



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) **SU** (11) **1615175** **A1**

(51) 5 C 12 N 1/20, C 02 F 3/34

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГИИТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ И АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 4423396/31-13
(22) 10.05.88
(46) 23.12.90. Бюл. № 47
(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
№ 758224, кл. C 02 F 3/00, 1979.

(54) ШТАММ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ ДЛЯ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД ОТ НИТРАТОВ И КАПРОЛАКТАМА

(57) Изобретение относится к биотехнологии, в частности к биологической очистке сточных вод, и может быть

2

использовано для очистки от нитратов сточных вод производства капролактама. Целью изобретения является штамм бактерий, разлагающий нитраты и капролактан. Очистку воды от нитратов осуществляют с помощью культуры *Pseudomonas fluorescens* ВКПМ В-4212, иммобилизованной на волокнистой загрузке, что позволяет восстанавливать 100 мг/л нитрата в час и повысить производительность сооружения до 1,33 м³/м³ сутки. Процесс осуществляется в сточных водах при концентрации нитратов 500-2000 мг/л, 500-1000 мг/л капролактама и 40 мг/л K₂HPO₄ в условиях потока со скоростью разбавления 0,04-0,06 ч⁻¹ без принудительной аэрации. 2 табл.

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к биологической очистке сточных вод, и может быть использовано для очистки от нитратов сточных вод производства капролактама.

Целью изобретения является получение нового штамма бактерий *Pseudomonas fluorescens*, обладающего повышенной способностью утилизировать капролактан и нитраты, который можно использовать для очистки сточных вод от нитратов и капролактама.

Штамм выделен из активного ила и хранится в ЦИМ под коллекционным номером ВКПМ В-4212.

Культуру денитрификаторов получают из активного ила путем двойной селекции: по способности восстанавливать нитраты при росте на капролактаме и по способности адгезироваться на волокнистой насадке.

Для этого 50 мл активного ила, имевшего ранее контакт с капролактамом, вносят в колбу Эрленмейера объемом 500 мл. Туда же помещают 5 г базальтового или 2 г капронового волокна для естественной адгезии микроорганизмов на его поверхности. В колбу наливают среду, содержащую 2000 мг/л нитратов, 1000 мг/л капролактама и 40 мг/л фосфата калия,

(19) **SU** (11) **1615175** **A1**

12 07 90-73

до общего объема 500 мл (под пробку). Периодически (раз в 6 ч) отбирают пробу на анализ на содержание нитратов и капролактама.

После полной редукции нитратов жидкость из колбы выливают, и в колбу с волокном вносят 500 мл (под пробку) свежей среды аналогичного состава. Восстановление нитратов капролактамом осуществляют закрепившиеся на насадке микроорганизмы, содержащие нитратредуктазу. По мере снижения концентрации нитрата и капролактама в среде жидкость снова заменяют свежей. После установления постоянной скорости восстановления нитратов иммобилизованными на волокне микроорганизмами в течение трех пассажей селекцию прекращают. Жидкость выливают, и в колбу вносят стерильный физиологический раствор (100 мл). 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 (2%) среде описанного состава. Чашки с засеянными микроорганизмами культивируют при 25°C.

Выросшие в отдельные колонии микроорганизмы шестикратно пересевают на агаризованной среде. Получают биомассу чистых культур и изучают способность изолированных бактерий восстанавливать нитрат при росте на жидкой среде с капролактамом.

Отбирают культуры, наиболее быстро восстанавливающие нитрат с выделением газа. В результате селекции выделен штамм *P. fluorescens* 154, восстанавливающий нитрат до молекулярного азота, растущий на капролактаме, как единственном источнике питания, и активно адгезирующий на базальтовом и капроновом волокнах.

Морфолого-культуральные признаки культуры. Грамотрицательные, подвижные палочки. На МПА образует небольшие колонии 2-3 мм в диаметре с характерным зеленым флуоресцирующим пигментом, диффундирующим в среду. Колонии плоские, в проходящем свете полупрозрачные, край волнистый, поверхность гладкая, влажная, блестящая, консистенция вязкая, равномерно окрашены в зеленый цвет, в том числе и обратная сторона колонии. Пиг-

мент образуется и на плотной среде с капролактамом и нитратами. В 3-4-суточной культуре колонии на минеральной среде с капролактамом крупные, достигают 7-8 мм в диаметре. Клетки мелкие, палочковидные с закругленными концами, одиночные, цепочек не образуют, размером 0,5 - 0,7 x 2,2 - 3,5 мкм, содержат полярный жгутик, размножение путем бинарного деления, спор не образуют. На МПБ культура вызывает равномерное помутнение среды, не кислотоустойчива. Не накапливает поли- β -оксибутират внутри клеток. В клеточной стенке отсутствуют тейхоевые кислоты, содержание муреина низкое.

Физиолого-биохимические свойства. Культура аэробная, способна к денитрификации. Редукцию нитратов осуществляют до молекулярного азота. Оксидазо- и каталазоположительная, разжижает желатин, не гидролизует крахмал, не содержит лецитиназы и левансахаразы, оптимум pH близок 7,0, не галотолерантна - (не растет при 12% NaCl, медленный рост при 5% NaCl). На МПБ выделяет сероводород и не продуцирует индол, молоко не свертывает. Содержит аргининдегидролазу. Источником углерода для роста служат глюкоза, манноза, галактоза, раффиноза, рамноза, инозит, глицерин, маннит, L-валин, ацетат и цитрат, при этом происходит подкисление среды (изменение pH с 7,1 до 6,3). Не использует сахарозу, фруктозу, лактозу, мальтозу, сорбит, дульцит, салицин, адонит, тартрат. Оптимальная температура роста 27-30°C, слабый рост при 10 и 37°C, при 41°C роста нет. В периодических условиях культивирования *P. fluorescens* 154 за 16 ч полностью восстанавливает 2000 мг/л нитратов при росте на среде с капролактамом при 25°C и концентрации клеток 10^7 в 1 мл, среду подщелачивает. Культура не патогенна, не токсична.

Пример 1. Очистка модельной сточной воды, содержащей нитраты, культурой *P. fluorescens* 154.

В цилиндрическую установку высотой 1 м объемом 10 л подвешивают жгутами 50 г базальтового волокна и вносят приготовленную на воде, содержащей 500 мг/л нитратов, 300 мг/л капролактама и 10 мг/л фосфата калия,

суспензию культуры *P. fluorescens* 154 с концентрацией клеток 10^7 в 1 мл. Через 12 ч устанавливают проток со скоростью разбавления $0,01 \text{ ч}^{-1}$. По мере восстановления нитратов скорость постепенно увеличивают до $0,08 \text{ ч}^{-1}$. Параллельно повышают содержание N-NO_3^- до 2000 мг/л. Процесс проводят при 25°C в анаэробных условиях.

Результаты опытов приведены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что за 12 ч пребывания сточной воды в сооружении 2000 мг/л нитратов восстанавливаются на 96% и за 18 ч на 100%.

Т а б л и ц а 1

Скорость разбавления, ч^{-1}	Концентрация N-NO_3^- , мг/л		Степень очистки, %
	до очистки	после очистки	
0,04	500	0	100
0,04	1000	0	100
0,04	2000	0	100
0,06	500	0	100
0,06	1000	0	100
0,06	2000	0	100
0,08	500	0	100
0,08	1000	10	99,0
0,08	2000	80	96,0

Пример 2. Очистка реальной сточной воды от нитратов.

Непрерывное культивирование штамма *P. fluorescens* 154 осуществляют на реальной сточной воде производства капролактама, содержащей 1800 мг/л нитратов и 1000 мг/л капролактама. В воду добавляют фосфат калия концентрации 40 мг/л. Очистку осуществляют на локальной установке объемом 1 м^3 при $22-25^\circ\text{C}$ и скорости разбавления $0,04-0,08 \text{ ч}^{-1}$. В

установку помещают переплетенное капроновое волокно и вносят суспензию культуры *P. fluorescens* 154.

Эффективность работы биореактора приведена в табл. 2.

Из табл. 2 видно, что полная редукция нитратов в сточной воде культурой *P. fluorescens* 154 происходит при исходной концентрации 1800 мг/л и скорости разбавления $0,06 \text{ ч}^{-1}$. Увеличение скорости разбавления до $0,08 \text{ ч}^{-1}$ ухудшает очистку. 1800 мг/л нитратов восстанавливаются на 95%.

Т а б л и ц а 2

Скорость разбавления, ч^{-1}	Концентрация N-NO_3^- , мг/л		Степень очистки, %
	до очистки	после очистки	
0,04	1800	0	100
0,06	1800	0	100
0,08	1800	90	95

Штамм *P. fluorescens* позволяет полностью очистить сточную воду от нитратов при их исходной концентрации 1800 мг/л и времени пребывания 18 ч. При этом нагрузка на сооружение составляет 100 мг/л нитрата/ч. Производительность установки $1,33 \text{ м}^3/\text{м}^3 \cdot \text{сут.}$ Максимальная концентрация нитратов, полностью восстанавливаемых культурой *P. fluorescens* до газообразного состояния при скорости разбавления $0,04 \text{ ч}^{-1}$, 5000 мг/л N-NO_3^- .

При очистке сточных вод от нитратов штаммом *P. fluorescens* снижаются эксплуатационные расходы благодаря увеличению нагрузки на сооружение.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Штамм бактерий *Pseudomonas fluorescens* ВКПМ В-4212, используемый для очистки сточных вод от капролактама и нитратов.

Составитель И.Болотина
Редактор Н.Гуныко Техред Л.Сердюкова Корректор А.Обручар

Заказ 3961 Тираж 496 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