



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 54028

(13) A

(51) 7 C02F3/30

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ АЕРОБНИХ БАКТЕРІЙ ТА СПОСІБ ОЧИСТКИ ВОДИ

1

2

(21) 2002043328

(22) 22 04 2002

(24) 17 02 2003

(46) 17 02 2003, Бюл. № 2, 2003 р.

(72) Дмитренко Галина Миколаївна, Коновалова
Вікторія Валеріївна, Шум Оксана Анатоліївна(73) ІНСТИТУТ КОЛОЇДНОЇ ХІМІЇ ТА ХІМІЇ ВОДИ
ІМ. А. В. ДУМАНСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕ-
МІЇ НАУК УКРАЇНИ(57) 1 Спосіб культивування аеробних бактерій в
анаеробних умовах, який включає вирощування
бактерій в живильному середовищі, який відріз-
няється тим, що анаеробні умови створюють на-
несенням на живильне середовище шару рідкихнасичених вуглеводнів і культивування здійснюють
в присутності іонів змінновалентних елементів2 Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що як іон
змінновалентного елемента використовують шес-
тивалентний хром або чотиривалентний марга-
нець3 Спосіб очищення води від важкоокислювальних
органічних сполук, що включає обробку води ае-
робними бактеріями, який відрізняється тим, що
як бактерії використовують бактерії, які культиву-
ють по п. 1, і очищення здійснюють в анаеробних
умовах в присутності іонів змінновалентних еле-
ментів

Винахід відноситься до області обробки води,
а саме, до біологічного очищення стічних вод і
може бути використаний для культивування аеро-
бних бактерій, що використовуються для очищен-
ня води

Відомий спосіб культивування аеробних бак-
терій, здатних до анаеробного дихання, які вико-
ристовують шестивалентний хром, редукуючи його
до тривалентного (Гвоздяк Н. И., Могилович Н. Ф.,
Рыльский А. Ф., Грищенко Н. И. Восстановление
шестивалентного хрома коллекционными штам-
мами бактерий // Микробиология - 1986 - Т. 55,
№ 6 - С. 962 - 965) [1]

Суть способу. Штам аеробної бактерії (*E. coli*)
культивують в анаеробних умовах в колбах Ерлен-
мейера об'ємом 250 мл з 50 мл поживного сере-
довища під гумовими пробками. Середовище
культивування містить 10 - 30 мг/дм³ хрому (VI) та
глюкозу як джерело живлення. Для видалення
кисню систему продувають аргонном. Мікрооргані-
зми вирощують в аеробних умовах в м'ясо-
пептонному бульйоні. Нарощену біомасу бактерій
вносять в середовище культивування. В процесі
культивування бактерій відбувається повне вида-
лення з води шестивалентного хрому.

Як правило, до складу хромовмісних стічних
вод входять важкоокислювані органічні сполуки.
Як показали наші дослідження, *E. coli* не реалізує
процес відновлення хрому і видалення з води важ-

коокислюваної органіки, наприклад, фенолу.

Крім того, спосіб досить складний в реалізації,
потребує спеціального обладнання, а також при
проведенні додаткових досліджень подачу аргону
необхідно проводити безперервно протягом всьо-
го періоду культивування.

Найбільш близькими до винаходу за технічною
суттю та результатом, що досягається, є спосіб
культивування аеробних бактерій в аеробно-
анаеробних умовах та спосіб очищення води
(Chirwa E. M., Wang Y.-T. Simultaneous chromium (VI)
reduction and phenol degradation in a fixed-film
coculture bioreactor. Water Res. - 2001 - 35, N 8 -
P. 1921 - 1932) [2].

Спосіб реалізується таким чином. Бінарну
культуру, що складається з *E. coli* та *P. putida*,
культивують у середовищі з фенолом у концент-
рації 300 мг/дм³ і хромом з концентрацією 30 мг/дм³.
На першому етапі проводять культивування в ае-
робних умовах. Середовище культивування аеру-
ють повтрян для нарощування біомаси аеробного
штаму *P. putida*, яка є деструктором фенолу, кон-
центрацію якого в середовищі періодично контро-
люють. Після повного видалення фенолу з води
аерацію припиняють, за рахунок чого створюються
анаеробні умови для культивування *E. coli*. Анае-
робно-дихаючий штам *E. coli* в анаеробних умовах
використовує шестивалентний хром як терміналь-
ний акцептор електронів та відновлює його до

(13) A

(11) 54028

(19) UA

трьохвалентного, який є нерозчинним і тим самим видаляється з води відстоюванням. Повністю очистка від фенолу та хрому відбувається за 48 год культивування.

Недоліком даного способу є довготривалість процесу культивування і очищення, та значні енергетичні витрати, що обумовлені аерацією середовища.

В основу винаходу поставлена задача розробити спосіб культивування аеробних бактерій в анаеробних умовах, в якому використання нового прийому запобігання дифузії кисню в культивальне (поживне) середовище та використання нової природи окисника, забезпечило б спрощення, скорочення та здешевлення даного процесу.

Задачею винаходу є також розробка способу очистки води від важкоокислюваних органічних сполук аеробними бактеріями в анаеробних умовах, що дозволить прискорити процес при зменшених енергетичних витратах.

Для вирішення поставленої задачі запропоновано спосіб культивування аеробних бактерій в анаеробних умовах, що включає вирощування бактерій в поживному середовищі, в якому, згідно з винаходом, анаеробні умови створюють нанесенням шару рідких насичених вуглеводнів з довжиною вуглецевого ланцюга $C_{15}-C_{20}$ на поверхню середовища культивування і культивування здійснюють в присутності іонів змінновалентних елементів, причому як іон змінновалентного елементу використовують шестивалентний хром або чотиривалентний марганець.

Поставлена задача також вирішується способом очистки води від важкоокислюваних органічних сполук, в якому, згідно з винаходом, використовують аеробні бактерії, що культивують запропонованим способом і очистку здійснюють в анаеробних умовах в присутності іонів змінновалентних елементів.

Нами встановлено здатність obligatno - аеробних бактерій використовувати змінновалентні елементи як термінальні акцептори електронів, тобто дихати анаеробно. При цьому анаеробні умови створюються нанесенням шару насичених вуглеводнів з довжиною вуглецевого ланцюга $C_{15}-C_{20}$, які перешкоджають доступу кисню до бактеріальних клітин із зовнішнього середовища. Це дає можливість спростити процес культивування аеробних бактерій і проводити його без примусової аерації, що призводить до зниження енерговитрат. Цей результат є новим, неочікуваним, бо вважається, що obligatno-аеробні бактерії здатні використовувати тільки кисень (Bergey's manual of systematic bacteriology / Eds. Krieger N R, Holt Y G, London Williams and Wilkins - 1984 - V 1 - 1549p) [3]. Запропонований спосіб культивування аеробних бактерій в анаеробних умовах дозволяє розширити число видів аеробних бактерій, здатних проводити метаболічні процеси в анаеробних умовах в присутності змінновалентних елементів.

Спосіб культивування бактерій реалізується таким чином. В стерильне поживне середовище з глюкозою вводять змінновалентні елементи Cr(VI) або Mn(IV). Хром вводять у концентрації 5 - 30 мг/дм³, а марганець у вигляді нерозчинного оксиду MnO₂ в кількості 10 - 100 мг. Середовище

вносять в стерильні колби об'ємом 100 см³. Потім в культивальне середовище вносять біомасу штамів бактерій *Pseudomonas putida*, *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus megaterium* або *Micrococcus luteus* в кількості 200 - 300 мг/дм³ кожної. На поверхню культивальної рідини наносять шар насичених вуглеводнів з довжиною вуглецевого ланцюга $C_{15}-C_{20}$. Як вуглеводні використовують індивідуальні органічні речовини, наприклад, гептадекан, нонадекан, ейкозан, або їх суміш, наприклад, вазелінове масло (Общая органическая химия / под ред. Д.Б. Бартона, У.Д. Олпаса - М. Химия, 1981 - Т. 1 - 736с) [4]. Культивування здійснюють в термостаті при температурі 27 - 32°C. В процесі культивування в присутності розчинного Cr(VI) утворюється нерозчинний гідроксид тривалентного хрому, який випадає в осад. При наявності в розчині Mn(IV) у вигляді нерозчинного оксиду MnO₂ в процесі культивування утворюється розчинний Mn(II). Процес культивування припиняють після повного відновлення змінновалентних елементів. Початкову та поточну концентрацію Cr(VI) та Mn(II) визначають колориметрично (фотоелектроколориметр КФК-2).

Спосіб очистки води від важкоокислюваної органіки полягає в наступному. В циліндричну ємність (біореактор), об'ємом 1 м³, в нижню її частину, за допомогою перистальтичного насоса із швидкістю розведення 0,028 год⁻¹ (тобто час перебування води в біореакторі становить 36 год) подають стічну воду. Вода містить важкоокислювану органіку, наприклад фенол, та змінновалентні елементи Cr(VI) або Mn(IV) у масовому співвідношенні 3:1, відповідно. В біореакторі розміщують волокнисту насадку з іммобілізованою біомасою культури *Pseudomonas putida*, або *Azotobacter vinelandii*, або *Bacillus megaterium* або *Micrococcus luteus* [3], кількість біомаси становить 2 г/дм³ (за сухою вагою). Анаеробні умови створюються поглинанням бактеріями розчиненого кисню із стічної води і забезпечуються герметичністю системи. У витікаючій з верхньої частини біореактора воді вимірюють концентрації важкоокислюваних органічних сполук та змінновалентних елементів. Концентрацію фенолу у вихідній та очищеній воді визначають спектрофотометрично (СФ-46).

Приклади реалізації за винаходом

Приклад 1. Культивування хромат-редуючих аеробних бактерій

Культивування проводять у середовищі, що містить глюкозу в концентрації 1 г/дм³ як донор електронів та Cr(VI) в концентрації 30 мг/дм³ як термінальний акцептор електронів. 100 мл середовища вносять в колби Ерленмейера об'ємом 100 дм³. Колекційний штам бактерії *P. putida* вирощують на твердому середовищі МПА та вносять в середовище культивування в кількості 200 мг/дм³. Поверхню розчину заливають 2 см шаром стерильного вазелінового масла (суміш насичених вуглеводнів з довжиною вуглецевого ланцюга $C_{15}-C_{20}$) для створення анаеробних умов. Відбір проб для аналізу здійснюють стерильним шприцем. Культивування проводять до повного видалення хрому(VI) у вигляді осаду Cr(OH)₃.

Приклад 2. Очистка води від фенолу в присутності хрому(VI)

Стічні води, що містять фенол, у концентрації 300мг/дм^3 та хром у концентрації 100мг/дм^3 , тобто при масовому співвідношенні 3:1 відповідно, подають в біореактор об'ємом 1м^3 . Культура бактерій *P. putida* іммобілізована на волокнистий насадці в кількості 2г/дм^3 . Воду подають в нижню частину біореактора за допомогою перистальтичного насосу із швидкістю розведення $0,028\text{год}^{-1}$. Час перебування води в біореакторі становить 36 год, що забезпечує повну очистку води фенолу при одночасній очистці від Cr(VI) .

Приклад 3. Культивування Mn(IV) -редуючих аеробних бактерій. Підготовку культурального середовища проводять як у прикладі 1. Mn(IV) вносять у вигляді оксиду MnO_2 у кількості 100мг на 100см^3 культурального розчину. Колекційний штам бактерії *A. vinelandii* вирощують на твердому середовищі МПА та вносять в середовище культивування в кількості 200мг/дм^3 . Поверхню розчину заповнюють шаром стерильного ейкозону. Процес культивування контролюють утворенням Mn(II) в процесі редукції Mn(IV) аеробними бактеріями. Про закінчення процесу свідчить незмінність концентрації Mn(II) в розчині.

Приклад 4. Очистка води від фенолу в присутності марганцю (IV).

В біореактор об'ємом 1м^3 подають стічні води, що містять фенол, у концентрації 300мг/дм^3 та MnO_2 у кількості 1г , тобто при масовому співвідношенні 3:1, відповідно. Культура бактерій *A. vinelandii*, іммобілізована на волокнистий насадці в кількості 2г/дм^3 . Воду подають в нижню частину біореактора за допомогою перистальтичного насосу із швидкістю розведення $0,028\text{год}^{-1}$. Час перебування води в біореакторі становить 36 год, що забезпечує повне окиснення фенолу в стічній воді.

Ефективність очистки від важкоокислюваних органічних сполук в присутності змінновалентних елементів досягається такими аеробними бактеріями як *Pseudomonas putida*, *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus megaterium* або *Micrococcus luteus*, при використанні насичених вуглеводнів гептадекану, нонадекану, ейкозону, або їх суміші, наприклад, вазелінового масла.

Експериментально встановлено, що оптимальним діапазоном концентрацій шестивалентного хрому для культивування бактерій є $5 \div 30\text{мг/дм}^3$, що забезпечує ефективний процес анаеробного дихання. Концентрація Cr(VI) менше 5мг/дм^3 недо-

статня для бактеріального переходу з аеробного на анаеробне дихання, тому її використання не доцільне. Концентрації Cr(VI) вище 30мг/дм^3 , відповідно, токсичні для неадаптованих культур бактерій. Введення Mn(IV) у вигляді нерозчинного оксиду MnO_2 у кількості 10мг на 100см^3 також забезпечує ефективний процес анаеробного дихання. При кількості MnO_2 менше 10мг на 100см^3 приріст біомаси недостатній для культивування бактерій. Використання MnO_2 в кількостях більше 100мг на 100см^3 не раціонально.

Визначено, що для створення анаеробних умов оптимальним є використання насичених вуглеводнів з довжиною вуглецевого ланцюга $\text{C}_{15}\text{-C}_{20}$. Насичені вуглеводні з довжиною вуглецевого ланцюга менше ніж C_{15} леткі і тому не можуть бути використані. Насичені вуглеводні з довжиною вуглецевого ланцюга більше ніж C_{20} схильні до затвердіння і можуть привести до розгерметизації системи культивування.

Переваги запропонованого способу культивування в порівнянні з відомим полягає в наступному:

Вперше запропоновано простий в реалізації спосіб культивування аеробних бактерій в анаеробних умовах в присутності змінновалентних елементів, що не потребує енергетичних витрат.

Запропонований спосіб дозволяє створювати необхідні анаеробні умови для культивування аеробних бактерій, вести безперервний контроль за процесом як аналітичними так і фізико-хімічними методами, так як шар насичених вуглеводнів забезпечує герметичність системи при втручанні ззовні, не потребує застосування складних технічних рішень для створення анаеробних умов.

Запропонований спосіб культивування дозволяє реалізувати ефективний спосіб очистки води від важкоокислюваних органічних сполук в присутності змінновалентних елементів. Завдяки використанню анаеробнодихаючих бактерій очистка води не потребує енергетичних витрат для проведення примусової аерації для окиснення органічних сполук та забезпечує скорочення часу на очистку в 1,5 рази.

Достоїнством запропонованого способу очистки є одночасність видалення крім важкоокислюваної органіки токсичних змінновалентних елементів, наприклад, хрому (VI).