

Коновалова В. В., Брик М. Т.,  
Дмитренко Г. М., Гвоздяк П. І.,  
Нігматуллін Р. Р.

## ДЕНІТРИФІКАЦІЯ В МЕМБРАННОМУ БІОРЕАКТОРІ З ІММОБІЛІЗОВАНИМИ БАКТЕРІЯМИ

Розроблено спосіб одержання біокаталітичних мембран з використанням денітрифікуючих бактерій, іммобілізованих в плівках альгінату кальцію та агар-агару, які нанесені на поверхню промислових ультрафільтраційних мембран. Показано, що процес денітрифікації в діалізному режимі ефективно відбувається за умови використання ультрафільтраційних мембран з малим діаметром пор. Показана можливість контролю перебігу процесу денітрифікації вимірюванням окисно-відновного потенціалу (ОВП) культурального середовища. Показано, що куль тура *Pseudomonas aeruginosa* здатна проводити процес денітрифікації з найбільшою швидкістю серед досліджених культур роду *Pseudomonas*, при цьому ОВП знижується від 400 до -300 мВ протягом 30 годин культивування. Концентрація нітритів при роботі біореактора знижується від 500 мг/л до 0.

Забруднення ґрунтових вод нітратами є важливою екологічною проблемою [1]. У деяких випадках концентрація цих речовин у ґрунтових водах сягає 1 г/л, що значно перевищує їх гранично допустиме значення (ГДК = 50 мг NO<sup>-3</sup>/л).

На відміну від фізико-хімічних процесів, при проведенні яких забруднення лише переходять в інший стан або концентруються, біологічна денітрифікація може забезпечити повне видалення нітратів з води. Біологічний процес денітрифікації базується на здатності деяких бактерій у безкисневих умовах, використовуючи джерело органічного вуглецю як донор електронів, відновлювати окислені форми азоту до молекулярного азоту за такою схемою:



Кінетика перетворення окислених форм азоту в молекулярний азот і можливість накопичення проміжних сполук залежить від виду мікроорганізмів та умов їх культивування (рН, концентрація нітратів і нітритів, а також розчиненого кисню). Так, деякі бактерії використовують нітрат при зброджуванні органічних речовин, перетворюючи його в аміак, що не приводить до видалення азоту з води [2].

Денітрифікуючі бактерії роду *Pseudomonas* в більшості випадків гетеротрофи і донорами електронів при відновленні окислених форм азоту їм слугують органічні субстрати. Тобто, гетеротрофні денітрифікуючі бактерії потребують органічного вуглецю для росту і дихання. Таким чином, для денітрифікації питної води необхід-

не додаткове внесення джерела органічного живлення. Кількість введеного органічного вуглецю залежить від концентрації нітратів у воді і не повинна перевищувати стехіометричного значення, необхідного для відновлення нітратів до молекулярного азоту. З іншого боку, це значення не повинно бути нижче стехіометричної концентрації, необхідної для асиміляційного споживання нітратів бактеріями. Токсичність нітритів значно вища, ніж токсичність нітратів (ГДК NO<sup>2</sup> 0,1 мг/л), тому оптимальна кількість внесеного органічного вуглецю — дуже важливий фактор біотехнологічного процесу.

Мікробне забруднення біологічно очищених вод є головною вадою конвективних процесів денітрифікації. Отже, надалі необхідна стадія фільтрації обробленої води і знезаражування. В останні роки для цієї мети широкого використання набули мембранні біореактори [3—4]. В таких реакторах мембрана виконує три функції: розділюючу, стерилізуючу та є носієм для іммобілізації мікроорганізмів.

Метою даної роботи є спроба поєднати біологічний та мембранний процеси шляхом використання мікроорганізмів в іммобілізованому стані й дослідити процеси денітрифікації на таких біокаталітичних мембранах.

### Матеріали і методи

У роботі були використані денітрифікуючі штами бактерій роду *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. aurantiaca*, *P. fluoro-violaceus*, *P. mendocina*).

Біомасу вирощували на м'ясо-пептонному агарі (МПА) (Serva).

Клітини мікроорганізмів іммобілізували в плівках з агар-агару та альгінату кальцію за стандартними методиками [5]. Плівки формували на робочій поверхні промислових мембран. Для цього використовували промислові ультрафільтраційні ацетатцелюлозні мембрани УАМ-100, мікрофільтраційні ацетатцелюлозні мембрани МФА-МА 4.

Денітрифікацію проводили в діалізній комірці, яка має конструкцію динамічного типу. Об'єм камер складав  $180 \text{ см}^3$ . Між камерами вертикально закріплювалася досліджувана мембрана. Між камерами і мембраною розміщувалися гумові герметизуючі прокладки. У камеру 1 заливали модельний розчин, а в камеру 2 — розчинник (дистильовану воду). Модельні розчини готували на основі сольового середовища М9 [6] із додаванням нітриту натрію і глюкози в концентраціях  $300 \text{ мг/л}$  і  $2 \text{ г/л}$  відповідно. Кисень з розчину не видаляли. Водну поверхню обох камер заливали шаром стерильного вазелінового масла завтовшки  $1 \text{ см}$ .

Перебіг процесу денітрифікації контролювали шляхом вимірювання окисно-відновного потенціалу середовища (ОВП). Електроди поміщали в обидві камери. Показання знімали на рН-метрї. Окисно-відновний потенціал середовища вимірювали платиновим електродом, сполученим із  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ -електродом порівняння. Потенціал електрода порівняння складав  $265 \text{ мВ}$  і був врахований у розрахунках окисно-відновного потенціалу середовища. Електрод був відкалібрований із використанням розчину  $\text{K}^3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  і  $\text{K}^4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ .

Динаміку ОВП вільноплаваючими бактеріями визначали в колбах об'ємом  $100 \text{ см}^3$  при температурі  $30^\circ\text{C}$ . Посівний матеріал стерильно вносили в модельний розчин. Оптична густина отриманої суспензії складала  $0,01$  ( $\lambda = 540 \text{ нм}$ ). Водну поверхню заливали шаром вазелінового масла завтовшки  $1 \text{ см}$ . Денітрифікацію проводили в замкнутій системі культивування.

Для визначення концентрації нітритів використовували кількісний метод, що базується на diaзотуванні сульфанілової кислоти наявними у пробі нітритами і реакції отриманої солі з а-нафтиламіном з утворенням червоно-фіолетового азобарвника. Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації нітритів.

Концентрацію нітритів визначали фотоколориметрично по калібровочному графіку при довжині хвилі  $520 \text{ нм}$  в кюветі завтовшки  $3 \text{ см}$ .

### Результати та їх обговорення

Існують суперечливі думки про роль окисно-відновного потенціалу в функціонуванні біо-

логічних систем. Вважають, що цей фізичний показник є важливим для регуляції метаболізму бактерій [7]. З іншого боку, висловлюється думка про неможливість взагалі кількісно інтерпретувати вимірювання ОВП у середовищі, що містить мікроорганізми [8].

Для перебігу процесу денітрифікації необхідні не тільки відсутність кисню чи його незначна концентрація, але й досить низький потенціал середовища. При видаленні кисню кип'ятінням або заміною інертним газом не досягаються умови, необхідні для росту анаеробних бактерій [9], які можуть швидко знижувати ОВП середовища; їхня здатність до росту в середовищі залежить від фізіологічного стану та кількості інокулята (посівного матеріалу). Для факультативно-анаеробних бактерій необхідне зниження потенціалу до рівня, за якого вони починають використовувати окислені форми азоту як акцептори електронів.

Денітрифікуючі бактерії роду *Pseudomonas* характеризуються окислювальним метаболізмом і здатні використовувати змінно-валентні елементи, такі як окислені сполуки азоту, сірки, хрому та деяких інших, в ролі акцепторів електронів. У процесі росту та редукції цих елементів культури самі знижують ОВП культурального середовища і не потребують внесення додаткових відновників, що характерно для облигатно-анаеробних бактерій. Тому для проведення наших експериментів були вибрані денітрифікуючі бактерії роду *Pseudomonas*, що здатні відновлювати окислені форми азоту до елементного азоту, не забруднюючи навколишнього середовища.

Мембранний біореактор було створено нанесенням плівок з альгінату кальцію або агар-агару з іммобілізованою в них культурою денітрифікуючих бактерій на робочу сторону ультрафільтраційної або мікрофільтраційної полімерної мембрани. Отриману мембрану поміщали в діалізну комірку. З робочого активного боку мембрани знаходився модельний розчин, а з дифузійного — чистий розчинник — дистильована вода. За рахунок різниці концентрацій нітритів обабіч мембрани через неї виникає дифузійний потік, що постійно підводить субстрат до біокатализатора. Швидкість підведення залежить від швидкості дифузії через мембрану і визначається проникністю мембрани. Тому іммобілізацію проводили на двох типах мембран УАМ-100 і МФА-МА 4 з різним діаметром пор. Для контролю перебігу процесу денітрифікації вимірювали окисно-відновний потенціал (ОВП) по обидва боки мембрани.

Як видно з рисі, кожна культура мікроорганізмів характеризується певним потенціалом,

до якого вона може знижувати ОВП середовища. Так *P. aeruginosa*, що характеризується найбільшою швидкістю окислення глюкози, має здатність найшвидше знижувати ОВП середовища, а відтак і вести процес денітрифікації. Вона характеризується нетривалим індукційним періодом і різким зниженням ОВП від 400 до -300 мВ за досить короткий період. Процес повністю закінчується через 30 годин культивування. Інтенсивне газоутворення спостерігається, починаючи з потенціалу середовища близько 0 мВ. Культура *P. aurantiaca* має здатність найдуже знижувати потенціал середовища. Вона також має нетривалий індукційний період, але веде процес трохи повільніше, ніж *P. aeruginosa*. Культура

*P. fluoro-violaceus* може знижувати окисно-відновний потенціал лише до -200 мВ та процес газоутворення у неї починається при ОВП близько 70 мВ. Найтривалішим індукційним періодом (30 год.) і повільним веденням процесу характеризується культура *P. mendocina*. Для подальших експериментів ми використовували культуру *P. aeruginosa*.

Як видно з рис. 2, різке зниження концентрації нітритів починається зі значення редокс-потенціалу 280 мВ. При його значенні нижчому -30 мВ відбувається відновлення слідових концентрацій нітритів, яке закінчується при -300 ÷ -320 мВ. Крива зміни редокс-потенціалу в процесі денітрифікації нагадує криву росту біо-

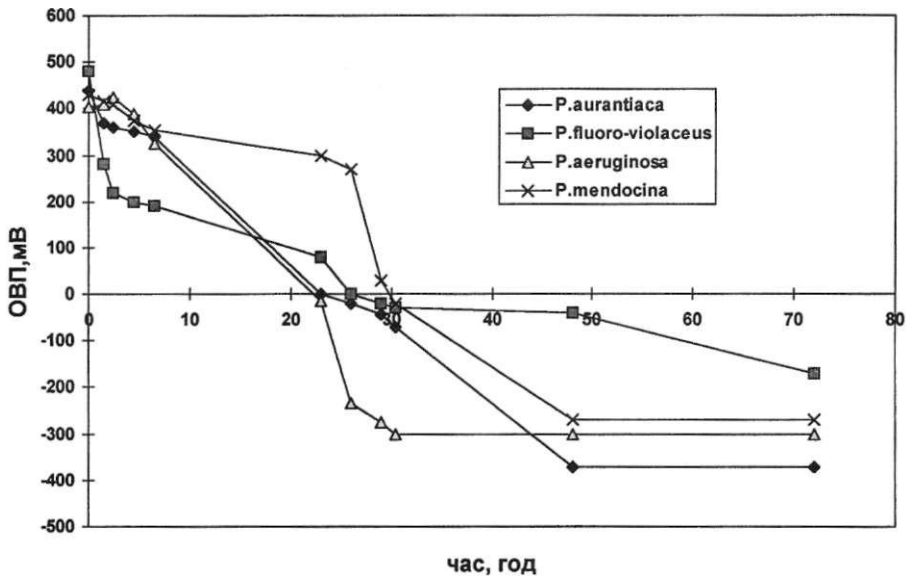


Рис. 1. Зміна окисно-відновного потенціалу в процесі денітрифікації культурами мікроорганізмів

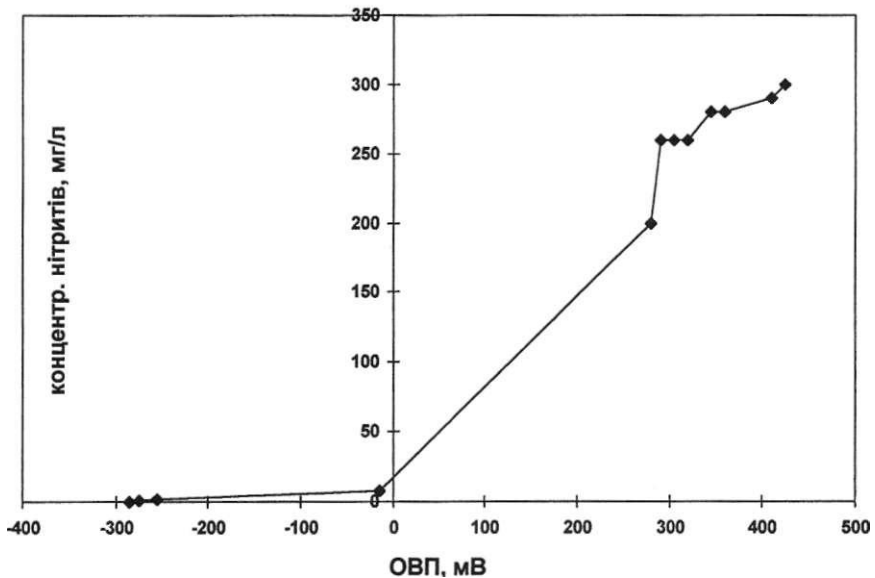


Рис. 2. Зміна концентрації нітритів в процесі денітрифікації

маси у звичайних умовах і характеризується трьома періодами:

I — індукційний період. У цій фазі йдуть два рівнобіжних процеси: аеробне і анаеробне дихання. Час проходження цього періоду складає близько 15 годин.

II — експоненціальна фаза — істинний процес денітрифікації. Відбувається різке зниження концентрації нітритів та ОВП середовища за досить короткий період (4–5 годин).

III — стаціонарна фаза (крива виходить на плато). Процес росту культури уповільнюється,

відбувається зниження слідових концентрації нітритів, що свідчить про закінчення процесу, при цьому редокс-потенціал залишається постійним.

Як видно з рис. 3, а, б, криві зміни редокс-потенціалу для іммобілізованої в альгінатній (рис. 3, а) і агаровій (рис. 3, б) плівках культури подібні до кривої для культури у вільному стані. Значення редокс-потенціалу для розчину і розчинника (тобто з активного (робочого) і дифузійного боку мембрани) в процесі денітрифікації мало відрізняються один від одного. Помітне відхилення спостерігається в період логари-

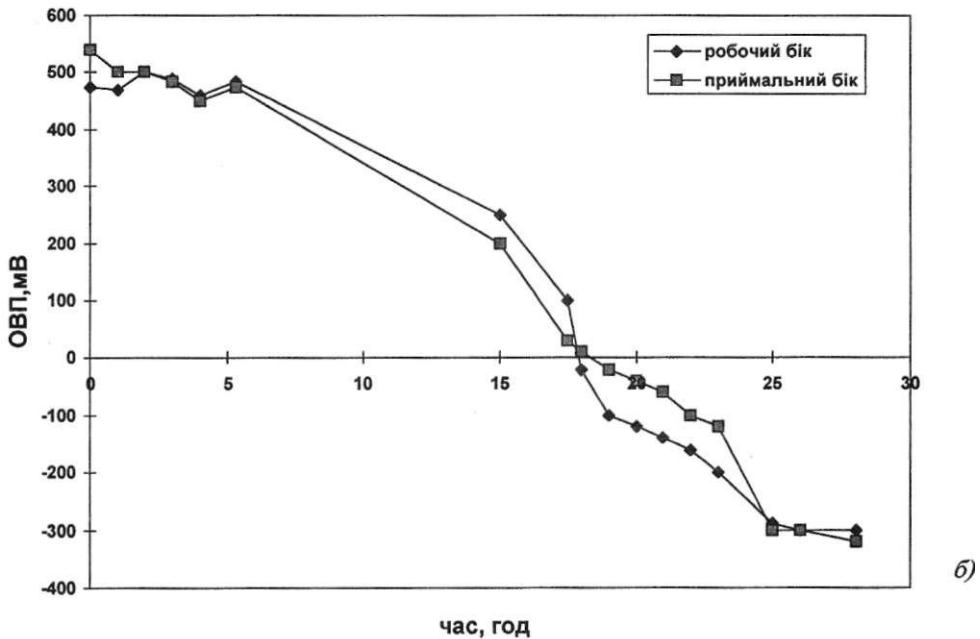
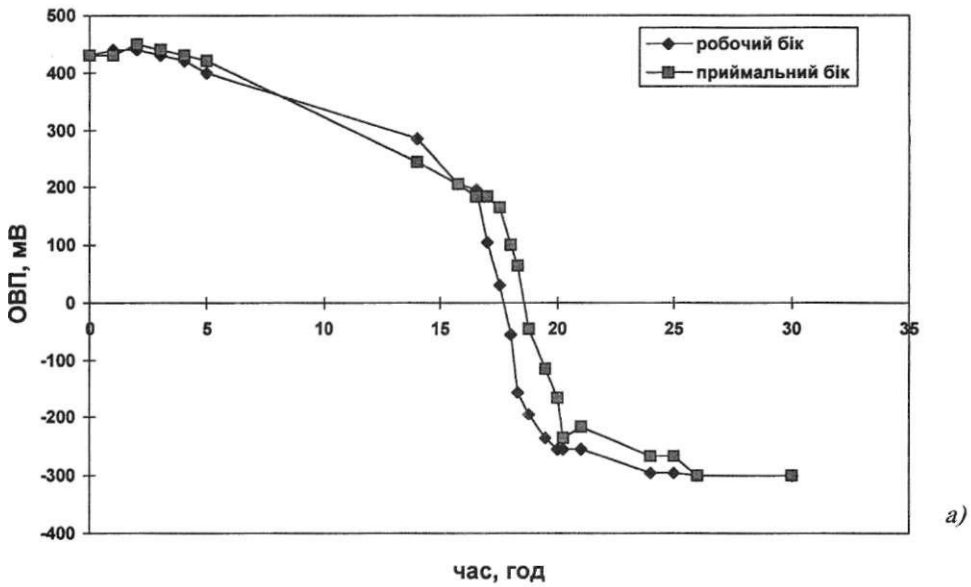


Рис. 3. Зміна окисно-відновного потенціалу іммобілізованою культурою *P. aeruginosa* при денітрифікації в мембранному біореакторі (мембрана МФА-МА 4):

- а) культура, іммобілізована в плівку з альгінату кальцію;
- б) культура, іммобілізована в плівку з агар-агару

фмічної фази для культури, іммобілізованої в альгінатній плівці, при цьому найбільша різниця потенціалів між робочою і приймальною стороною мембрани становить 200 мВ. У стаціонарній фазі криві знову сходяться. Такий хід кривих можна пояснити високою проникністю мікрофільтраційної мембрани. У цьому випадку процес встановлення дифузійної рівноваги відбувається досить швидко і тому спостерігаються незначні відхилення значень окисно-відновного потенціалу з обох боків мембрани. Різницю потенціалів між дифузійною та активною стороною мембрани для культури, іммобілізо-

ваної в альгінатній плівці, можна пояснити більшою щільністю альгінатної плівки порівняно з плівкою з агар-агару.

На відміну від дослідів з мембраною МФА-МА 4 значення редокс-потенціалу для активної і дифузійної сторони ультрафільтраційної мембрани УАМ-100 в експоненціальній фазі значно відрізняються за величиною ОВП біля 300 мВ для культури, іммобілізованої в альгінатній плівці (рис. 4, а), і біля 400 мВ — для агар-агару (рис. 4, б). Це явище можна пояснити тим, що мембрана УАМ-100 виявляє частково затримуючі властивості стосовно нітритів [11].

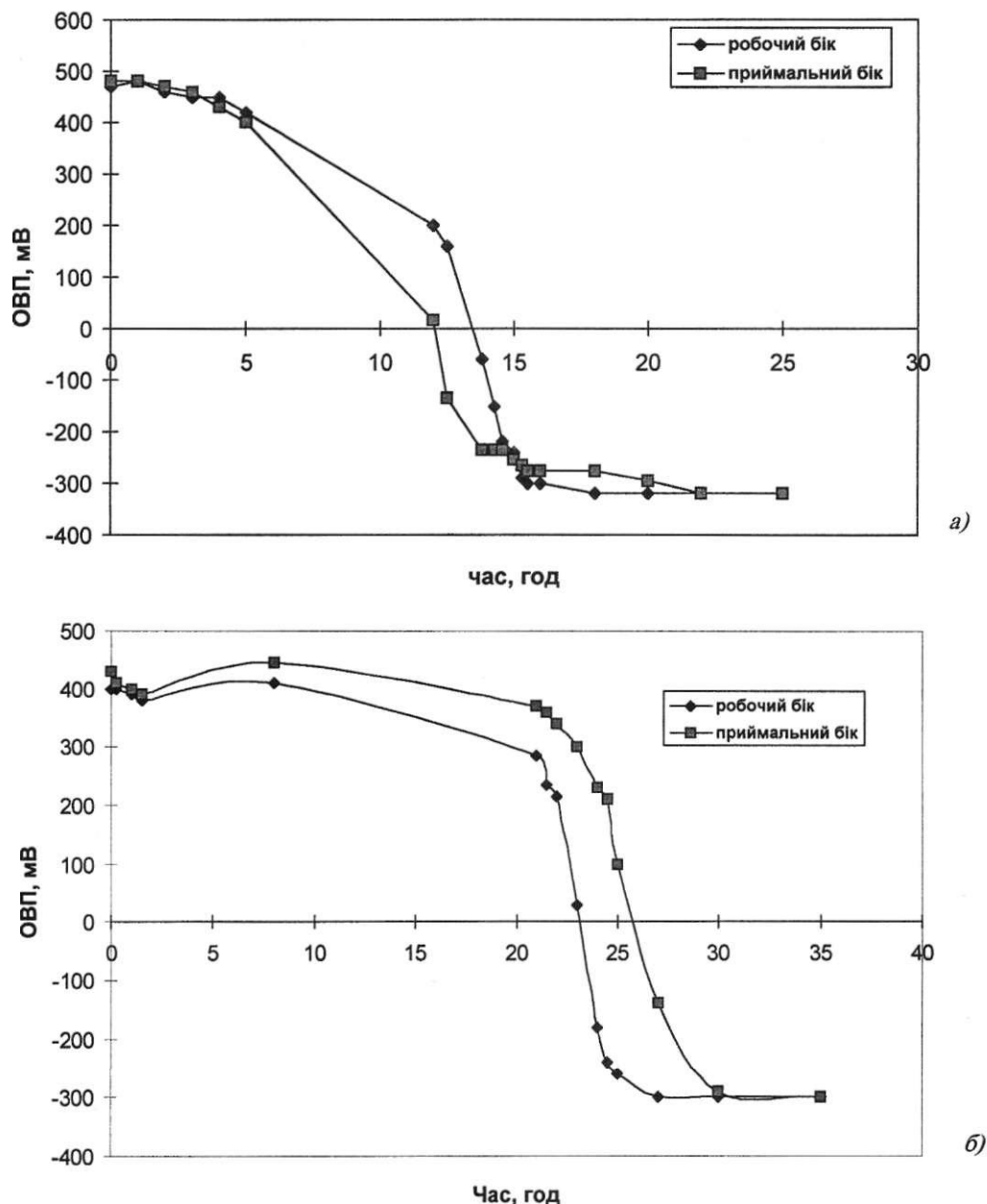


Рис. 4. Зміна окисно-відновного потенціалу іммобілізованою культурою *P. aeruginosa* при денітрифікації в мембранному біореакторі (мембрана УАМ-100):

а) культура, іммобілізована в плівці з альгінату кальцію;

б) культура, іммобілізована в плівці з агар-агару

Такий перебіг процесу найбільш прийнятний, оскільки при використанні такої мембрани в проточній системі можна очікувати значного зменшення забруднення пермеата нітритами, а також органічним субстратом.

### Висновок

Розроблено спосіб одержання біокаталітичних мембран шляхом нанесення плівок з альгінату кальцію та агар-агару з іммобілізованою в них культурою мікроорганізмів на промислові ультрафільтраційні та мікрофільтраційні мембрани. Плівки характеризуються еластичністю та інертністю і не впливають на властивості мембрани.

Показана можливість використання таких біокаталітичних мембран в процесі денітрифікації води в діалізному режимі. Показано, що в такому режимі процес слід проводити на ультрафільтраційних мембранах з малим розміром

пор, що проявляють затримуючі властивості по відношенню до нітритів та нітратів. Діалізний режим також дає змогу постійного підведення субстрату до культури денітрифікуючих бактерій із-за дифузійного потоку через мембрану, що виникає за рахунок різниці концентрації по обидва боки мембрани і забезпечує повне видалення нітритів. Так, у всіх випадках роботи біореактора концентрація нітритів знижувалась від 500 мг/л до 0 протягом 25–30 годин культивування.

Розроблено метод контролю перебігу процесу денітрифікації вимірюванням окисно-відновного потенціалу культурального середовища. Кожна культура денітрифікуючих бактерій має певний інтервал ОВП, в якому відбувається процес денітрифікації. Так, для культури *P. aeruginosa* газоутворення починається з потенціалу 150–180 мВ і закінчується при  $-300 \pm -320$  мВ, при цьому концентрація нітритів не перевищує гранично-допустимого значення — 0,1 мг/л.

1. Запольський А. К., Клименко Н. А., Астрелін І. М., Брик М. Т., Гвоздяк П. І., Князькова Т. В. Фізико-хімічні основи очистки стічних вод.— К.: Лібра, 2000.— 552 с.

2. Дмитренко Г. Н., Гвоздяк П. И. Факультативный и облигатный анаэробиз в биологической очистке воды // Химия и технология воды.— 1997.— 19, № 3.— С. 325–330.

3. Barreiros A. V., Rodrigues C. M., Grespo J. P., Reis M. A. Membrane bioreactor for water denitrification // Bioprocess Engineering.— 1998.— 18.— P. 297–302.

4. Chang J., Manem J., Veabubien A. Membrane bioprocess for denitrification of drinking water supplies // J. Memb. Sei.— 1992.— 80.— P. 233–239.

5. Вудворд Дж. Иммобилизованные клетки и ферменты.— М.: Мир, 1988.— 215 с.

6. Методы генной инженерии.— М.: Мир, 1987.—152 с.

7. Работнова И. Л. Роль физико-химических условий в жизнедеятельности микроорганизмов.— М.: Наука, 1957.— 275 с.

8. Mosey F. Redox potentials in waste water treatment // Chem. Eng.— 1985,— 14.— P. 21–24.

9. Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхарда.— М.: Мир, 1983.—681с.

10. Tsapiuk E. A., Bryk M. T. An interpretation of the separation of low and high molecular weight solutes by ultrafiltration//J. Memb. Sei.— 1993,—79.—P. 227–240.

*Konovalova V. V., Bryk M. T., Dmitrenko G M.,  
Gvozdyak P. I., Nigmatullin R. R.*

## DENITRIFICATION IN MEMBRANE BIOREACTOR WITH IMMOBILIZED BACTERIAL CELLS

The method of formation of biocatalytic membrane with denitrifying bacteria was developed. The cells were immobilised into alginate and agar-agar films which were formed on commerce ultrafiltration membranes. It was shown that denitrification in dialyse regime carries out effectively when ultrafiltration membranes with a little pore size were used. The possibility of denitrification process control by measurement of redox-potential was shown. *Pseudomonas aeuroginosa* strain reduces of nitrite with maximal velocity. The redox-potential is reduced from 400 to  $-300$  mV during 30 hours of cultivation. The concentration of nitrites in membrane bioreactor decreases from 500 mg/l to zero.