



СОЮЗ СОВЕТСКИХ  
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ  
РЕСПУБЛИК

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ  
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ  
ПРИ ГКНТ СССР

# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

ДЛЯ СЛУЖЕБНОГО ПОЛЬЗОВАНИЯ ЭКЗ. № 000000

(19) **SU** (11) **1540208** **A1**

(51)  $5\ C\ 12\ N\ 1/20, C\ 02\ F\ 3/34//$   
 $//\ (C\ 12\ N\ 1/20, C\ 12\ R\ 1:38)$

- 1
- (21) 4428735/31-13  
(22) 23.05.88  
(71) Институт коллоидной химии и химии воды им. А. В. Думанского  
(72) П. И. Гвоздяк и Г. Н. Дмитренко  
(53) 663:15(088.8)  
(56) Авторское свидетельство СССР № 1194851, кл.  $C\ 02\ F\ 3/30$ , 1984.  
Авторское свидетельство СССР № 1375646, кл.  $C\ 02\ F\ 3/34$ , 1986.  
(54) ШТАММ *Pseudomonas mendocina*, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ ДЛЯ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД ОТ ТЕТРАГИДРОФУРАНА  
(57) Изобретение относится к облас-

2

ти биотехнологии, в частности, к биохимической очистке сточных вод от тетрагидрофурана и нитратов. Цель изобретения - получение штамма, обладающего более высокой деструктивной активностью по отношению к тетрагидрофурану в условиях денитрификации. Штамм *Pseudomonas mendocina* получен селекцией из почвы и активно-го ила и депонирован под номером ВКПМ В-4211. За 25 ч культивирования штамм полностью разрушает 100 мг/л тетрагидрофурана в условиях денитрификации. 1 рис., 1 табл.

Изобретение относится к области биотехнологии, в частности к биохимической очистке сточных вод от тетрагидрофурана и нитратов на предприятиях, производящих или применяющих тетрагидрофуран.

Целью изобретения является получение штамма, обладающего более высокой деструктивной активностью по отношению к тетрагидрофурану в условиях денитрификации.

Штамм *Pseudomonas mendocina* ВКПМ В-4211 получен в результате селекции по способности использовать тетрагидрофуран в качестве единственного источника углерода в условиях денитрификации и по способности адгезироваться на волокнистой насадке. Селекцию осуществляли из почвы и активного ила.

Для этого 30 г почвы и 30 мл активного ила помещают в колбу Эрленмей-4-90

ера объемом 500 мл. Туда же вносят 5 г базальтового или стеклянного волокна для естественной иммобилизации микроорганизмов на его поверхности. В колбу наливают среду, содержащую, г/л: тетрагидрофуран - 0,1;  $KNO_3$  - 2;  $HPO_4$  - 0,1;  $MgSO_4$  - 0,02;  $FeSO_4$  - 0,01;  $CaCl_2$  - 0,01 до общего объема 500 мл (под пробку). Культивируют в стационарных условиях при температуре 25°C. После разрушения тетрагидрофурана жидкость выливают и в колбу с носителем вносят свежую среду аналогичного состава (под пробку); в которой концентрацию тетрагидрофурана увеличивают вдвое. Деструкцию тетрагидрофурана осуществляют закрепившиеся на насадке микроорганизмы, содержащие нитратредуктазу. По мере деструкции тетрагидрофурана концентрацию его увеличивают в каждом последующем пассаже до 400, 600, 800, 1000 мг/л. Тет-



09 **SU** (11) **1540208** **A1**

рагидрофуран в культуральной среде определяют колориметрически по реакции с парадиметилбензальдегидом.

После установления постоянной скорости окисления тетрагидрофурана нитратами при его исходной концентрации в среде 1000 мг/л в течение трех пассажей селекцию микроорганизмов прекращают. Жидкость из колбы полностью удаляют и вносят 100 мл стерильного физиологического раствора. Колбу интенсивно встряхивают в течение 2 мин, отбирают 1 мл образовавшейся бактериальной суспензии, разбавляют в 10, 100, 1000, 10000 раз и засевают в трех повторностях на агаризованной среде следующего состава, г/л:  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  - 0,1;  $\text{MgSO}_4$  - 0,02;  $\text{FeSO}_4$  - 0,01;  $\text{CaCl}_2$  - 0,01;  $\text{KNO}_3$  - 2; тетрагидрофуран - 1; агар-агар - 20; дистиллированная вода до 1 л; pH - 6,9-7,2. Чашки с заселенными микроорганизмами культивируют при 25°C.

Выросшие в отдельные колонии микроорганизмы шестикратно пересекают на плотной среде. Получают биомассу чистых культур и изучают способность изолированных бактерий окислять тетрагидрофуран нитратами при росте в жидкой среде приведенного выше состава.

Отбирают культуры, наиболее быстро окисляющие тетрагидрофуран нитратами. В результате такой селекции выделен штамм *Pseudomonas mendocina* 153, использующий тетрагидрофуран в условиях денитрификации в качестве единственного источника углерода и энергии.

Деструктивную активность штамма *P. mendocina* 153 изучают на синтетической среде следующего состава, г/л:  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  - 0,1,  $\text{MgSO}_4$  - 0,02,  $\text{FeSO}_4$  - 0,01,  $\text{CaCl}_2$  - 0,01,  $\text{KNO}_3$  - 2, тетрагидрофуран - 0,25-1, дистиллированная вода до 1 л, pH - 6,9-7,2. Периодическое культивирование осуществляют в анаэробных условиях при температуре 25°C и исходной концентрации бактериальных клеток в среде  $10^7$  в мл. Штамм *P. mendocina* 153 депонирован в центральном музее промышленных микроорганизмов под номером В-4211. Штамм имеет характерные свойства.

Морфологические свойства штамма.

Клетки одиночные, палочковидные, прямые, цепочек никогда не образуют (в изучаемых условиях), грамотрица-

тельные. Длина клеток варьирует от 1,3 до 3,3 мкм. Толщина относительно одинакова - около 1,0 мкм. На синтетической среде с тетрагидрофураном клетки незначительно уменьшаются в размерах и приобретают слегка изогнутую форму. Культура подвижна, содержит несколько полярных жгутиков.

Культуральные свойства.

На МПА колонии желто-оранжевого цвета 4-5 мм в диаметре, пигмент в среду не диффундирует. На синтетической среде с тетрагидрофураном колонии слабо пигментированы. При росте на МПБ образует небольшую пленку, осадок и равномерное помутнение среды.

Физиолого-биохимические признаки.

Культура аэробная, способна использовать нитрат в качестве конечного акцептора электронов, катализирует оксидазоположительная. Не накапливает поли-β-оксибутирата внутри клеток. Не гидролизует крахмал и желатину. Источником углерода могут служить глюкоза, галактоза, сахароза, аргинин, L-валин. Не использует лактозу, рамнозу, маннозу, раффинозу, мальтозу, салицин, инозит, инулит, сорбит, дульцит. Оптимум роста культуры - 30 - 32°C.

Штамм *P. mendocina* 153 за 25 ч культивирования полностью разрушает 1000 мг/л тетрагидрофурана в условиях денитрификации, используя его в качестве единственного источника углерода и энергии. Культура не патогенна, не токсична.

Пример 1. Периодическое культивирование *P. mendocina* 153 осуществляют на модельном растворе следующего состава, г/л:  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  - 0,1;  $\text{MgSO}_4$  - 0,02,  $\text{FeSO}_4$  - 0,01,  $\text{CaCl}_2$  - 0,01,  $\text{KNO}_3$  - 2, тетрагидрофуран - 0,25 - 1, дистиллированная вода до 1 л, pH - 6,9-7,2.

В колбу Эрленмейера объемом 500 мл, вносят волокнистую загрузку (базальтовое или стеклянное волокно); модельный раствор с концентрацией тетрагидрофурана 250 мг/л и биомассу культуры *P. mendocina* 153. Биомассу вносят в концентрации  $10^7$  кл/мл один раз в первом пассаже при концентрации тетрагидрофурана 250 мг/л. В последующих пассажах после полного разрушения тетрагидрофурана жидкость удаляют и в колбу с загрузкой и закрепившимися на ней микроорганизма-

ми вносят свежую среду с увеличенной концентрацией тетрагидрофурана (500, 750, 1000 мг/л). Контроль разрушения тетрагидрофурана культурой осуществляют колориметрически.

Результаты опытов приведены на чертеже.

Из чертежа видно, что выделенный штамм *P. mendocina* 153 способен в периодических условиях культивирования очищать воду, содержащую до 1 г/л тетрагидрофурана. Деструктивная активность культуры значительно выше активности известного штамма *Xanthomonas* sp. 130, который 200 мг/л тетрагидрофурана использует за 28 час, а повышение концентрации ксенобиотика до 250 мг/л и выше приводит к лизису культуры. При этом деструкции тетрагидрофурана не происходит. Повышенная активность предлагаемого штамма обусловлена способностью культуры использовать для биодеструкции нитрат вместо кислорода в качестве конечного акцептора электронов.

**Пример 2.** Непрерывное культивирование *P. mendocina* 153 осуществляют на реальной сточной воде Киришского биохимзавода, содержащей до 5000 мг/л тетрагидрофурана. В настоящее время эти сточные воды сжигаются, повторно загрязняя окружающую среду продуктами сгорания. Такой метод обезвреживания сточных вод экономически невыгоден и экологически небезопасен.

В сточной воде предприятия, кроме тетрагидрофурана, содержатся в значительных количествах другие органические примеси, обуславливающие общее ХПК<sub>в.кв.</sub> около 15000 мг О/л. Концентрация нитратов достигает 2000 мг/л.

Для эффективного протекания процесса очистки с помощью культуры *P. mendocina* 153 в воду вносят нитраты в виде калийной селитры в соотношении с ХПК 1:3. Другие необходимые для жизнедеятельности культуры макро- и микроэлементы не добавляют, так как они присутствуют в воде.

Очистку осуществляют в цилиндрической емкости объемом 10 л, высотой 0,5 м, в которую помещают переплетенное базальтовое волокно. В установку вносят биомассу культуры *P. mendocina* 153 в концентрации  $10^8$  кл/мл. Сточную воду подают в установку со скоростью разбавления  $0,01 \text{ ч}^{-1}$  и концентрацией тетрагидрофурана 1000 мг/л. Постепенно скорость разбавления увеличивают до  $0,04 \text{ ч}^{-1}$ . Параллельно повышают содержание тетрагидрофурана в ней до 5000 мг/л. В вытекающей жидкости определяют тетрагидрофуран, ХПК, нитраты, нитриты.

Эффективность работы биореактора приведена в таблице, из которой видно, что полное разрушение тетрагидрофурана в сточной воде культурой *P. mendocina* 153 при непрерывном культивировании происходит при исходной концентрации 5000 мг/л и скорости разбавления  $0,04 \text{ ч}^{-1}$ . ХПК при этом снижается на 86,3%. В очищенной воде полностью отсутствуют нитраты и нитриты. Очищенная таким способом вода может быть направлена на традиционные биологические очистные сооружения. Увеличение скорости разбавления до  $0,06 \text{ ч}^{-1}$  приводит к увеличению ХПК очищенной воды и появлению в ней нитритов. Тетрагидрофуран в воде отсутствует.

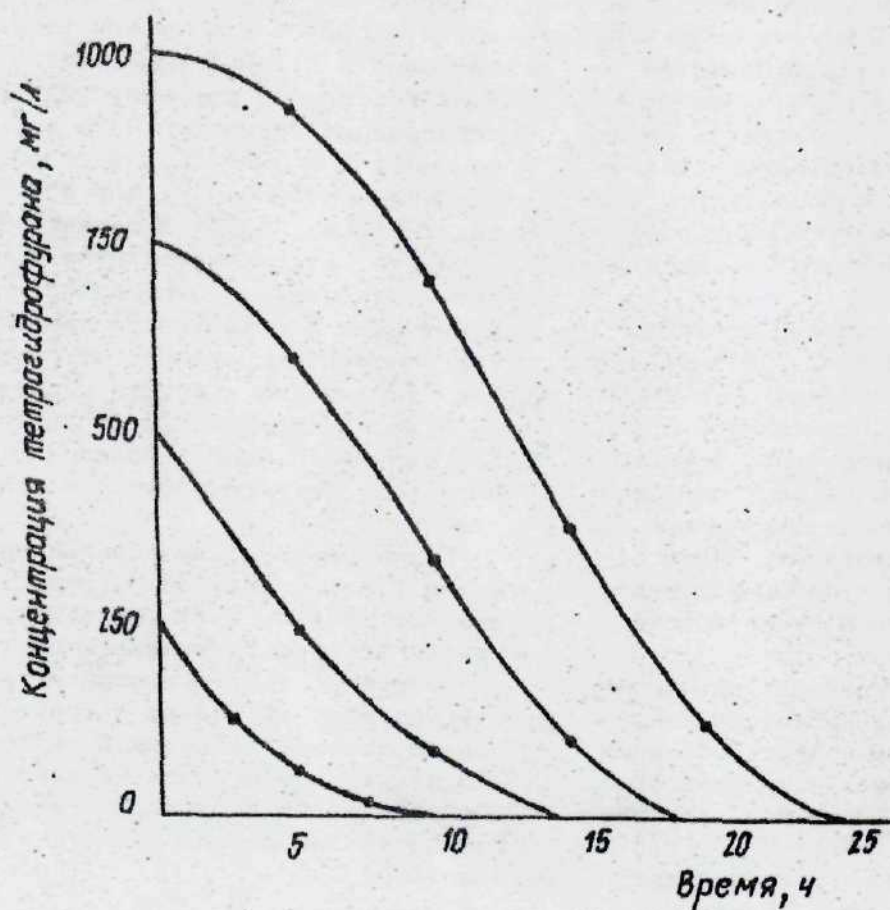
Таким образом, выделенный нами штамм *P. mendocina* 153 разрушает на протоке до 4000 мг/л тетрагидрофурана в условиях денитрификации.

Основной статьей экономии при очистке сточных вод от тетрагидрофурана с помощью культуры *P. mendocina* 153 является замена термического обезвреживания сточных вод на Каршиском биохимзаводе микробиологической очисткой.

#### Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Штамм *Pseudomonas mendocina* ВКМ В-4211, используемый для очистки сточных вод от тетрагидрофурана в условиях денитрификации.

Концентрация тетрагидрофурана, мг/л		% разрушения	ХПК, мг О/л		% очистки	Концентрация нитратов, мг/л		Концентрация нитритов, мг/л
до очистки	после очистки		до очистки	после очистки		до очистки	после очистки	
Скорость разбавления 0,04 ч <sup>-1</sup>								
1000	0	100	2780	15	99,5	920	0	0
2000	0	100	5600	60	97,2	1900	0	0
3000	0	100	8340	435	94,8	2780	0	0
4000	0	100	11280	1070	90,5	3760	0	0
5000	0	100	14380	1970	86,3	4800	0	0
Скорость разбавления 0,06 ч <sup>-1</sup>								
5000	0	100	14380	3890	73	4800	0	30



Составитель Н.Болотина

Редактор Н.Коляда

Техред Л.Сердюкова

Корректор И.Эрдейи

Заказ 509/ДСП

Тираж 304

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР  
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г.Ужгород, ул. Гагарина, 101