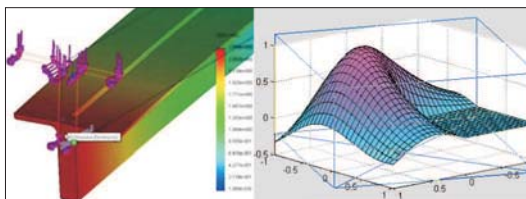


НАУЧНО-МЕТОДИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ



УДК 628.35.001

И.И. ИВАНЕНКО, Е.Я. ЛАПАТИНА

ИССЛЕДОВАНИЯ АСПЕКТОВ ДЕГРАДАЦИИ УГЛЕВОДОРОДОВ ДЕНИТРИФИЦИРУЮЩИМИ ПСЕВДОМОНАДАМИ

Приводятся результаты исследования способности штаммов денитрифицирующих псевдомонад расти за счет насыщенных углеводородов в зависимости от толщины их слоя над культуральной средой, динамики значений окислительно-восстановительного потенциала при культивировании и способности микроорганизмов использовать неорганические соединения, в состав молекулы которых входит элемент с переменной валентностью как альтернативный кислородный акцептор электронов для окисления насыщенных углеводородов вазелинового масла. Установлено, что насыщенные углеводороды могут служить источником углерода и энергии для денитрифицирующих псевдомонад лишь при наличии в культуральной среде кислорода как терминального акцептора электронов. Показано, что 2-сантиметровый слой насыщенных углеводородов является достаточно надежной защитой от диффузии кислорода из воздуха. Окислительно-восстановительный потенциал среды определяется тем соединением, стандартный потенциал реакции восстановления которой имел более высокое значение.

К л ю ч е в ы е с л о в а: окислительно-восстановительный потенциал, углеводороды, альтернативные акцепторы электронов, денитрификация, псевдомонады.

DOI 10.32683/0536-1052-2020-734-2-95-102

Введение. Развитие экономики приводит к широко распространенному загрязнению почв, подземных вод и поверхностных водоемов различными загрязняющими компонентами, в том числе и углеводородами. Углеводороды, попадающие в природную среду, вызывают негативные изменения в естественном биоценозе и усложняют экологическую ситуацию. Создание технологий для снижения их негативного влияния на окружающую среду является насущной задачей современного этапа развития экономики [1, 2]. В то же время бережное использование ресурсов, энергосбережение и внедрение экологически безвредных технологических схем очистки представляется наиболее актуальными задачами современности. Развитие биологических технологий для очистки сточных вод, почв и других загрязненных природных участков – наиболее актуальное направление, ввиду использования природных микроорганизмов и минимизации экологической нагрузки на окружающую среду [3, 4].

© Иваненко И.И., Лапатина Е.Я., 2020

Биологическая очистка загрязняющих веществ сопровождается обычно появлением побочного продукта – избыточного активного ила, который требует удаления с площадки очистных сооружений и вызывает дополнительные расходы и, как следствие, повышение себестоимости обработки сточных вод. Российские очистные сооружения, построенные в прошлом веке и ориентированные на использование большого количества кислорода, были рассчитаны на удаление органических веществ [5, 6]. На современном этапе качество очищенных стоков таких станций не может удовлетворить нормативные требования, а расходы на очистку слишком велики [7]. Сокращение расходов на очистные сооружения возможно при использовании различных окислительно-восстановительных условий в биоблоках биологической ступени очистки. Биологическая трансформация углеводов в присутствии кислорода – известное и достаточно хорошо изученное явление [8]. В аэробных условиях большинство гетеротрофных микроорганизмов используют углеводородные соединения как единственный источник питания. Доказано, что кислород не является единственным и незаменимым акцептором электронов при микробном окислении углеводов, потому что существуют микроорганизмы, которые способны переносить электроны из органических соединений на элементы с переменной валентностью, в частности, на азот, серу, хром, железо, марганец и т.п., в их частично или полностью окисленной форме [9].

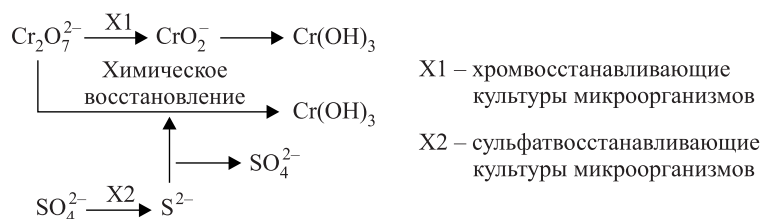
Анализ исследований последних лет свидетельствует о том, что микробная трансформация многих углеводов, которые входят в состав нефти, возможна в бескислородной среде. Ее осуществляют многочисленные представители разных родов бактерий, которые относятся к факультативным, облигатно-анаэробным, а при некоторых условиях даже и к облигатно-аэробным группам микроорганизмов. Микробное расщепление углеводов при отсутствии молекулярного кислорода в среде предопределяется наличием альтернативных акцепторов электронов. Решающее значение для начала реакции трансформации углеводов, скорости ее протекания имеет величина окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) среды.

Задачи исследований. Задачей настоящего исследования было изучение:

- способности штаммов денитрифицирующих псевдомонад (*P. stutzeri* P-19 и *P. chlororaphis* P-20) расти за счет насыщенных углеводов в зависимости от толщины их слоя над культуральной средой;
- динамики значений ОВП при культивировании денитрифицирующих штаммов псевдомонад;
- способности микроорганизмов использовать неорганические соединения, в состав молекулы которых входит элемент с переменной валентностью, как альтернативный кислородный акцептор электронов для окисления насыщенных углеводов вазелинового масла.

Методика исследований. Из анаэробной денитрифицирующей ассоциации на предыдущих этапах исследований было выделено несколько штаммов бактерий, которые относятся к роду *Pseudomonas* [10]. Они способны редуцировать нитратный азот до элементарного состояния и, как описано в литера-

туре, могут восстанавливать также Cr(+4) и сульфаты по следующей, не установленной пока, но вполне возможной схеме



Культуры были идентифицированы как *P. mendocina* P-13, *P. fluorescens* var. *Pseudo-iodinum* P-11, *P. aeruginosa* P-1.

Исследования проводили в периодических условиях культивирования бактерий в минеральной среде М9 с микроэлементами без принудительной аэрации [11]. Объем реактора 3 дм³. Растворенный кислород не удаляли. На поверхность культуральной жидкости помещали последовательно дизельное топливо и вазелиновое масло с переменной толщиной слоя 0,5–2 см. В реакторе вели контроль оптической плотности среды для анализа прироста микроорганизмов. На заключительном этапе исследований под 2-сантиметровым слоем вазелинового масла в присутствии кислорода при культивировании *P. fluorescens* var. *Pseudo-iodinum* P-11 при помощи портативного переносного прибора измеряли ОВП среды.

Результаты исследований и обсуждение. Под слоем дизельного топлива и вазелинового масла толщиной 0,5 см происходит интенсивный рост и размножение бактериальных клеток (рис. 1). При увеличении толщины слоя этих углеводов до 2 см рост микроорганизмов за счет растворенного кислорода незначителен. Оптическая плотность среды увеличивается в 2 раза в первое время роста бактерий, остается неизменной двое следующих суток и снижается в результате лизиса клеток после трех суток культивирования (рис. 2). Следовательно, диффузии кислорода из воздуха в минеральный раствор через слой углеводов вазелинового масла при его толщине 2 см не происходит.

Как видно из рис. 3, величины ОВП при культивировании *P. fluorescens* var. *Pseudo-iodinum* P-11 в среде М9 с микроэлементами, в которую внесены соответствующие акцепторы электронов, а потенциальным донором электронов выступают углеводороды вазелинового масла, изменяются с 500 до 430 мВ (в присутствии хроматов), 220 мВ (нитратов), 30 мВ (сульфатов). Последующего снижения ОВП не происходит, т.е., видимо, каждое из этих соединений удерживает окислительно-восстановительный потенциал на соответствующем уровне. В среде, без элементов с переменной валентностью, величина ОВП в процессе поглощения растворенного кислорода клетками также падает до 220 мВ. В среде без микроорганизмов ОВП оставался на уровне 500 мВ.

Диапазоны снижения ОВП раствора, который не содержит соединений с элементами переменной валентности (аэробная зона) и в присутствии нитратов, аналогичны, а их нижние значения перекрываются. Известно, что при низкой концентрации кислорода процессы аэробного окисления органических веществ и денитрификации протекают параллельно: при низкой концен-

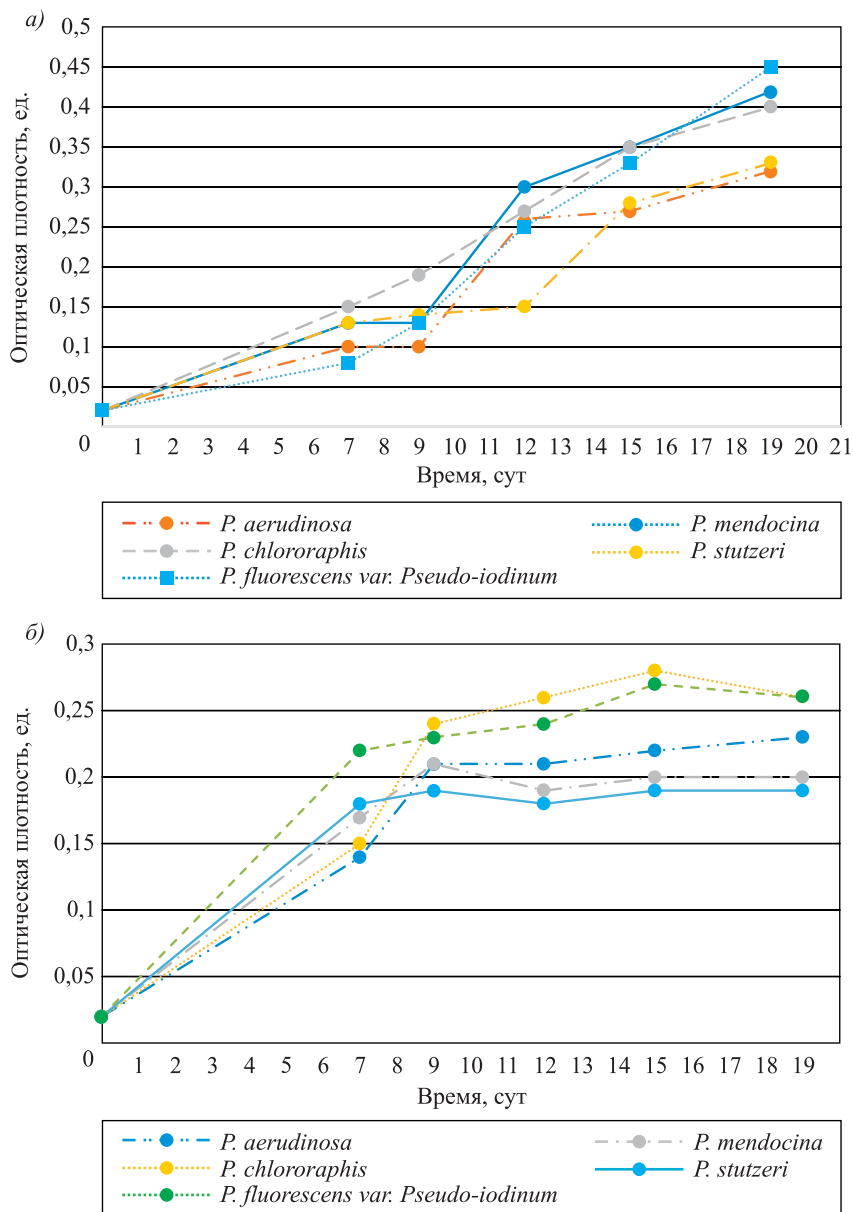


Рис. 1. Изменение оптической плотности среды при росте денитрифицирующих псевдомонад под 0,5-сантиметровым слоем углеводов дизельного топлива (а) и вазелинового масла (б)

трации кислорода в среде культивирования некоторые микроорганизмы для дыхания используют формы окисленного азота. Значения ОВП культуральной среды, которая обусловлена присутствием хроматов, 430 мВ. Оно находится в диапазоне протекания аэробных процессов. Без слоя вазелинового масла ОВП среды М9, которая контактирует с кислородом, при наличии соединений с элементами переменной валентности и без них, составляет 470 мВ. При наличии в среде культивирования *P. fluorescens var. Pseudo-iodinum* P-11 двух окислителей, например, хроматов (10 мг/дм³) и нитратов (300 мг/дм³), или хроматов (10 мг/дм³) и сульфатов (300 мг/дм³) ОВП опреде-

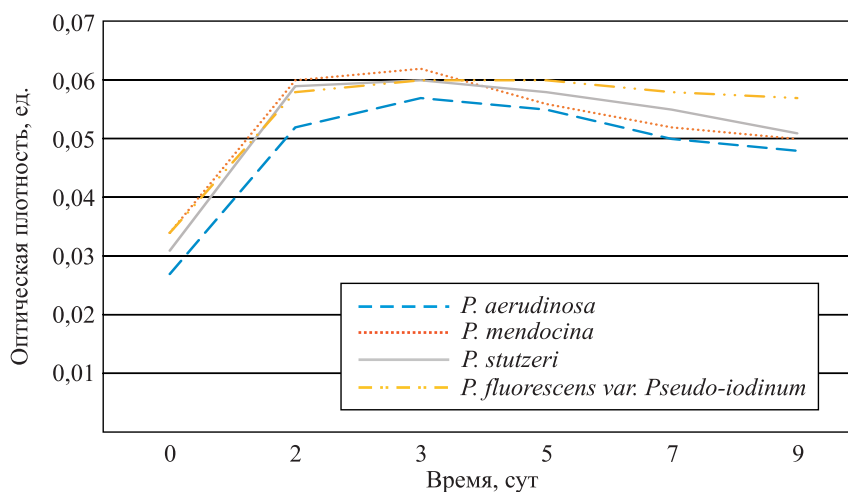


Рис. 2. Изменение оптической плотности среды при росте денитрифицирующих псевдомонад под 2-сантиметровым слоем углеводов вазелинового масла

ляется соединением с высшим потенциалом – хроматом и находится на уровне около 430 мВ. При одновременном присутствии нитратов и сульфатов по 300 мг/дм³ каждого *P. fluorescens var. Pseudo-iodinum* P-11 в процессе поглощения растворенного кислорода на окисление углеводов вазелинового масла снижает ОВП до 220 мВ, т.е. ОВП определяется нитратом.

Аналогичные изменения ОВП происходят и при культивировании других исследованных штаммов денитрифицирующих псевдомонад – *P. aeruginosa* P-1, *P. mendocina* P-13, *P. stutzeri* P-19, *P. chlororaphis* P-20 в среде М9 без донора электронов в присутствии элементов с переменной валентностью под 2-сантиметровым слоем вазелинового масла. При этом также наблюдает-

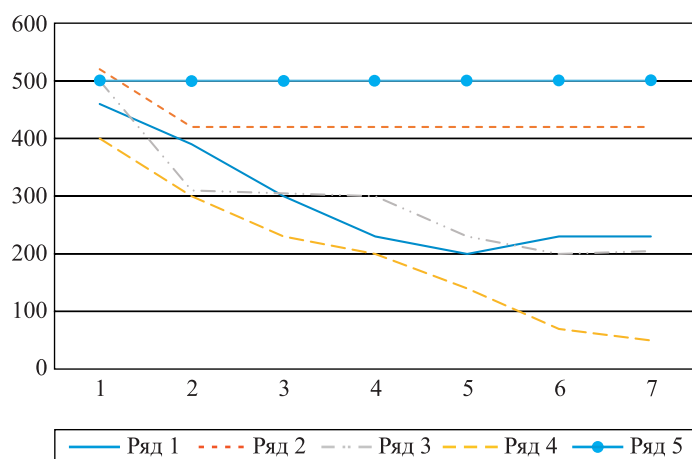


Рис. 3. Изменение ОВП среды при культивировании *P. fluorescens var. Pseudo-iodinum* P-11 в минеральной среде под 2-сантиметровым слоем вазелинового масла в присутствии кислорода с добавлением

1 – KNO₃; 2 – K₂Cr₂O₇; 3 – без дополнительного источника акцепторов электронов; 4 – K₂SO₄; 5 – контроль

ся минимальный прирост микробной биомассы за счет растворенного кислорода. Следовательно, в аэробных условиях денитрифицирующие псевдомонады эффективно будут утилизировать насыщенные углеводороды вазелинового масла и должны восстанавливать нитрат, в данных условиях культивирования они не могут объединять эти два свойства – окислять насыщенные углеводороды с нитратом, хроматом и сульфатом. При доступности клеткам кислорода (под незначительным слоем углеводов) процесс также сопровождается приростом микробной биомассы.

Выводы. Исследования показали, что ОВП среды определяется тем соединением, стандартный потенциал реакции восстановления которой имеет более высокое значение. Ассоциация микроорганизмов, селекционированная при условиях отсутствия кислорода в культуральной среде, способна окислять толуол при использовании нитрата и сульфата как альтернативных кислородных акцепторов электронов в условиях непрерывного культивирования. Чистые культуры денитрифицирующих бактерий, которые были выделены из этой ассоциации, неспособны использовать насыщенные углеводороды вазелинового масла как источник углерода и энергии при условиях денитрификации, хромат- и сульфатредукции. Об этом свидетельствовали величины значений ОВП, как показателя степени анаэробнобиоза, отсутствие значительного прироста биомассы бактерий под 2-сантиметровым слоем углеводов и неизменность концентрации соединений и элементов переменной валентности (нитратов, хроматов, сульфатов) в среде. Лишь при диффузии кислорода через небольшой слой углеводов отмечен рост и потребление субстрата изолированными культурами денитрифицирующих псевдомонад.

Насыщенные углеводороды могут служить источником углерода и энергии для денитрифицирующих псевдомонад, в частности, для *P. aeruginosa* P-1, *P. fluorescens* var. *Pseudo-iodinum* P-11, *P. mendocina* P-13, *P. stutzeri* P-19, *P. chlororaphis* P-20, лишь при наличии в среде кислорода как терминального акцептора электронов. 2-сантиметровый слой насыщенных углеводов вазелинового масла над средой культивирования микроорганизмов является надежным препятствием диффузии кислорода из воздуха. Этот прием возможно использовать во всех исследованиях способности аэробных бактерий к анаэробному дыханию.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Степанов С.В., Стрелков А.К., Солкина О.С. Расчет аэротенков для очистки городских сточных вод от биогенных элементов: Метод. указания. Самара: СГАСУ, 2015. 34 с.
2. Морозова К.М. Принципы расчета систем биологической очистки сточных вод // Водоснабжение и санитарная техника. 2009. № 1. С. 26–31.
3. Солкина О.С. Очистка сточных вод предприятий молочной промышленности: Автореф. дис. ... канд. техн. наук. Самара, 2017. 23 с.
4. Иваненко И.И. Исследование особенности дыхания бактерий // Вестник гражданских инженеров. 2017. № 62. С. 155–160.
5. Prosser J.I., Hink L., Gubry-Rangin C., Nicol G.W. Nitrous oxide production by ammonia oxidisers: community composition matters // Global Change Biology. 2019. No. 26. P. 103–118.

6. Deba j y o t i G., Shre y a G., T a p a n K.D., Y o u n g h o A. Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Front // Microbiol. 2016. P. 132–146.
7. Перечень рыбо-хозяйственных нормативов (ПДК) и ориентировочно безопасных уровней воздействия (ОБУВ) вредных веществ для воды объектов, имеющих рыбо-хозяйственное назначение. М.: Изд-во ВНИРО, 1994. 304 с.
8. Тим е р г а з и н а И.Ф., П е р е х о д о в а Л.С. К проблеме биологического окисления нефтепродуктов углеводородоксилирующими микроорганизмами // Нефтегазовая геология. Теория и практика. 2012. Т. 7. С. 1–28.
9. И в а н е н к о И.И., Н о в и к о в а А.М., Д у х о в с к о й В.Д. Элементы с переменной степенью окисления при микробном окислении органических загрязнений воды // Вода и экология: проблемы и решения. 2019. № 2. С. 24–31.
10. И в а н е н к о И.И., Н о в и к о в а А.М., Л а п а т и н а Е.Я. Исследования селекции микроорганизмов для разложения нефтепродуктов с повышенной нитрогеназной активностью в лабораторном биореакторе // Вестник гражданских инженеров. 2020. № 3.
11. М и л л е р Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1975. 436 с.

Иваненко Ирина Ивановна, канд. техн. наук, доц.

Санкт-Петербургский архитектурно-строительный университет (СПбГАСУ)

Лапатина Елена Яковлевна, химик-микробиолог

Санкт-Петербургский архитектурно-строительный университет (СПбГАСУ)

Получено 15.01.2020

Ivanenko Irina Ivanovna, PhD, Ass. Professor

Saint-Petersburg State University of Architecture and Civil Engineering, Russia

Lapatina Elena Yakovlevna, Senior Assistant

Saint-Petersburg State University of Architecture and Civil Engineering, Russia

RESEARCH ON HYDROCARBON DEGRADATION ASPECTS BY DENITRIFYING PSEUDOMONADES

The study's results of the denitrifying pseudomonas strains' ability to grow due to saturated hydrocarbons depending on their layer thickness above the culture medium, the values dynamics of the redox potential during cultivation and the ability of microorganisms to use inorganic compounds, which molecules include an element with a variable valency as an alternative oxygen electron acceptor for the saturated hydrocarbons oxidation of liquid paraffin. It was found that saturated hydrocarbons can serve as a source of carbon and energy for denitrifying pseudomonads, only in the presence of oxygen in the culture medium as a terminal electron acceptor. It is shown that a 2-sm layer of saturated carbon is a fairly reliable protection against diffusion of oxygen from air. The redox potential of the medium is determined by that compound, the standard potential of the reduction reaction was of a higher value.

Key words: redox potential, hydrocarbons, alternative electron acceptors, denitrification, pseudomonades.

REFERENCES

1. S t e p a n o v S.V., S t r e l k o v A.K., S o l k i n a O.S. Raschet aerotenkov dlya ochistki gorodskikh stochnykh vod ot biogenykh elementov [Calculation of aeration tanks for cleaning urban wastewater from nutrients]. Samara, 2015. 34 p. (in Russian)

2. Morozova K.M. Printsipy rascheta sistem biologicheskoy ochistki stochnykh vod [The calculation principles of biological wastewater treatment systems]. Vodosnabzhenie i sanitarnaya tekhnika [Water Supply and Sanitary Equipment]. 2009. No. 1. Pp. 26–31. (in Russian)
3. Solkina O.S. Ochistka stochnykh vod predpriyatiy molochnoy promyshlennosti: Avtoref. dis. ... kandidata tekhnicheskikh nauk [Sewage treatment of dairy enterprises: Abstract. dis. ... cand. tech. sciences]. Samara, 2017. 23 p. (in Russian)
4. Ivanenko I.I. Issledovanie osobennosti dykhaniya bakteriy [Investigation of the bacterial respiration features]. Vestnik grazhdanskikh inzhenerov [Journal of Civil Engineers]. 2017. No. 62. Pp. 155–160. (in Russian)
5. Prosser J.I., Hink L., Gubry-Rangin C., Nicol G.W. Nitrous oxide production by ammonia oxidisers: community composition matters. Global Change Biology. 2019. No. 26. Pp. 103–118.
6. Debajyoti G., Shreya G., Tapan K.D., Youngho A. Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Front. Microbiol. 2016. Pp. 132–146.
7. Perechen' rybo-khozyaystvennykh normativov (PDK) i orientirovochno bezopasnykh urovney vozdeystviya (OBUV) vrednykh veshchestv dlya vody ob'ektov, imeyushchikh rybo-hozyaystvennoe naznachenie [The list of fisheries management standards (MFS) and tentatively safe levels of exposure (SLE) of harmful substances to water objects with fishery purposes]. Moscow, 1994. 304 p. (in Russian)
8. Timergazina I.F., Perekhodova L.S. K probleme biologicheskogo okisleniya nefteproduktov uglevodorodokislyayushchimi mikroorganizmami [The biological oxidation of problem oil products by hydrocarbon-oxidizing microorganisms]. Neftegazovaya geologiya. Teoriya i praktika [Oil and gas geology. Theory and practice]. 2012. T. 7. Pp. 1–28. (in Russian)
9. Ivanenko I.I., Novikova A.M., Duhovskoy V.D. Elementy s peremennoy stepen'yu okisleniya pri mikrobnom okislenii organicheskikh zagryazneniy vody [Elements with a variable oxidation state during microbial oxidation of organic water pollution]. Voda i ekologiya: problemy i resheniya [Water and ecology: problems and solutions]. 2019. No. 2. Pp. 24–31. (in Russian)
10. Ivanenko I.I., Novikova A.M., Lapatina E.Ya. Issledovaniya selektsii mikroorganizmov dlya razlozheniya nefteproduktov s povyshennoy nitrogenaznoy aktivnost'yu v laboratornom bioreaktore [Studies of microorganisms selection for the decomposition of petroleum products with increased nitrogenase activity in a laboratory bioreactor]. Vestnik grazhdanskikh inzhenerov [Bulletin of Civil Engineers]. 2020. No. 3. (in Russian)
11. Miller Dzh. Eksperimenty v molekulyarnoy genetike [Experiments in molecular genetics]. Moscow, 1975. 436 p. (in Russian)