УДК 628.35+546.135+574.63+579.83:88

Г.Ф. Смирнова, М.М. Гавриленко, В.С. Підгорський

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д03680, Україна

ВІДНОВЛЕННЯ ХЛОРАТІВ ІММОБІЛІЗОВАНИМИ БАКТЕРІЯМИ У БЕЗПЕРЕРВНОМУ РЕЖИМІ*

Досліджено відновлення хлоратів культурою Aerococcus dechloraticans ТГС-463, іммобілізованою на кукурудзяних стрижнях у безперервному режимі. Встановлено, що при культивуванні на модельному середовищі з хлоратами збільшення швидкості розбавлення (D) призводить до зниження ефективності процесу, а саме зі зростанням D концентрація залишкових хлоратів збільшується, а швидкість їх відновлення зменшується. Оптимальний режим відновлення хлоратів знаходиться в діапазоні D 1,12 – 1,5 год$^{-1}$.

К л ю ч о в і с л о в а : хлоратвідновлювальні бактерії, відновлення хлоратів, безперервне культивування.

Ідея використання безперервних процесів в області біотехнології не є новою [2, 3]. Існує певна класифікація безперервних систем культивування [4], згідно з якою обраний нами спосіб характеризується як замкнена гетерогенна система, де клітини ростуть на межі носій : середовище. Теоретично таку систему можна уявити у вигляді трубчатої безперервної системи, що представляє собою однорідний проток рідини крізь вузьку трубку. При цьому вважається, що поживне середовище переміщується крізь шар твердого носія з іммобілізованими на ньому клітинами [8].

Таким чином, постійний приток свіжих поживних речовин та відведення культуральної рідини, що містить метаболіти, забезпечує тривале функціонування системи.

Метою роботи було з'ясування основних параметрів процесу відновлення хлоратів при безперервному культивуванні хлоратвідновлювальних бактерій, іммобілізованих на нехарчовій рослинній сировині.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження була культура хлоратвідновлювальних бактерій (ХВБ) *Aerococcus dechloraticans* ТГС-463 [1]

Культуру ХВБ *A. dechloraticans* ТГС-463 вирощували на середовищі (г/л): NH_4Cl – 2,0; KH_2PO_4 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; $MgSO_4$ – 0,2; $KClO_3$ – 2,0; МПБ – 10 % [7]. Відновлення хлоратів у безперервному режимі вивчали на такому ж середовищі, але замість МПБ вносили етанол у кількості 1,5 об. % .

Перебіг процесу відновлення хлорату у проточному режимі вивчали в установці, яка складалась з чотирьох послідовно з'єднаних скляних культиваторів об'ємом 120 см^3 з конічним дном (рис. 1), які максимально заповнювали середовищем та закривали гумовими пробками. Усередині культиваторів поміщали носій – шматочки кукурудзяних стрижнів розміром 0,8–1,0 см^3, на яких були іммобілізовані клітини ХВБ. Ступінь завантаження носієм складав 55–60 %. Поживне середовище з хлоратами надходило у нижню частину культиватора та відводилось через верхній штуцер у нижню частину наступної секції. Проток забезпечувався та регулювався перистальтичним насосом у межах від 0,79 до 2,25 год$^{-1}$. Температура культивування складала 32 °С. Іммобілізацію клітин на кукурудзяних стрижнях проводили згідно з методикою, розробленою раніше [6], а саме: суспензію мікроорганізмів щільністю 0,3 г/л абсолютно сухих речовин (АСР) вносили у культиватор, заповнений носієм так, щоб рідина повністю покривала шар носія, і витримували 5 годин для закріплення. Після цього установка максимально заповнювалась середовищем з хлоратами на 12–18 годин для адаптації мікроорганізмів до середовища. Культивування в безперервному режимі (позначено у таблиці як «початок роботи») розпочиналось після витримки і на кожному етапі спостереження проводилось до моменту, коли ступінь конверсії хлоратів не змінювався з часом.

*Робота виконана за часткового фінансування за рахунок бюджетних коштів для підтримки об'єкта національного надбання – «Колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України».

© Г.Ф. Смирнова, М.М. Гавриленко, В.С. Підгорський, 2010

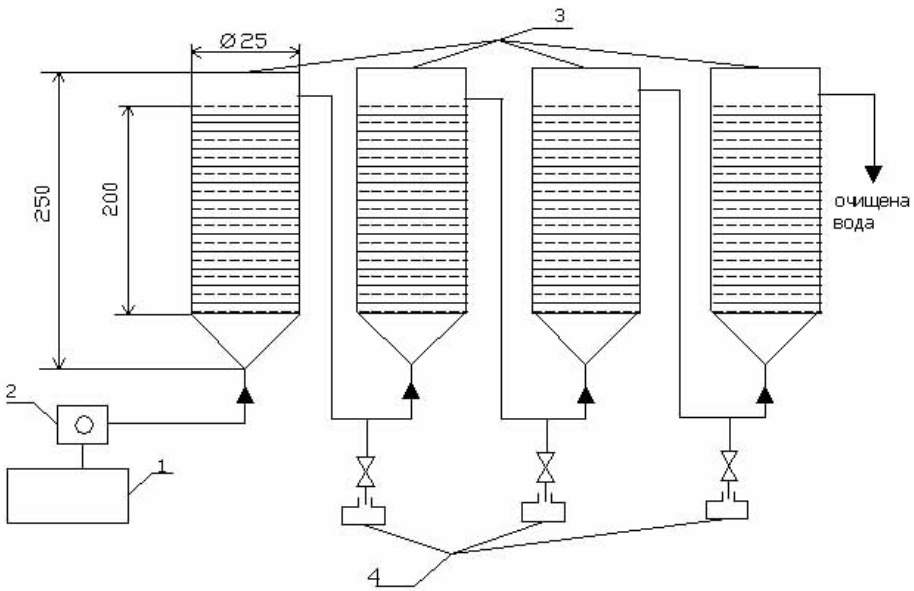

Рис. 1. Схема лабораторної установки для відновлення хлоратів у безперервному режимі:

1 – поживне середовище з хлоратами; 2 – перистальтичний насос; 3 – культиватори для анаеробного вирощування бактерій; 4 – пробовідбірники; 5 – носій з іммобілізованими клітинами.

Проби відбирали з пробовідбірників на виході з кожної секції (Рис. 1, 4). Концентрація хлоратів на виході з кожної секції відповідала початковій для наступної секції. Показником перебігу процесу була загальна швидкість відновлення хлоратів, яку розраховували за формулою:

$V = (C_{поч.}-C_{кінц.})/ t$, г/л ·год, де:

$C_{поч}$ та $C_{кінц}$ – концентрація хлоратів на початку досліду та через час t, відповідно.

Ступінь непрореагування хлоратів визначали за співвідношенням:

$\nu_i = [ClO_3^-]_i/[ClO_3^-]_{i-1}$

Ступінь конверсії розраховували за формулою:

$$\lambda = 1 - C_i/C_{i-1}$$

Ці показники представлені у безрозмірних одиницях.

Перебіг відновлення хлоратів ХВБ, іммобілізованими на кукурудзяних стрижнях вивчали на двох модифікаціях системи – на системі з протоком свіжого поживного середовища послідовно крізь 4 секції і відводом його із системи (рис. 2, а). Залежність відновлення хлоратів від швидкості розведення середовища (D 0,79÷2,25 год$^{-1}$) вивчали з рециркуляцією поживного середовищі певний час у системі (рис. 2, б).

Вміст хлоратів визначали перманганатометричним методом [5].

Результати та їх обговорення. Вихід установки на сталий режим та ступені конверсії хлоратів для кожної із секцій вивчали за схемою без рециркуляції на середовищі з 1,5 % етанолу та початковій концентрації хлорат-іона 2,23 г/л при швидкості розведення D = 0,79 год$^{-1}$.

Як свідчать результати (табл. 1), активне відновлення хлоратів розпочалось з перших годин культивування мікроорганізмів в умовах протоку. Ступінь конверсії хлоратів поступово збільшувався при проходженні культуральної рідини послідовно по всім секціям установки на кожному з етапів спостереження.

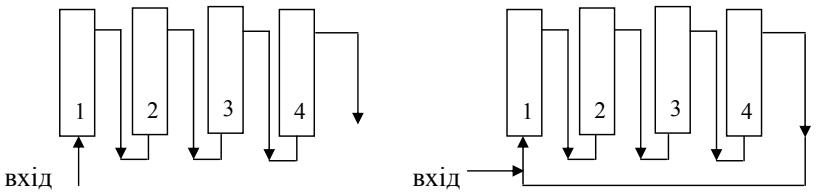

Рис. 2. Схема безперервного процесу без рециркуляції поживного середовища (а) та з рециркуляцією (б).

Таблиця 1

Відновлення хлоратів у проточному режимі без рециркуляції середовища (D =0,79 год $^{-1}$)

	Початок роботи установки			**2 год роботи**			**4 год роботи**		
Ступені	$[ClO_3^-]$	λ	ν	$[ClO_3^-]$	λ	ν	$[ClO_3^-]$	λ	ν
1	1,98	0,11	0,89	1,85	0,170	0,830	2,12	0,11	0,89
2	1,76	0,11	0,89	1,54	0,170	0,83	1,84	0,13	0,87
3	1,54	0,13	0,87	1,27	0,172	0,82	1,55	0,16	0,84
4	1,31	**0,14**	**0,86**	1,02	**0,19**	**0,81**	1,21	**0,22**	**0,78**
	8 год роботи			10 год роботи			24 год роботи		
Ступені	$[ClO_3^-]$	λ	ν	$[ClO_3^-]$	λ	ν	$[ClO_3^-]$	λ	ν
1	2,02	0,08	0,92	1,96	0,119	0,881	1,92	0,145	0,855
2	1,71	0,154	0,85	1,63	0,167	0,833	1,48	0,227	0,773
3	1,38	0,191	0,81	1,21	0,256	0,744	1,05	0,291	0,709
4	1,01	**0,265**	**0,74**	0,75	**0,38**	**0,62**	0,64	**0,39**	**0,61**

Примітки: $[ClO_3^-]$ – концентрація хлоратів, г/л; ν – ступінь непрореагування хлоратів; λ – ступінь конверсії хлоратів. Концентрація хлорат-іонів на вході у першу ступінь установки 2,23 г/л.

На 24 годину вирощування процес відновлення стабілізувався. Ступінь конверсії хлоратів становив 0,38–0,39 (рис. 3). Цей показник залишався незмінним впродовж 10 діб спостереження (данні не приведені).

Залежність відновлення хлоратів від швидкості розведення вивчали за схемою з рециркуляцією середовища з хлоратами (рис. 2, б). Переведення батареї культиваторів на схему з рециркуляцією здійснювали після виходу системи на сталий режим роботи, при якому ступінь конверсії при заданому протоці не залежав від часу. Після зміни протоку систему знов виводили на сталий режим і тільки потім проводили спостереження. Результати дослідження наведені в табл. 2. Початкова концентрація хлоратів 2,0 г/л. Повторність дослідів – трикратна.

Результати (табл. 2) свідчать про те, що при культивуванні ХВБ на модельному середовищі з хлоратами зі зростанням D швидкість відновлення хлоратів поступово збільшується і досягає максимуму при D=1,12год$^{-1}$ (0,13 мг/л•год). Підвищення швидкості розведення до D=1,5год$^{-1}$ дещо знижує загальну швидкість відновлення. Така залежність свідчить про можливу наявність інгібуючого чинника у вигляді метаболіту (хлорит-аніона) при зміненні D від 0,79 до 1,5 год$^{-1}$, тому що на 12 годину культивування процес стабілізується. В останньому режимі (D = 2,25 год$^{-1}$) залишкова концентрація хлоратів в установці різко збільшується, а швидкість відновлення останніх зменшується у два рази, порівняно з оптимальною (рис. 4). Найбільш вірогідно, що у цьому випадку має місце вимивання бактерій.

Таким чином, оптимальний режим відновлення хлоратів знаходиться в діапазоні D від 1,12 до 1,5 год$^{-1}$. Збільшення D призводить до значного зниження ефективності процесу.

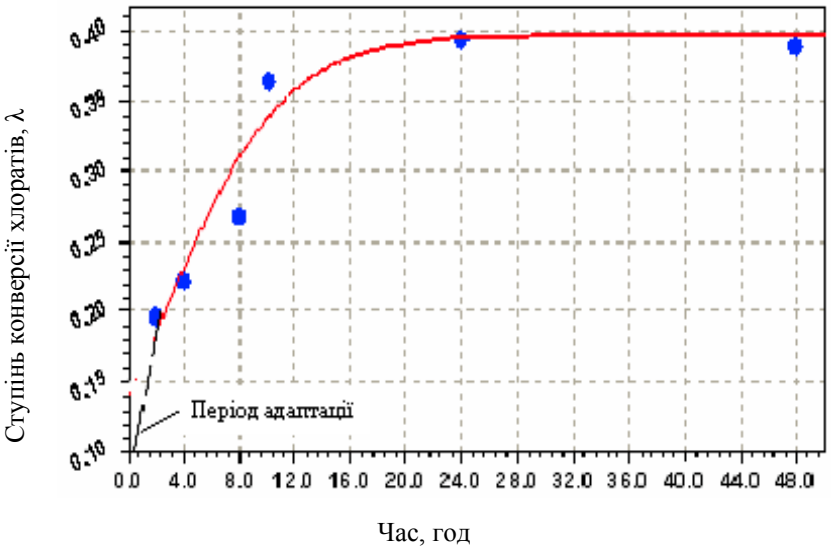

Рис. 3. Зміна ступеня конверсії хлоратів в установці з часом культивування (D = 0,79 год $^{-1}$)

Таблиця 2

Відновлення хлоратів в проточному режимі з рециркуляцією середовища

Швидкість розведення, год$^{-1}$	**Тривалість спостереження, год**	**Вміст хлоратів, г/л**	**Загальна швидкість відновлення, г/л год**
D = 0,79	1	1,34±0,012	0,11±0,011
	2	1,01±0,03	
	3	0,86±0,013	
	8	0,33±0,007	
	12	0,33±0,022	
D = 1,12	1	1,17±0,001	0,13±0,013
	2	0,99±0,011	
	3	0,94±0,023	
	8	0,34±0,018	
	12	0,33±0,011	
D = 1,5	1	1,04±0,015	0,12±0,017
	2	0,92±0,007	
	3	0,82±0,024	
	8	0,39±0,021	
	12	0,39±0,017	
D = 2,25	1	1,32±0,012	0,06±0,014
	2	1,25±0,031	
	3	1,12±0,015	
	8	0,89±0,004	
	12	0,88±0,011	

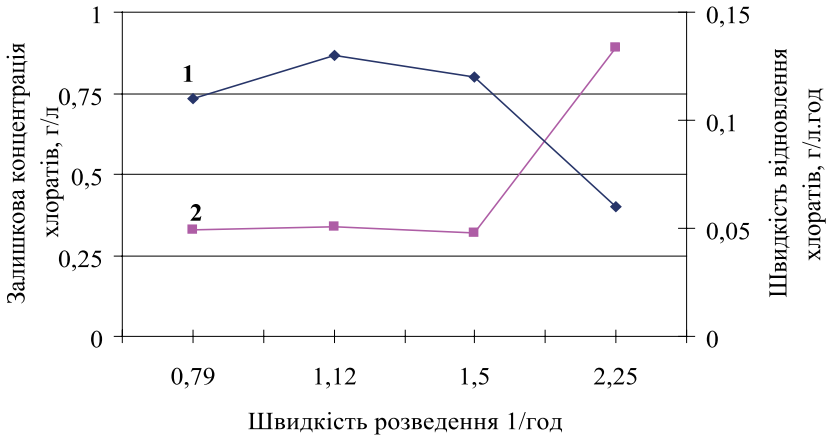

Рис. 4. Вплив швидкості розведення на ефективність відновлення хлоратів:

1 – швидкість відновлення; 2 – залишкова концентрація хлоратів

Г.Ф.Смирнова, М.Н. Гавриленко, В.С. Подгорский

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного
НАН Украины, Киев

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ХЛОРАТОВ ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ БАКТЕРИЯМИ В НЕПРЕРЫВНОМ РЕЖИМЕ

Р е з ю м е

Изучено восстановление хлоратов культурой *Aerococcus dechloraticans* ТГС-463, иммобилизованной на кукурузной кочерыжке в проточном режиме. Установлено, что при культивировании на модельной среде с хлоратами увеличение скорости разбавления (D) приводит к снижению эффективности процесса, а именно с увеличением D концентрация остаточных хлоратов возрастает, а скорость их восстановления уменьшается. Оптимальный режим восстановления хлоратов находится в диапазоне D 1.12 – 1,5 час$^{-1}$.

К л ю ч е в ы е с л о в а: хлоратредуцирующие бактерии, восстановление хлоратов, непрерывное культивирование.

G.F.Smirnova, M.N.Gavrylenko, V.S.Podgorsky

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

CHLORATE REDUCTON BY IMMOBILISED BACTERIA IN CONTINUOUS CONDITIONS

S u m m a r y

Chlorate reduction by the strain *Aerococcus dechloraticans* TGS-463 immobilized on the corncob under flow conditions has been studied. It has been established that under growth in the medium with chlorate the increase of the dilution rate (D) results in the lower efficacy of the process, i.e., a higher concentration of residual chlorates in the medium and a lower rate of chlorate reduction. The optimal D for chlorate reduction ranges from 1.12 to 1.5 hour^{-1}.

The paper is presented in Ukrainian.

K e y w o r d s: chlorate-reducing bacteria, reduction of chlorates, continuous culture.

T h e a u t h o r's a d d r e s s: *Smirnova G.F.,* Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. *А.с.* 1564122 СССР МКИ С 02 F 3/34, С 12 N 1/20 Штамм бактерий *Aerococcus dechloraticans* ТГС-463, используемый для очистки сточных вод производства спичек / Н.С. Серпокрылов, В.И. Семенов, В.П. Костюков и др., Опубл. 15.05.90, бюл. №18.
2. *Биологическая* очистка хромсодержащих промышленных сточных вод: / Под ред. Е.И Квасникова, Н.С. Серпокрылова – Киев: Наукова думка, 1990. – 109 с.
3. *Непрерывное* культивирование микроорганизмов: Пер. с англ. / Под ред. З. Фенцла и И. Малика – М.: Пищевая пром., 1968. – 546 с.
4. *Перт С.Дж.* Основы культивирования микроорганизмов и клеток: Пер. с англ. – Москва: Мир, 1978. – 332 с.
5. *Петрашень В.И.* Объёмный анализ. – М.: Наука, 1946. – 227 с.
6. *Смирнова Г.Ф.* Использование иммобилизованных клеток бактерий при очистке сточных вод от хлоратов и хроматов // Мікробіол. журнал. – 2006. – **68**, №1. – С. 62–68.
7. *Смирнова Г.Ф.* Оптимизация условий культивирования хлоратвосстанавливающих бактерий *Acinetobacetr thermotoleranticus* С-1 для очистки сточных вод производства зажигательных смесей // Мікробіол. журнал. – 2006. – **68**, №4. – С. 27–34.
8. *Kim Kijung, Logan B.E.* Fixed– bed bioreactor treating perchlorate-contaminated waters //Environmental Engineering Sci. – 2000. – **17**, N5. – P.257–265.

Отримано 17.01.2008