассированный (адаптированный) к H_2O_2 ; H_2O_2 вносился

только в момент пересева в количестве 25 мг/л.

Линия 3: аэробный ил, пассированный к H_2O_2 ; H_2O_2 вносился только в момент пересева в количестве 50 мг/л.

Все 3 линии велись в условиях освещения фоновым светом лаборатории на одном и том же модельном стоке, получаемом путем разбавления безалкогольного пива «Балтика 0» от 100 до 50 раз по мере пассирования и с учетом плана экспериментов.

В ходе проведения экспериментов для всех трех линий АИ, которые использовались для изучения эффекта внесения H_2O_2 , наблюдалось образование гранул АИ. Гранулы образовывались и постепенно увеличивались в размере по мере очистки стока.

Результаты экспериментов с освещением содержимого колб фоновым светом представлены на рис. 1.

Как видно из этих данных, в вариантах с линиями 2 и 3 при $XPK_{исх.} = 2650$ мг/л на 9–10 сут с момента внесения ила остаточное ХПК стремится к нулю. Такой результат наблюдался во всех повторностях. Наиболее резкое снижение ХПК относительно контрольного варианта (без внесения H_2O_2) наблюдалось на вторые сутки. Аналогично, при $XPK_{исх.} = 560$ мг/л снижение ХПК в вариантах с линиями 2 и 3 превышало снижение в контрольной линии без внесения H_2O_2 , при этом в вариантах с внесением пероксида водорода ХПК падало до непроверяемых величин на 5 сут во всех повторно проведенных опытах. В контроле без внесения H_2O_2 ХПК не достигало уровня ниже 30 мг/л.

Интересно было выяснить, как влияет режим внесения пероксида на биологическую очистку. Многократное внесение определенного количества H_2O_2 в очищаемую среду по ходу очистки может быть более предпочтительно, чем разовое внесение такого же количества пероксида, поскольку во втором случае разовая более высокая доза H_2O_2 может оказывать более сильное стрессовое воздействие на микроорганизмы АИ и, кроме того, пероксид водорода после внесения разлагается с повышенной скоростью, обусловленной активностью каталазы микроорганизмов ила. В опытах, результаты которых представлены на рис. 2, пероксид добавлялся равными частями каждый день, но в суммарной дозе, эквивалентной однократному внесению.

Видно, что в вариантах с внесением H_2O_2 падение ХПК существеннее, особенно в первые сутки. За 5–6 сут ХПК снизилось до величин, близких к нулю (линии 2 и 3).

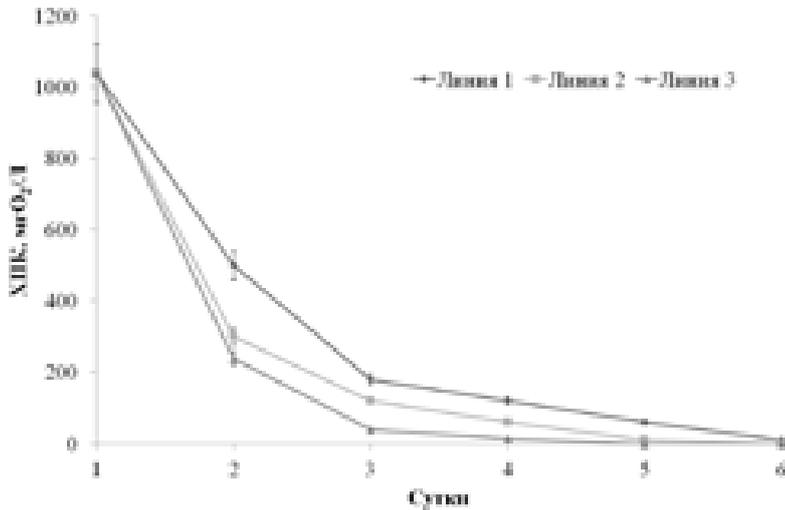


Рис. 2. Изменение величины ХПК в зависимости от продолжительности биоокисления (сут) и линии аэробного ила при дробном внесении H_2O_2 и освещении содержимого колб. $XPK_{исх.} = 1040 \text{ мг } O_2/\text{л}$.

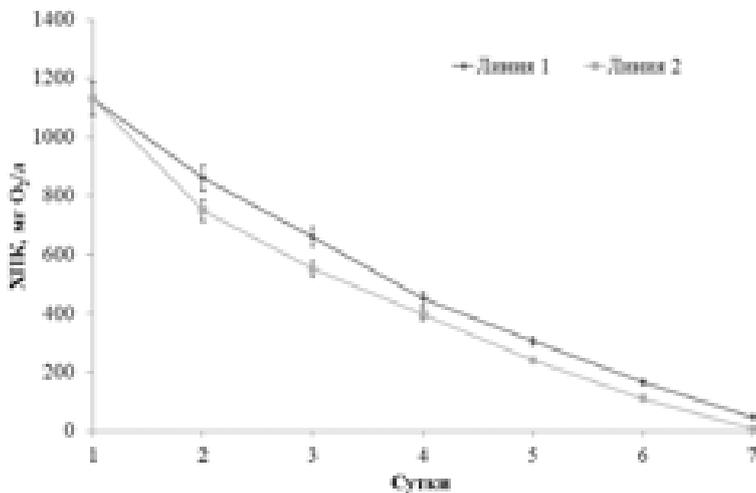


Рис. 3. Изменение величины ХПК в зависимости от продолжительности биоокисления и линии аэробного ила при разовом внесении H_2O_2 при освещении и без освещения содержимого колб. $XPK_{исх.} = 1130 \text{ мг } O_2/\text{л}$. Линия 1 – без освещения среды. Линия 2 – при освещении среды.

Повышение дозы вносимого H_2O_2 обуславливает более значительное снижение ХПК. При этом разница в снижении ХПК не обусловлена непосредственным химическим окислением загрязнений пероксидом водорода, поскольку его вносимые количества (25 мг/л и 50 мг/л) существенно ниже величины разницы в ХПК. Проведенный опыт показал, что внесение пероксида по частям эффективнее, чем однократное внесение в момент посева. Так, в линии 2 при разовом внесении H_2O_2 ХПК за 4 сут снижается с 560

до 50 мг/л (рис. 1, вариант Б), а при дробном внесении за то же время с 1040 до 60 мг/л (рис. 2); в линии 3 ХПК за 4 сут падает при разовом внесении H_2O_2 с 560 мг/л до 30 мг/л (рис. 1), а при дробном – с 1040 до 15 (рис. 2). Таким образом, экспериментально показано, что при дробном внесении гранулы аэробного ила испытывают меньшее стрессовое воздействие, быстрее адаптируются к внесению H_2O_2 и лучше потребляют органический субстрат.

Вышеописанные опыты проводились, как уже отмечалось, в условиях освещения лаборатории. Поэтому следующим этапом исследований было выяснение значимости фактора освещения очищаемой среды с аэробным илом при внесении H_2O_2 .

Путем последовательных пересевов подерживались 4 линии ила.

Линия 1: аэробный ил пассированный, H_2O_2 вносился только в момент посева в количестве 25 мг/л. Колба затемнена.

Линия 2: аэробный ил пассированный, H_2O_2 вносился только в момент посева в количестве 25 мг/л. Колба освещалась видимым светом.

Линия 3: аэробный ил пассированный, H_2O_2 вносился равными частями каждый день в дозе 5 мг/л. Колба освещалась видимым светом.

Линия 4: аэробный ил пассированный, H_2O_2 вносился равными частями каждый день в дозе 5 мг/л. Колба затемнена.

Из рис. 3 и 4 видно, что в освещаемых колбах, (линии 2 и 4) как при разовом, так и при дробном внесении пероксида водорода снижение ХПК было гораздо более интенсивное. В линии 4 в пяти повторно проведенных опытах на 7 сут ХПК уменьшалось до непроверяемых величин.

Таким образом, результаты экспериментов показали, что H_2O_2 лучше вносить дробно и обязательно при освещении очищаемой среды. В этом случае очистка сточных вод гранулообразующим аэробным илом наиболее эффективна и существенно превышает показатели очистки без внесения пероксида водорода.

Параллельно в ходе проведения представленной серии экспериментов фиксировались развитие и изменение числа гранул аэробного ила при освещении и без освещения среды в вариантах с внесением H_2O_2 в количестве 25 мг/л. Результаты этих измерений приведены на рис. 5. Видно, что пероксид водорода в использованных концентрациях не угнетает развитие аэробного ила. Напротив, наблю-

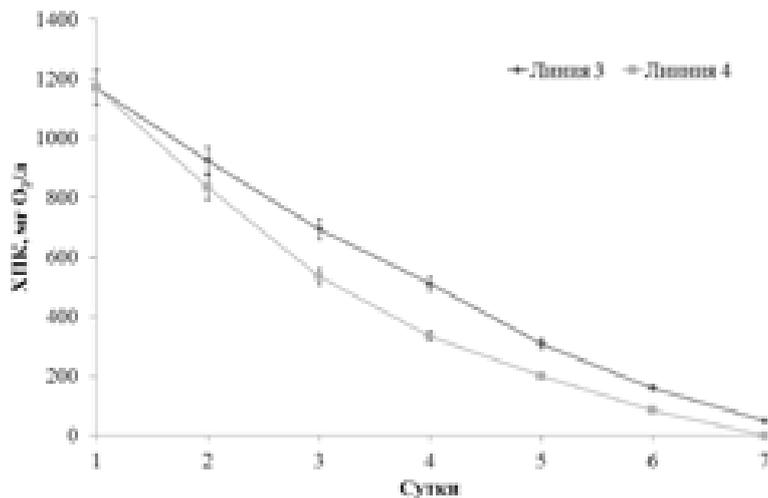


Рис. 4. Изменение величины ХПК в зависимости от продолжительности биоокисления и линии аэробного ила при дробном внесении H_2O_2 равными долями каждые сутки при освещении и без освещения содержимого колб. $XPK_{исх.} = 1170 \text{ мг } O_2/\text{л}$. Линия 4 — при освещении среды. Линия 3 — без освещения среды

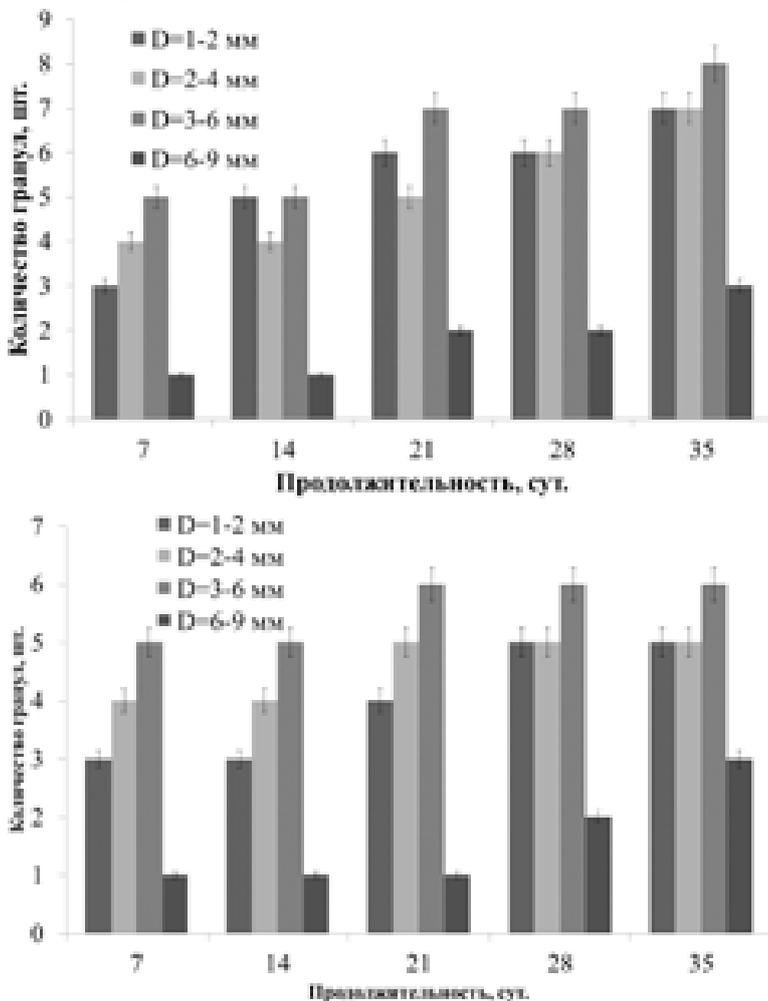


Рис. 5. Изменение размера и числа гранул аэробного ила по ходу пересевов в условиях освещения и при затемнении колб и внесении пероксида водорода. А — при освещении, Б — в условиях затемнения.

дается заметное превышение скорости накопления и размера гранул ила при освещении. Таким образом, фактор освещения существенен при воздействии H_2O_2 на гранулообразование. В условиях освещения гранулы отличались хорошо развитой поверхностью. При затемнении их накопление замедлялось и характеристики поверхности изменялись.

Также важен фактор пассирования ила к H_2O_2 . Ил, пассированный к пероксиду водорода, формирует большее количество гранул (рис. 6), чем непассированный.

Биологическая очистка модельного хозяйственно-бытового стока

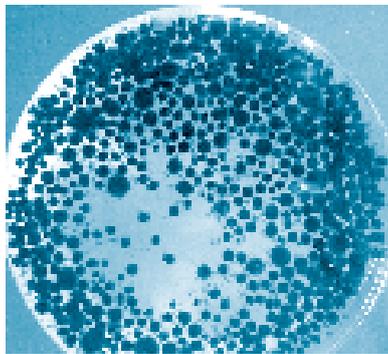
С модельным хозяйственно-бытовым стоком были проведены эксперименты, аналогичные описанным в предыдущем разделе.

На первом этапе исследования подбирали физиологически значимые дозы пероксида водорода, вносимого в очищаемую среду с АИ и не вызывающие необратимых изменений в его состоянии.

Чувствительность микроорганизмов к стрессовому воздействию зависит от их физиологического состояния, поэтому изначально анализировалась чувствительность АИ к пероксиду водорода в разные фазы развития ила и при различном исходном ХПК. Начальное содержание ила в среде в этих опытах составляло 2–4 г/л. Пероксид водорода вносился в среду с илом сразу после пересева, в середине цикла, когда ХПК составляло 40–50 % от начальной концентрации и в предстационарной фазе, когда ХПК составляло 10–15 % от исходного. Продолжительность одного цикла культивирования составляла 96 ч.

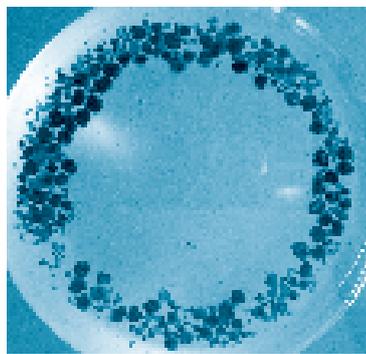
Путем последовательных пересевов первоначально поддерживались линии ила с добавлением H_2O_2 (линии C_1-C_6, T_1-T_6) и без добавления H_2O_2 (линии C_7, T_7) на фоне освещения содержимого колб с илом (линии C_1-C_7) и с затемнением колб (линии T_1-T_7) (табл. 1).

Ведение линий АИ показало, что в условиях экспериментов, описанных выше, доза H_2O_2 около 0,6 г/л для ила является критической, при которой наблюдается его угнетение на всех фазах его развития (рис. 7, 8). В то же время для вариантов ведения ила на свету при дозе H_2O_2 0,3 г/л, внесенной в середине фазы роста (вариант C_3), отличия от контрольного варианта (без внесения H_2O_2) являлись незначительными. При такой дозе биоценоз АИ в той или иной степени приобретал устойчивость к стрессору (табл. 2), о чем свидетельствовала стабилизация приро-



А

Гранулы ила, образованные при очистке в колбе с внесением H_2O_2



Б

Гранулы ила, образованные при очистке в колбе без внесения H_2O_2

Рис. 6. Формирование гранул ила, пассированного к H_2O_2 (А) и ила, не подвергавшегося воздействию H_2O_2 (Б) в условиях отъемно-доливного режима очистки и освещения содержимого колб.

Таблица 1

Линии АИ, использованные в экспериментах с модельным хозяйственно-бытовым стоком

Обозначение	Описание	Обозначение	Описание
C_1	Внесение H_2O_2 в количестве 0,6 г/л при пересеве	T_1	Внесение H_2O_2 в количестве 0,6 г/л при пересеве
C_2	Внесение H_2O_2 в количестве 0,6 г/л на 72 час после пересева	T_2	Внесение H_2O_2 в количестве 0,6 г/л на 72 час после пересева
C_3	Внесение H_2O_2 в количестве 0,3 г/л на 48 час и в количестве 0,6 г/л на 72 час после пересева	T_3	Внесение H_2O_2 в количестве 0,3 г/л на 48 час и в количестве 0,6 г/л на 72 час после пересева
C_4	Внесение H_2O_2 в количестве 0,6 г/л на 96 час после пересева	T_4	Внесение H_2O_2 в количестве 0,6 г/л на 96 час после пересева
C_5	Внесение H_2O_2 в количестве 1,2 г/л при пересеве	T_5	Внесение H_2O_2 при пересеве 1,2 г/л
C_6	Внесение H_2O_2 в количестве 1,2 г/л на 96 час после пересева	T_6	Внесение H_2O_2 в количестве 1,2 г/л на 96 час после пересева
C_7	Контроль без внесения H_2O_2	T_7	Контроль без внесения H_2O_2

Таблица 2

Чувствительность АИ к H_2O_2

ХПК _{исх.} , мг/л	0,3 г/л H_2O_2			0,6 г/л H_2O_2			1,0 г/л H_2O_2		
	Состояние АИ после внесения H_2O_2			Состояние АИ после внесения H_2O_2			Состояние АИ после внесения H_2O_2		
	Начало цикла	Середина цикла	Конец цикла	Начало цикла	Середина цикла	Конец цикла	Начало цикла	Середина цикла	Конец цикла
400	+/-	-	-	+	+/-	+/-	+	+	+/-
1200	+/-	-	-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+/-

+ гибель подавляющей части популяции АИ, летальные дозы H_2O_2 ;

- нет отличий от контроля (без H_2O_2);

+/- промежуточные варианты, сублетальные дозы H_2O_2 .

ста ила после некоторого снижения его концентрации (рис. 7, 8).

В условиях полной темноты (линии $T_1 - T_6$) во всех вариантах АИ с внесением пероксида водорода показывал нестабильные характеристики в пассажах и зачастую лизировал, однако достаточно было рассеянного дневного освещения (около 40 мВт/л) в некоторых линиях ($C_3 - C_5$), чтобы характеристики АИ стабилизировались (рис. 7, 8). Таким образом, как и в опытах с модельным стоком пивоварения значимым фактором при пересевах с внесением H_2O_2 являлось освещение среды.

Дробное внесение пероксида водорода в пассажах в подобранных концентрациях улучшало адаптационные характеристики биоценоза (линия C_3) по сравнению с разовым внесением пероксида (C_4, C_5).

В этой серии экспериментов с модельным хозяйственно-бытовым стоком на протяжении 10 пассажей не удалось сформировать устойчивые гранулы аэробного АИ: свойства ила изменялись незначительно, изредка формировались микробные агломераты — фло-

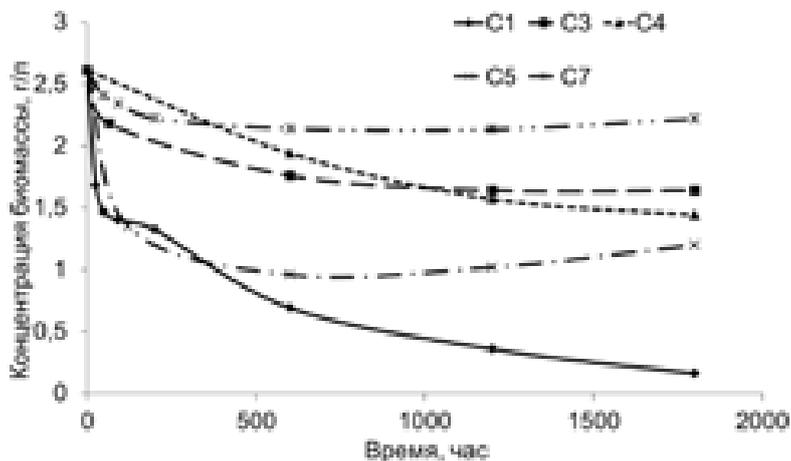


Рис. 7. Изменение концентрации АИ линий C_1 – C_7 при пересевах в условиях освещения среды.

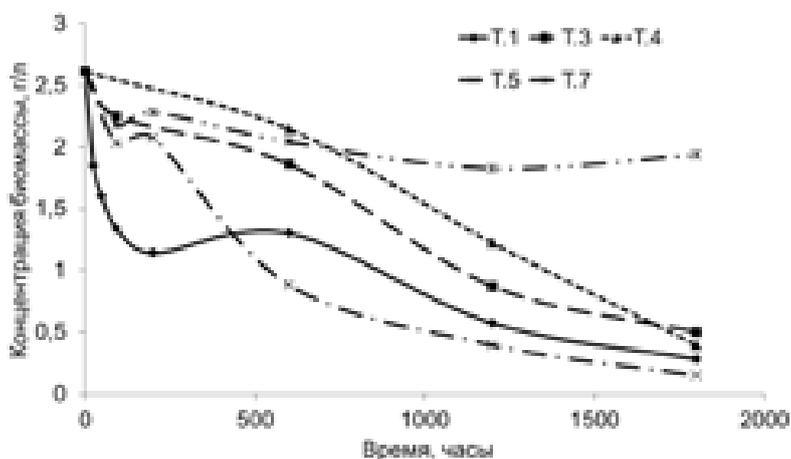


Рис. 8. Изменение концентрации АИ линий T_1 – T_7 при пересевах в условиях затемнения среды.

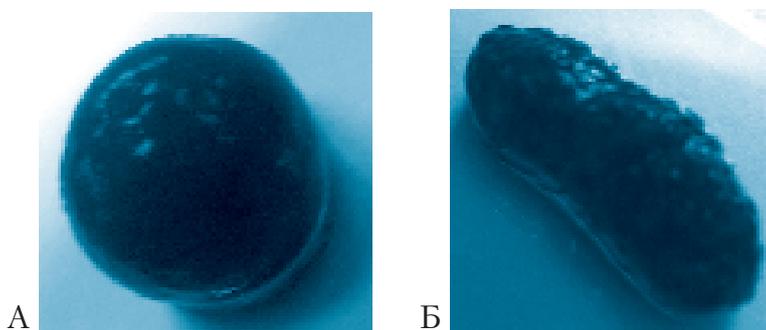


Рис. 9. Морфология некоторых из гранул АИ, полученных в отъемно-доливном режиме очистки после пиковой нагрузки и голода: А – контроль, Б – с внесением пероксида водорода.

кулы, которые при пересевах разрушались, и ил представлял в общей своей массе хлопья.

В дальнейшем при ведении линий ила использовали циклический режим очистки с доливом стока с высоким ХПК_{исх.} (до 2000 мг/л) с последующим голоданием биоценоза на протяжении нескольких суток, что способствовало формированию гранул ила, как уже наблюдалось нами ранее [6]. При этих условиях часто формировались бурые, серые, черные, белые гранулы размером до 1 см (рис. 9). Гранулы ила формировались и в затемненных, и в незатемненных колбах, причем в последнем случае в некоторых из колб образовывались гранулы, содержащие в своем составе микроводоросли. В вариантах с большим содержанием микроводорослей образовывались гранулы зеленого цвета размером до 3 мм. При последующем циклическом режиме очистки модельного стока с ХПК_{исх.} 350–450 мг/л примерно в 25 % случаев гранулы не распадались в течение 5 месяцев, но становились более рыхлыми и постепенно теряли свои преимущества перед хлопьями АИ по качеству очистки и устойчивости к внешним неблагоприятным факторам. Результаты измерения ХПК показали, что гранулы с микроводорослями в среднем хуже очищали среду по сравнению с гранулами, не содержащими микроводорослей.

Стабильность гранул, полученных чередованием большой нагрузки по ХПК и голоданием из линий C_3 – C_5 с последующим внесением H_2O_2 в стандартном циклическом режиме очистки (96 ч), была выше, чем у гранул, полученных без внесения стрессора. При внесении подобранных оптимальных доз пероксида водорода в очищаемую среду гранулы становились механически прочными и более устойчивыми к внесению повышенных доз H_2O_2 (рис. 10).

Микроскопирование гранул и высевы на твердые питательные среды показали (рис. 11), что в линиях без пассивации к пероксиду водорода и в хлопьях АИ преобладают бактериальные культуры, в то время как в гранулах, полученных в условиях пассивации на фоне внесения пероксида водорода, начинают преобладать актиномицеты и грибные культуры, что согласуется с теориями гранулообразования [22].

В сравнении с флокулами АИ гранулы, адаптированные к пероксиду водорода, выдерживают в 4–5 раз большую концентрацию H_2O_2 , а по сравнению с гранулами, полученными отъемно-доливным режимом при пиковой нагрузке и последующем голоде,

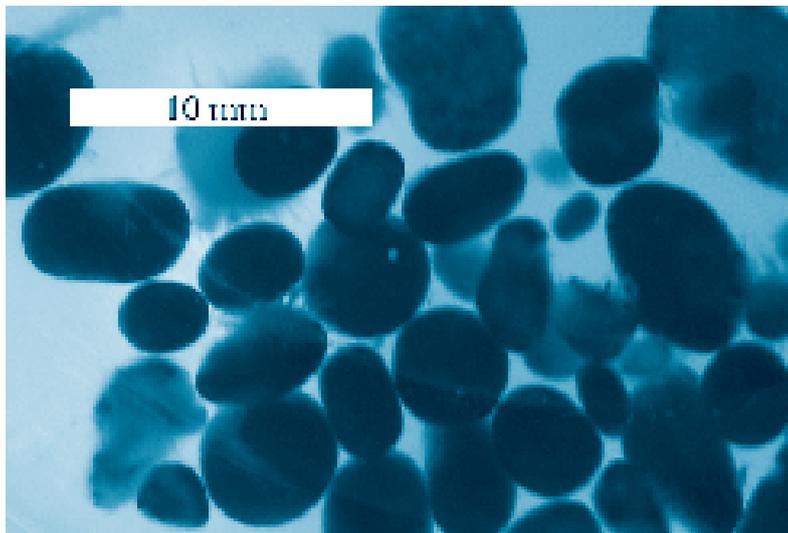


Рис. 10. Гранулы АИ, полученные в отъемно-доливном режиме после пиковой нагрузки и голода с внесением пероксида водорода.

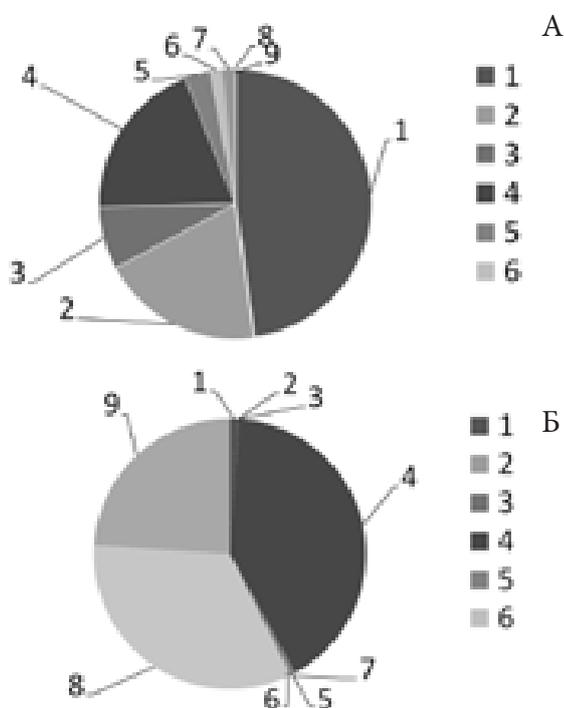


Рис. 11. Соотношение групп микроорганизмов в образцах АИ, полученных в отъемно-доливном режиме:
 А – хлопья АИ; Б – гранулы, адаптированные к пероксиду водорода.
 1–3 – палочковидные бактерии, 4 – нитчатые бактерии, 5–7 – кокки, 8 – грибы, 9 – актиномицеты.

они выдерживают в 2–3 раза большую концентрацию H_2O_2 , что может являться показателем устойчивости к неблагоприятным факторам среды. Голодание и оксидативный стресс, как следует из морфологического анализа колоний после высева компонентов полученных гранул на твердые питательные

среды, способствуют выработке внеклеточных полимеров, что влияет на стабильность и консистенцию гранул. Показатели очистки с помощью гранулированного ила, адаптированного к H_2O_2 , лучше, чем при использовании гранулированного ила без внесения H_2O_2 . В случае адаптированных к H_2O_2 гранул через 3 сут ХПК_{вых.} и содержание фосфатов в среде аналитически не обнаруживалось (рис. 12, А), тогда как в случаях с хлопьями ХПК_{вых.} составляло около 100 мг/л, а содержание фосфатов даже возросло (рис. 12, Б).

Примененный в настоящем исследовании подход с использованием комплексного воздействия на аэробный АИ факторов оксидативного стресса (пероксида водорода) и низкоинтенсивного видимого света лежит в основе предложенного нами метода управляемого культивирования микроорганизмов, названного «контролируемый оксидативный стресс», сочетающего совместное действие стрессоров и антистрессоров на популяции микроорганизмов [7, 11]. Из полученных данных следует, что такой подход может оказаться достаточно эффективным применительно к задаче формирования гранулированного аэробного АИ с улучшенными физиологическими и технологическими свойствами.

Воздействие стрессора – пероксида водорода до некоторой степени моделирует реальные условия пребывания сообщества в неблагоприятном окружении и его реакции на стрессовые воздействия, а также выступает фактором отбора, направленного на селекцию и адаптацию компонентов биоценоза, устойчивых к воздействию стрессора, что в данном случае способствует процессу гранулообразования аэробного ила.

На формирование гранул влияют доза H_2O_2 , фаза развития АИ, концентрация ила при пассивировании к пероксиду водорода, состав гранул, условия освещения среды с илом видимым светом, характер нагрузки по загрязнениям на АИ.

Консорциумы биодеструкторов, адаптированные к внесению относительно высоких концентраций H_2O_2 , устойчивы к смене условий культивирования (анаэробно-аэробные, голодание), формируют стабильные гранулы АИ, а также полнее очищают сточную воду от органических веществ по ХПК и фосфатов.

Для получения положительного эффекта H_2O_2 следует вносить в количествах от 25 до 300 мг/л в условиях окисления компонентов среды в периодическом режиме и ее освеще-

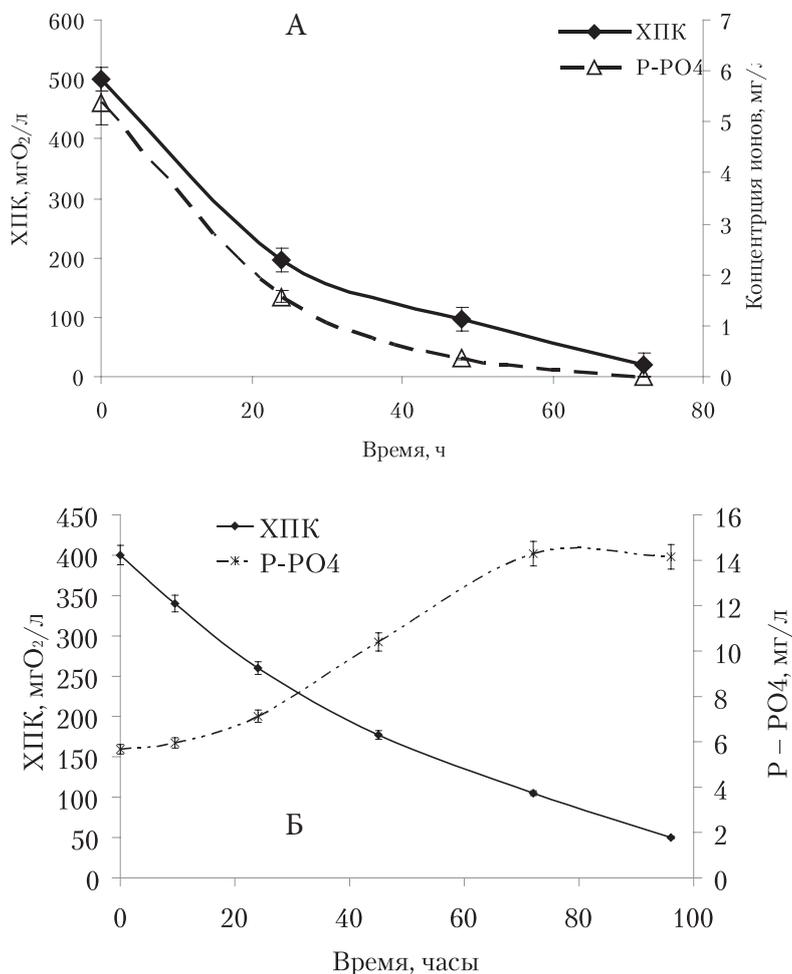


Рис. 12. Изменение величины ХПК и содержания фосфатов при очистке модельного бытового стока адаптированным к H_2O_2 гранулированным АИ в сравнении с очисткой модельного бытового стока исходным хлопьеобразующим активным илом. А — адаптированный к H_2O_2 гранулированный АИ; Б — исходный хлопьеобразующий АИ.

ния видимым светом с мощностью не более 100 мВт/л. При таком режиме повышается устойчивость ила к воздействию стрессора, резко улучшаются показатели очистки со снижением ХПК до значений, близких к нулю, лучше формируются и развиваются гранулы ила. При этом перексид водорода лучше вносить равномерно равными долями, чем однократно в том же количестве. Без освещения среды скорость окисления загрязнений существенно не повышается, а требуемые нормативные показатели очистки не достигаются.

Использование пиковых нагрузок по ХПК и последующего голодания АИ позволило подобрать режим, в котором формировались гранулы ила диаметром от 2 до 5 мм с хорошей очищающей способностью. Эти гранулы стабилизировались при пассировании

к перексиду водорода и выдерживали впоследствии до 1 г/л разового внесения H_2O_2 без снижения физиологической активности. Изменение видового состава АИ в форме хлопьев и гранул с уменьшением общего видового разнообразия и увеличением доли актиномицетов и грибных культур при пассировании к перексиду по сравнению с контрольными вариантами свидетельствует о достаточности этого минимального разнообразия для функционирования и устойчивости гранул, что представляет интерес для дальнейшего изучения.

То обстоятельство, что для повышения качества очистки сточных вод перексид водорода достаточно вносить в среду в относительно малых дозах (от 25 мг/л и, возможно, меньше) на фоне ее освещения низкоинтенсивным видимым светом свидетельствует не о непосредственном химическом воздействии пероксида водорода на загрязнения, а о регуляторной физиологической роли комбинированного воздействия H_2O_2 и видимого света.

Воспроизведение аналогичных положительных эффектов при комбинированном воздействии анолита электрохимического разложения и видимого света [23] свидетельствует в пользу универсальности обнаруженных эффектов при воздействии агентов оксидативного стресса и, возможно, других стресс- и антистресс-факторов.

Повышенная механическая прочность гранул аэробного АИ, пассированных к действию стрессора, возможность регулирования размеров гранул при внесении различных доз стрессора, улучшенные показатели очистки могут послужить основой для разработки нового подхода к поддержанию устойчивости и работоспособности аэробного АИ. С технологической точки зрения использование малых доз H_2O_2 экономически обосновано, легко реализуется и масштабируется при очистке промышленных и хозяйственно-бытовых стоков. Все это может быть востребовано для совершенствования методов биологической очистки и доочистки сточных вод с целью достижения нормативов, действующих в Российской Федерации.

Полученные результаты могут быть использованы при разработке высокоэффективных биотехнологий управляемого формирования, поддержания стабильности и культивирования структурированных ассоциаций микроорганизмов (дрожжей, бактерий, водорослей) для их использования при решении природоохранных задач.

Заключение

Результаты экспериментов показали, что совместное воздействие на аэробный АИ факторов оксидативного стресса (пероксида водорода) и низкоинтенсивного видимого света может существенно повысить качество очистки, в частности, в отношении удаления фосфатов и устойчивости гранул аэробного АИ, получаемых в условиях отъемно-доливного режима биологической очистки стоков. При этом необходимо учитывать дозу добавляемого H_2O_2 , фазу развития АИ, концентрацию ила при пассивации к пероксиду водорода, условия освещения среды с илом видимым светом, характер нагрузки по загрязнениям на АИ. Поскольку пероксид водорода достаточно вносить в среду в относительно малых дозах на фоне ее освещения низкоинтенсивным видимым светом, то такой подход к может быть относительно легко реализован на практике.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России по грантам «Разработка гибридных биотехнологий для глубокой очистки сточных вод промышленных предприятий» в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» (ГК №02.512.11.2157), «Разработка высокоэффективных методов биосинтеза и биологической очистки на основе контролируемого окислительного стресса как нового подхода к управляемому культивированию микроорганизмов» (рег. номер 4.5404.2011), «Биоинженерия и биологическая основа новых высокоэффективных методов культивирования микроорганизмов и их применение в микробиологическом синтезе, при переработке отходов и биологической очистке» ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (ГК № 02.740.11.0784).

Литература

1. Morgenroth E. Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor / E. Morgenroth, T.Sherden, M.C.M. Van Loosdrecht, J.J. Heijnen, P.A. Wilderer // Water Res.. 1997. V. 31. No 12. P. 3191-3194.
2. Duque A. F. 2-Fluorophenol degradation by aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor / A.F. Duque, V.S. Bessa, M.F. Carvalho, M.K. de Kreuk, M.C.M. van Loosdrecht, P.M.L. Castro // Water Res. 2011. V. 45. No 20. P. 6745-6752.
3. Li X. Treatment of synthetic wastewater by a novel MBR with granular sludge developed for controlling membrane fouling / X. Li, F. Gao, Zh. Hua, G. Du, J. Chen // Sep. Purif. Technol. 2005. V. 46. No 1–2. P. 19-25.
4. Li X. Characteristics of aerobic biogranules from membrane bioreactor system / X. Li, Y. Li, H. Liu, Zh. Hua, G. Du, J. Chen // J. Membrane Sci. 2007. V. 287. No 2. P. 294-299.
5. Choi J. The behavior of membrane fouling initiation on the crossflow membrane bioreactor system / J. Choi, T. Bae, J. Kim, T. Tak, Randall A.A. // J. Membrane Sci. 2002. V. 203. No 1–2. P. 103-113.
6. Кузнецов А.Е. Аэробная биологическая очистка сточных вод в условиях гранулообразования активного ила. I. Гранулообразование активного ила при очистке модельных стоков / А.Е. Кузнецов, Д.В. Колотилин, Н.С. Хохлачев, С.В. Калёнов // Вода: химия и экология. 2013, №7. С.35-44.
7. Калёнов С.В. Культивирование дрожжей и галобактерий в условиях контролируемого окислительного стресса. Дисс.....канд. техн. наук. М., 2007. 200 с.
8. Сафронов В.В. Интенсивная малоотходная система биодеструкции загрязнений высококонцентрированных стоков. Дисс.....канд. техн. наук. М., 2004. 195 с.
9. Halliwell B., Gutteridge J. Free Radicals in Biology and Medicine / Ed. 4. Oxford University Press, 2007. 888 p.
10. Shin H.S. Effect of shear stress on granulation in oxygen aerobic upflow sludge blanket reactors / H.S. Shin, K.H. Lim, H.S. Park // Water Sci. Technol. 1992. V. 26. No 3-4. P. 601-605.
11. Кузнецов А.Е. Использование пероксида водорода для совершенствования процессов культивирования микроорганизмов / А.Е. Кузнецов, С.Н. Сорокодумов, С.В. Калёнов, А.Ю. Винаров // Мат. 3-го Международного конгресса «Биотехнология - состояние и перспективы развития». М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», 2005. Ч. 1. С. 335.
12. Suyasov N.A. Increasing Efficiency of Biodegradation of Fat-containing Wastes of Meat-processing Industry / N.A. Suyasov, B.A. Karetkin, S.V. Kalyonov, I.V. Shakir, V.I. Panphilov // In «Industrial Application of Biotechnology». Nova Science Publishers Inc, New York, 2006. P. 105-113.
13. Шагинурова Г.И. Получение и культивирование гранул аэробных микроорганизмов в отъемно-доливном процессе очистки сточных вод / Г.И. Шагинурова, А.С. Сироткин, В.М. Емельянов, Т. Эггерер // Биотехнология. 2003. №3. С. 80-89.
14. Сироткин А.С. Агрегация микроорганизмов: флоккулы, биопленки, микробные гранулы / А.С.

Сироткин, Г.И. Шагинурова, К.Г. Ипполитов. Казань: Изд-во «Фэн» АН РТ, 2007. 160 с.

15. Tay J.-H. The effects of shear force on the formation, structure and metabolism of aerobic granules / J.-H. Tay, Q.-S. Liu Y. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001. V. 57. P. 227–233.

16. Yanning G. Mechanical shear contributes to granule formation resulting in quick start-up and stability of a hybrid anammox reactor / G. Yanning, L. Zhijun, L. Fengxia, F. Kenji // *Biodegradation.* 2011. V. 23, P. 363-372.

17. Мойжес О.В. Использование быстрооседающих активных илов – перспективное направление очистки городских сточных вод от азота и фосфора. / О.В. Мойжес, Ю.А. Николаев, К.В. Шотина, А.В. Акментина // *Сб. науч. тр. Проекты развития инфраструктуры города. Вып. 8. Перспективные направления развития технологии и проектирования в водохозяйственном комплексе города. М.: 2008. 173 с.*

18. РД 52.24.421-2012. Химическое потребление кислорода в водах. Методика измерений титриметрическим методом. Ростов–на–Дону: Росгидромет, 2012. 20 с.

19. Sang-Tae Kim. Photochemistry, photophysics, and mechanism of pyrimidine dimer repair by DNA

photolyase / Kim Sang-Tae, A. Sancar // *Photochem. Photobiol.* 1993. V. 57. No 5. P. 895-904.

20. Eker A.P.M. DNA photolyase from the fungus *Neurospora crassa*. Purification, characterization and comparison with other photolyases / A.P.M. Eker, H. Yajima, A. Yasui // *Photochem. Photobiol.* 1994. V. 60. No 2. P. 125-133.

21. ПНД Ф 14.1:2.112-97 Изд-во Стройиздат, 1997 (переиздание 2004), 10 с.

22. Mishima K. Self-immobilization of aerobic activated sludge – a pilot study of the aerobic upflow sludge blanket process in municipal sewage treatment / K. Mishima, M. Nakamura // *Water Sci. Technol.* 1991. V. 23. No 4-6. P. 981-990.

23. Кручинина Н.Е. Биологическая очистка модельных сточных вод пивоваренного производства в присутствии электрохимически синтезированного оксиданта / Н.Е. Кручинина Н.Е., Н.А. Иванцова, М.В. Габленко, А.Е. Кузнецов // *Вода: химия и экология.* 2012. №2. С. 33-37.

N.S. Khokhlachev, S.V. Kalenov, O.S.Zanina, A.E.Kuznetsov

AEROBIC BIOLOGICAL WASTE-WATER TREATMENT UNDER CONDITIONS OF GRANULE FORMATION OF ACTIVE SLUDGE.

II. GRANULE FORMATION OF ACTIVE SLUDGE UNDER CONTROLLED OXIDATIVE STRESS.

Stability of active sludge characteristics under changes of effluent parameters and impact of situational factors markedly affect on maintenance and intensification of aerobic facilities of biological waste-water treatment. Resistant communities observed in biofilms and aerobic granules of active sludge are systems with stabile morphology and biocenosis structure. Granulated aerobic sludge obtained by authors under oxidative stress is another example of stabile biocenosis which may be used for intensification of systems of biological water treatment. It was shown that the sludge has high removal capacity, increased stability of properties under unfavorable situational factors. Formation conditions and contribution of stress impact to formation of stabile granules are reviewed.

Key words: active sludge, aerobic granules, biological waste-water treatment