



УКРАЇНА

UA,,,, 13373

ом

C1

&lt;si&gt;sC02 Г 3/34

ДЕРЖАВНЕ  
ПАТЕНТНЕ  
ВІДОМСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ  
НА ВІНАХІД

(54) КОНСОРЦІУМ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ AZOTOBACTER VINELANDII Mg ГА ARTHROBACTER sp. P. ДЛЯ ОЧИСТКИ СТИЧНИХ ВОД ВІД ЕТИЛЕНГЛІКОЛЮ ТА ДІЕТАНОЛАМІНУ

1

(20)95320757, 17.09.93

(21) 4886641/SU

(22)29.11.90

(24)28.02.97

(46)28.02.97. Бюл. NM

(56) 1. Авторское свидетельство СССР  
інк 1336454, кл. С 02 F 3/34, 1986, не публ.2. Авторское свидетельство СССР  
N? 1269439. кл. С 02 F 3/34, 1983, не публ.3. Авторское свидетельство СССР  
№ 1430366, кл. С 02 F 3/34, 1988 (прототип).(72) Морілевич Наталія ФедосГівнз, Гвоздяк  
Петро Іллїч, Романова Катерина Олек  
сандрівна, Цимберг Марк Беньямінович (RU),  
Ненашева Маріна Нафхатовна (RU)(73) Інститут колоїдної хімії та хімії води  
Ім. А.В.Думанського АН України (UA)(57) Консорціум штаммов бактерій  
Azotobacter vinelandii Mg ВКПМ В-4213 і  
Arthrobacter sp, P. ВКПМ -959. використовує-  
мий для очистки сточних вод від етиленгли-  
коля і діетаноламіна.

Изобретение относится к биотехнологии, а именно к области биологической очистки промышленных сточных вод, и может быть использовано на предприятиях газовой промышленности, преимущественно на заводах по переработке сероводородсодержащего природного газа.

Согласно известному способу биологической очистки с помощью микроорганизмов р.Arthrobacter, очищают сточные воды, содержащие 2000 мг/дм<sup>3</sup> этиленгликоля [1]. Степень очистки при этом составляет 92,5%, продолжительность времени очистки 48 ч.

Смесь микроорганизмов р.Pseudomonas и р.Bacillus в оптимальном соотношении со сточной водой (1:8000-30000) в непрерывном режиме культивирования утилизирует диэтанолламин (1000 мг/дм<sup>3</sup>) на 89-92,5% [2].

Известны способы биологической очистки сточных вод от диэтанолламина с помощью микроорганизмов родов Pseudomonas и Bacillus и от этиленгликоля - с использованием бактерии р. Arthrobacter пригодны для очистки вод, содержащих монозагрязнитель, соответственно, диэтанс-

ламин или этиленгликоль. При наличии в воде обоих загрязнителей степень очистки предложенными микроорганизмами существенно снижается, время очистки увеличивается. Наиболее близким к заявляемому способу по технической сущности и достигаемому результату является способ очистки сточных вод от этиленгликоля микроорганизмами р.Arthrobacter, предусматривающий дополнительное внесение микроорганизмов р.Pseudomonas и соокислителя диэтанолламина. При этом необходимо придерживаться следующего соотношения загрязнителей в воде-ДЭА и ЭГ=1:(4-5)[3].

Микроорганизмы вносят в среду, обеспечивая плотность посева  $10^8$ - $10^9$  кл/мл, при соотношении культур, соответствующем соотношению загрязнителей, т.е. если ДЭА:ЭГ=1:(4-5), то Pseudomonas:Arthrobacter= 1:5.

Применение сообщества микроорганизмов из р. Ps-eudomonas и р.Arthrobacter эффективно в строго ограниченном диапазоне содержания загрязнителей, а именно при соотношении ДЭА:ЭГ=1:(4-5). т.е. при концентрации ЭГ-2000 и ДЭА-350-550 мг/л. За

C &gt;

∞ ∞

CO

O

пределами указанного соотношения степень очистки воды используемыми микроорганизмами снижается; следовательно применение этого сообщества микроорганизмов при очистке сточной воды с содержанием загрязнителей, выходящим за указанные пределы, невозможно.

Задачей изобретения является получение консорциума штаммов бактерий, обладающего более высокой деструктивной активностью по отношению к этиленгликолю и диэтаноламину, и использование его при микробной очистке промышленных сточных вод, соотношение загрязнителей о которых не регламентировано.

Для решения поставленной задачи предложен консорциум штаммов бактерий *Azotobacter vinelandii* Mg и *Arthrobacter* sp. P., обеспечивающий глубокую (на 99,0%) очистку сточных вод от ЭГ и ДЭА в концентрации 500-2000 мг/л каждого загрязнителя; При этом соотношение загрязнителей в воде может быть в достаточно широком диапазоне (0,1-4,9-4,9-0,1), а степень очистки составляет 99,3-99,6%.

Штаммы бактерий-деструкторов выделены из накопительной культуры, полученной методом проточного культивирования активного ила очистных сооружений газоперерабатывающего завода и болтушки из почвы, длительное время контактировавшей с этими ксенобиотиками в среде, содержащей постепенно возрастающие концентрации субстратов.

Выделение консорциума штаммов - деструкторов ЭГ и ДЭА осуществляют на плотной синтетической среде, содержащей в г/дм<sup>3</sup> дистиллированной воды: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 3H<sub>2</sub>O - 0,4; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0,3; NH<sub>4</sub>Cl - 0,15; NaCl - 0,05; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O - 0,1; CaCO<sub>3</sub> - 0,02; FeSO<sub>4</sub> - следы, ЭГ или ДЭА - 1, pH 8,0. Для этого из проточного культиватора, в котором при подаче среды, содержащей 2,0 г/дм ЭГ и ДЭА в соотношении 1:1, со скоростью разбавления 0,09 ч<sup>-1</sup> идет очистка до следовых концентраций загрязнителей, отбирают накопительную культуру и после предварительного разведения высевают на синтетические среды приведенного состава. Температура культивирования 30°C. Выросшие отдельные колонии деструкторов многократно (6-7 раз) пересевают на плотной синтетической среде, изучают деструктивную активность, проверяют чистоту выделенных штаммов и идентифицируют.

Штаммы хранят на плотной синтетической среде или на МПА под слоем вазелинового масла; пересевают 1-2 раза в год, можно хранить также апиофильно высушенном состоянии.

Концентрацию ЭГ в среде определяют фотоколориметрическим способом<sup>^</sup> (с реактивом Шиффа), ДЭА - методом газожидкостной хроматографии.

- 5 Выделенные штаммы бактерий депонированы во Всесоюзной коллекции промышленных микроорганизмов, где им присвоены номера ВКПМ В-4213 для *Azotobacter vinelandii* Мди ВКПМ S-959 для *Arthrobacter* sp. P.

- 10 Консорциум штаммов бактерий, взятых в количестве, %

*Azotobacter vinelandii* Mg 3-97

*Arthrobacter* sp. P. 3-97

- 15 использует смесь этиленгликоля и диэтаноламина в качестве единственного источника углерода при их концентрации 0 сточной йоде 2-5 г/дм<sup>3</sup> каждого.

- 20 Характеристика штамма *Azotobacter vinelandii* Mg/ВКПМ В-4213.

- Морфолого-культуральные признаки. Клетки, окрашенные фуксином, метиленовой синью или по Граму, имеют палочковидную форму с обрубленными тупыми концами, размером 0,6-0,8x1,7 мкм, иногда почти кубики (кокки) с плохо окрашиваемым центром. Грамотрицательные. 16-часовая культура неподвижна. Подвижна в очень молодом возрасте (4 ч) - перитрих. Эндоспор нет. Образуется толстоствольные чисты. Капсульная форма. В препарате с тушью - клетки крупные, овальные, размещаются чаще парами.

- Рост на МПА: круглые с ровным краем, выпуклые, гладкие колонии, по консистенции однородные, непрозрачные, белые, целиком колония легко снимается с поверхности агара, иногда образует слизистые тяжи при отделении части колонии.

- 40 В МПБ образует гомогенную муть. При взбалтывании жидкой среды видны более плотные, опалесцирующие тяжи.

- Физиолого-биохимические признаки. Штамм оксидазо- и каталазоположительный. На обычных средах и на среде с сахарозой образует внеклеточную слизь.

- Способен фиксировать молекулярный азот (6 пассажей на 2% глюкозной агаре Difco). Штамм синтезирует водорастворимый

- 50 пигмент, дающий в УФ-лучах зеленую флуоресценцию. Оптимум температуры выращивания - 30-32°C. Растет при 25 и 41°C. Образуется NNs и уреазу. Протеолитическими свойствами не обладает, Глюкозу в среде Хью-Лейфсона не ферментирует. Активный денитрификатор.

Не растет в МПБ в присутствии NaCl, даже 2% NaCl ингибирует рост штамма.

Использует широкий набор углеводов (12) и спиртов (7). Среди них маннит и рам-

нозу. Крахмал не гидролизует. Реакция на желток положительна,

В периодических условиях выращивания разрушает 2 г/дм ЭГ в синтетической среде следующего состава, г/дм<sup>3</sup>: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> х 5 X3H<sub>2</sub>O-OAKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-0.3; NH<sub>4</sub>Cl-0,15; NaCl - 0,05; MgSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O - 0,1; CaCO<sub>3</sub> - 0,02; FeSO<sub>4</sub> - следы, pH 7,0-8,0.

В условиях проточного культивирования утилизирует ЭГ в концентрации 2-4% или 10 2-4% смесь ЭГ и ДЭА в соотношении 4:1 соответственно, со скоростью разбавления 0,04 ч<sup>-1</sup>. Непатогенен.

Характеристика штамма *Arthrobacter* sp. P. BKnMS-959. 15

Морфолого-культуральные признаки. Плеоморфные палочковидные клетки, превращающиеся в старой культуре в кокковидные. Молодые, активно растущие клетки образуют характерные сочетания в виде "ки- 20 тайских букв". Часть палочек располагается под углом друг к другу, образуя У-образные фигуры. В 5-7-суточной культуре встречаются крупные кокковидные клетки, превышающие размер остальных в 2-3 раза. 25 Неподвижны. Во всех циклах развития окрашиваются по Граму положительно.

В МПА 1-суточные культуры имеют колонии круглые, непрозрачные, матовые, гладкие, слегка отдающие желтизной. По мере 30 старения культуры край у колонии становится фестончатым, колония приобретает ярко желтую окраску, становится складчатой с выпуклым гладким центром. На МПА с 7% глицерина штамм образует нитевидные клет- 35 (си, которые по мере старения культуры меняют форму клеток, превращаясь в кокки.

В МПБ штамм образует гомогенную взвесь клеток.

Физиолого-биохимические признаки. 40 Штамм каталазо- и оксидазоположителен. Неподвижен. Оптимальная температура выращивания 28-30°C. Обладает слабой уреазной активностью. При окислении глюкозы, инозита, маннозы, раффинозы, 45 ксилозы образует кислоту.

Строгий аэроб. Конечным акцептором электронов служит кислород. Нитраты не восстанавливает, лакмусовую синь не обесцвечивает. 50

Не вызывает гидролиз крахмала, не разлагает казеин, не разжижает желатин.

При усвоении глицина, ацетата, Z-орнитина, цитрата, α-кетоглутаровой кислоты образует щелочь. Валин не использует. Растет 55 на тиамине без подщелачивания.

Разрушает в условиях периодического культивирования 1 г/дм<sup>3</sup> ДЭА в синтетической среде следующего состава, г/дм<sup>3</sup>:

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 3H<sub>2</sub>O - 0,4; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0,3; Nad - 0,05; NH<sub>4</sub>Cl - 0,15; MgSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O - 0,1; CaCO<sub>3</sub> - 0.02; FeSO<sub>4</sub>\* - следы, pH 7,0-8,0. В условиях непрерывного культивирования утилизирует ДЭА в концентрациях 2-4% или усваивает его из 2-4% смеси ЭГ и ДЭА в соотношении 4:1, соответственно, со скоростью разбавления 0.05 ч<sup>-1</sup>. Штамм непатогенен.

Пример 1. Изучали деструктивные свойства культур при периодическом выращивании в колбах Эрленмейера емкостью 250 мл, содержащих 100 мл синтетической среды. Минеральный фон сред состоял, г/дм<sup>3</sup>: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0,4; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0,3; NH<sub>4</sub>Cl - 0,15; NaCl-0,05; MgSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O-0.1; CaCO<sub>3</sub>-0,02; FeSO<sub>4</sub> - следы. pH 8.0. Органической составной являлся этиленгликоль в концентрации 2 г/дм<sup>3</sup> или диэтаноламин - 1 г/дм<sup>3</sup>, pH сред устанавливали после внесения органических веществ.

В опытах использовали 16-20 часовые культуры *Azotobacter vinelandii* Mg и *Arthrobacter* sp. P., предварительно выращенные на агаризованных средах приведенного состава. Жидкие среды засеивали соответствующими деструкторами из расчета 10<sup>7</sup> кл/см<sup>3</sup>. Культивирование осуществляли при температуре 28°C на качалке (130 об/мин). Периодически через 6-12 ч проводили анализ на содержание в среде ксенобиотика.

Через 20 ч выращивания *Arthrobacter* sp. P. усваивал на 98% ДЭА из среды, содержащей 1 г/дм ксенобиотика. *Az. vinelandii* Mg утилизирует на 99% ЭГ из среды, содержащей 2 г/дм загрязнителя. Внесение в среду выращивания ксенобиотика, по отношению к которому микроорганизм загрязнителя в 1,5-2 раза и несколько снижает (на 3-8%) степень очистки. Однако уровень очистки от основного ксенобиотика остается достаточно высоким: 90,5% от ДЭА и 96.0% - от ЭГ. По истечении периода выращивания микроорганизмов установлено, что параллельно с усвоением основного ксенобиотика идет утилизация дополнительно внесенного соединения. Однако степень усвоения, например ЭГ деструктором ДЭА - *Arthrobacter* sp. P. низкая - 21,5%. Всего на 15,5% утилизируется ДЭА деструктором ЭГ - *Azotobacter vinelandii* Mg.

Деструктивные свойства консорциума, содержащего разное количество *Azotobacter vinelandii* Mg и *Arthrobacter* sp. P. изучали в периодических условиях выращивания на среде, содержащей одновременно ЭГ и ДЭА в концентрации 1 г/дм<sup>3</sup> каждого. Самая глубокая степень усвоения обоих ксенобиоти-

гов (табл 1) отмечается при использовании консорциума, состоящего на 50% из *Azotobacter vinelandii* Mg и на 50% из *Arthrobacter* sp. P.

Предложенный консорциум отличается от известного прежде всего тем, что в качестве деструктора ЭГ используется *Azotobacter vinelandii* Mg, который по активности разрушения ксенобиотика превосходит микроорганизмы р *Arthrobacter*, используемые в прототипе.

В качестве второго микроорганизма заявляемого консорциума используется *Arthrobacter* sp. P. Этот микроорганизм работает по другому назначению, чем в известном способе: в заявляемом консорциуме он выступает в качестве деструктора ДЭА, а в известном способе микроорганизмы р *Arthrobacter* являются деструкторами ЭГ. Степень утилизации ДЭА заявляемым *Arthrobacter* sp. P. также превышает таковую микроорганизмами р *Pseudomonas* рассматриваемую в прототипе.

**Пример 2.** Исследования по использованию консорциума для очистки модельных сточных вод от ЭГ и ДЭА в условиях непрерывного культивирования проводили в установке емкостью 1 дм, содержащей 300 мл синтетической среды. Установка снабжена эрлифтной системой аэрации для перемешивания и обеспечения среды кислородом. В среду выращивания вносили смесь микроорганизмов - деструкторов ЭГ и ДЭА в разных соотношениях с исходной плотностью бактериального засева 10 ил/см<sup>3</sup>.

Затем с помощью перистальтического насоса НГММ подавали в систему среду, содержащую ЭГ и ДЭА в разных концентрациях, со скоростью разбавления 0,04 ч<sup>-1</sup>.

После стабильной работы установки в течение 2-х суток (при постоянном Д. d и рН) на определенном составе модельной сточной воды определяли остаточную концентрацию ксенобиотиков на выходе из установки.

Установлено, что соотношение культур к консорциуме, который обеспечивает высокую степень очистки сточной воды, зависит от состава поступающей на очистку воды

5 (табл.2). Если очистке подвергается вода, в которой есть дополнительный источник азота в аммонийной форме, то соотношение деструкторов в консорциуме пропорционально процентному содержанию загрязнителей. Например, при содержании в очищаемой воде 80% ЭГ и 20% ДЭА 97-98%-ную очистку обеспечивает консорциум, состоящий на 80% из *Azotobacter vinelandii* Mg и на 20% из *Arthrobacter* sp. P. (табл.2, пример 4).

15 Если же в качестве источника азота выступает сам загрязнитель - диэтиламин, то для обеспечения высокой степени очистки необходимо использовать консорциум, в котором 70-80% клеток составляют деструкторы ДЭА - *Arthrobacter* sp. P. и 30-70% - деструктор ЭГ - *Azotobacter vinelandii* Mg (табл. 2, примеры 6-8). Для разрушения ДЭА (даже если он составляет всего 1/5 часть 20 общих загрязнений в воде) требуется в 2-2.5 раза большая исходная биомасса деструктора - *Arthrobacter* sp. P., чем биомасса второго микроорганизма - *Azotobacter vinelandii* Mg. Еще более четко эта зависимость прояв-

25 30 35 ляется, если в воде преобладает ДЭА. Следует особо подчеркнуть, что правильно выбранное соотношение культур в консорциуме существенно сокращает период вывода очистного сооружения в оптимальный режим работы

Таким образом, предложенный консорциум позволяет очистить сточную воду газоперерабатывающих предприятий, содержащую в качестве загрязнителей ЭГ и ДЭА. Консорциум обладает стабильностью сосуществования бактериальных штаммов-деструкторов, устойчивым ростом и более высокой скоростью разрушения ксенобиотиков.

45 ~

Таблица 1

Штамм микроорганизмов	Соотношение штаммов, %	Степень утилизации ксенобиотика, %		разрушения
		ЭГ	ДЭА	
<i>Az. vinelandii</i> Mg	20	88,5	99,0	24
<i>Arthrobacter</i> «р.р.	60			
<i>Az. vinelandii</i> Mg	50	98,6	97,5	20
<i>Arthrobacter</i> sp.P.	50			

Продолжение табл. 1

Штамм микроорганизмов	Соотношение штаммов, %	Степень утилизации ксенобиотика, %		Время разрушения
		ЭГ	ДЭА	
Az. vlnelandii Mg Arthrobactersp.P.	80 20	99.2	56,5	24

Таблица 2

п/п	Концентрация субстрата, мг/дм <sup>3</sup>		Дополнительный источник азота	Соотношение культур консорциума, %		Степень очистки сточной воды, %	
	ЭГ	ДЭА		Az.vln.Mg.	Arthr.sp.	ЭГ	ДЭА
1	2000	500	NH <sub>4</sub>	10	90	36.9	100
2	2000	500		30	70	73.5	100
3	2000	500		50	50	88,2	97,2
4	2000	500		80	20	99,2	97.2
5	2000	500	-	10	90	78,5	100
6	2000	500	-	30	70	98.9	99,1
7	2000	500	-	50	50	98.9	97,0
8	2000	500	-	70	30	" 98,7	89,0
9	2000	500		90	10	99.1	71,0
10	500	2000	-	10	90	99,0	99,0
11	500	2000	-	20	80	99,2	97.8
12	500	2000	-	30	70	99.6	90,0
13	500	2000	-	50	50	99,7	59,7

Упорядник

Техред М.Моргентал

■ Коректор Л. Лукач

Замовлення 4112

Тираж  
Державне патентне відомство України,  
254655. ГСП. КиТв-53, Львівська пл., 8

Підписне

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул.Гагаріна, 101

