

005055862

*На правах рукописи*

**ЛИТТИ Юрий Владимирович**

**Анаэробное окисление аммония и метаногенез в системах  
аэробной очистки сточных вод с иммобилизацией  
микроорганизмов**

03.02.03 – микробиология  
03.01.06 – биотехнология (в том числе бионашотехнологии)

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**29 НОЯ 2012**

Москва - 2012

**Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского Российской академии наук**

Научный руководитель: доктор биологических наук,  
**Ножевникова Алла Николаевна**

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,  
**Л. М. Захарчук**, профессор кафедры  
микробиологии Биологического  
факультета МГУ

доктор биологических наук,  
**Ю.А. Николаев**, руководитель группы  
биотехнологий Инженерно-  
технологического центра Мосводоканала.

Ведущая организация: **Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева**

Защита диссертации состоится 11 декабря 2012 г. в 15.30 на заседании диссертационного совета Д 501.001.21 при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12, биологический факультет МГУ, ауд. М-1.  
Тел: 8 (495) 939-54-83, эл. почта: [npiskunkova@rambler.ru](mailto:npiskunkova@rambler.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан 9 ноября 2012 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета:



к.б.н. Пискунова Нина Фёдоровна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Одной из актуальнейших проблем современности является проблема чистой воды, которая неразрывно связана с проблемой качественной очистки сточных вод и предотвращения загрязнения источников чистой пресной воды. Наибольший интерес и перспективу имеют естественные и самые дешевые методы биологической очистки, представляющие собой интенсификацию природных процессов разложения органических соединений микроорганизмами в аэробных или анаэробных условиях, или в их комбинации.

В централизованной очистке хозяйственно-бытовых сточных вод осуществляется аэробная очистка с применением процесса активированного ила, которая наряду с беспорочными достоинствами имеет и ряд существенных недостатков, а именно высокие затраты на аэрацию и утилизацию больших количеств избыточного ила (Ножевникова, 2004). Не менее серьезная проблема состоит в удалении соединений азота, т.к. большинство очистных сооружений изначально проектировалось без расчета на их удаление (Jetten et al., 2002; Николаев и др., 2008). Сброс недостаточно очищенных от соединений азота сточных вод является причиной эвтрофикации водоемов. Присутствие аммиака в водоеме оказывает сильное токсическое влияние на рыб, наличие нитритов в питьевой воде вызывает онкологические заболевания, нитратов — метгемоглобинемии у детей.

В настоящее время азотсодержащие соединения удаляются в специальном блоке доочистки воды методом биологической нитриденитрификации, однако он достаточно дорог, так как требует значительных затрат на аэрацию и добавление источника органических веществ, необходимых для роста денитрификаторов (Дарепа-Мора et al., 2004; Николаев и др., 2008). В конце 80-х годов прошлого века был открыт процесс анаэробного окисления аммония нитритом (анаммокс-процесс) (Broda, 1977), и через 20 лет описана первая анаммокс-бактерия *Cand. Brocadia anammoxidans* (Strous et al., 1999). В наши дни анаммокс-процесс считается наиболее перспективным, экономически выгодным и эффективным способом удаления аммония из сточных вод, т.к. позволяет исключить стадию гетеротрофной денитрификации и значительно уменьшить стоимость аэробной нитрификации (Jetten et al., 2002; Schmidt et al., 2003; Egli et al., 2003; Zhang et al., 2008; Kartal et al., 2010). Являясь крайне востребованным при очистке высококонцентрированных сточных вод, применению процесса анаммокс при очистке сточных вод с низкими концентрациями азотных загрязнений ранее не уделялось должного внимания. Однако, по мере развития новых технологий очистки анаммокс-процесс может вносить более значимый вклад в удаление азота при очистке сточных вод с низкими концентрациями азотных загрязнений, состав которых отличается от оптимальных для развития сообщества анаммокс-бактерий. Таким образом, исследование процесса анаммокс приобретает новый аспект.

В настоящее время большое внимание уделяется разработке и развитию новых, а также усовершенствованию существующих методов биологической очистки сточных вод, в том числе хозяйственно-бытовых сточных вод,

характеризующихся низкими концентрациями загрязнений. Среди них использование анаэробных и аэробных процессов в одном (Irwine et al., 1989; Subbaramaiah et al., 2010) или разных биореакторах (Goncalves and Avanzo, 1999; Garuti et al., 1992), применение рецикла очищаемой воды, изменение режима аэрации и др. для более полного удаления биогенных элементов (Мишуков Б.Г., 2004а), а также применение иммобилизации микроорганизмов активного ила на различных носителях (Yan and Tay, 1997; Zita and Hermansson, 1997; Сироткин, 2007). Иммобилизация микроорганизмов на твердом носителе вследствие развития биопленок позволяет значительно увеличить плотность и биоразнообразие активных микроорганизмов в очистных сооружениях, благодаря чему увеличивается скорость и глубина очистки воды. Увеличение продолжительности пребывания микроорганизмов в реакционной среде имеет немаловажное значение с учетом затрат на утилизацию больших количеств биомассы активного ила. В системах аэробной очистки с прикрепленными микроорганизмами устанавливается равновесие между процессами прироста биопленки и ее вымывания, в связи с чем отпадает необходимость в рециркуляции биомассы, принципиально необходимой при очистке сточных вод в традиционных аэротенках, работающих на свободноплавающей биомассе (Сироткин, 2007).

Перечисленные выше основные преимущества систем аэробной очистки с иммобилизацией микроорганизмов активного ила, перед традиционными аэротенками со свободноплавающей биомассой, в большой степени связаны с важной особенностью строения биопленки – образованию анаэробного слоя вследствие ограниченного доступа кислорода в ее внутренние зоны (Tay et al., 2002; Yu et al., 2002; Плакунов, 2008). Даже в условиях аэрации во внутренних слоях биопленок возникают анаэробные микрзоны, где могут осуществляться анаэробные микробные процессы, в частности денитрификация (Henze et al., 2008). До настоящего времени до конца не раскрыты процессы, протекающие в анаэробных слоях биопленки, а также их влияние на эффективность функционирования сооружений аэробной очистки сточных вод. Исследование метаногенеза, а также анаэробного окисления аммония и денитрификации - процессов, участвующих в удалении основных загрязняющих веществ хозяйственных сточных вод, а именно соединений углерода и азота, представляет большой интерес для биотехнологии аэробной очистки сточных вод с участием иммобилизованных биоценозов. Результаты этих исследований имеют важное практическое значение при проектировании новых и реконструировании существующих очистных станций, в частности, для уменьшения образования избыточного ила, а также упрощения и удешевления процесса удаления биогенного азота.

На исследуемых станциях аэробной очистки сточных вод, построенных в поселках строителей Олимпийских объектов в долине реки Мзымта Сочинского региона, было обнаружено существенное снижение прироста избыточного ила и несхождение баланса по азоту, что позволило предположить протекание процессов метаногенеза и анаммокс в биопленках иммобилизованного активного ила.

**Цели и задачи работы.** Целью работы было исследовать анаэробные процессы образования метана и молекулярного азота в биопленках иммобилизованного активного ила в системах аэробной очистки сточных вод, получить доказательства осуществления процесса анаэробного окисления аммония нитритом и развития анаммокс-бактерий в полномасштабных сооружениях и разработать предложения по оптимизации процессов удаления азота. В задачи работы входило:

- 1) исследовать разнообразие и относительную численность аэробных и анаэробных микроорганизмов в прикрепленном активном иле;
- 2) исследовать анаэробную деградацию органических веществ с образованием метана во взвешенном и прикрепленном активном иле из полномасштабных станций очистки сточных вод;
- 3) исследовать окисление метана в микробных биопленках и во взвешенном иле;
- 4) исследовать процессы денитрификации и анаммокс в периодических стационарных накопительных реакторах и при проточном культивировании;
- 5) получить биомассу прикрепленного и свободноплавающего активного ила, обогащенного анаммокс-бактериями;
- 6) с использованием культуральных, микроскопических, молекулярно-биологических и филогенетических методов охарактеризовать анаммокс-бактерии в хлопьях и биопленках активного ила.
- 7) разработать рекомендации по оптимизации процессов удаления азота в полномасштабных очистных сооружениях.

**Научная новизна и практическая значимость работы.** Впервые проведено исследование анаэробных процессов (метаногенез и анаммокс) в полномасштабных системах аэробной очистки бытовых сточных вод с иммобилизацией микроорганизмов. Выявлено, что в условиях активной аэрации в биопленках иммобилизованного на ершовом носителе активного ила функционирует метаногенное микробное сообщество, которое осуществляет анаэробную деградацию органических соединений до метана и углекислоты. Показано микробное окисление образующегося метана и реализация метанового цикла при очистке сточной воды, причем образование метана происходит преимущественно в прикрепленном, а окисление в свободноплавающем иле. Установлено, что высокое содержание анаэробных микроорганизмов в активном иле обеспечивает низкий прирост микробной биомассы избыточного ила. Получены доказательства наличия процесса анаммокс при очистке бытовых сточных вод в комбинированной системе с физико-химической предобработкой и биологической очисткой. Впервые показан существенный вклад анаммокс-процесса в удаление азота при очистке сточных вод с низкими концентрациями загрязнений. Получен патент на комплектно-блочную модульную очистную установку с эффективным удалением азота с помощью иммобилизованного аэробно-анаэробного микробного сообщества, включающего анаммокс-бактерии. Выданы рекомендации для оптимизации работы канализационных очистных сооружений КОС ЭКОС.

**Апробация работы.** Материалы работы были представлены на 9 международных симпозиумах и конференциях: V-ая и VI-ая Молодежная школа-конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (2009, 2010); III International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld 2009); Конференция «Инновационные технологии и оборудование для очистки сточных вод и обработки осадка» (2010); VI Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (2011); IX Международная специализированная выставка «Мир биотехнологии - 2011»; BIT's 1st World Congress of Environmental Biotechnology - 2011; Международная конференция «Экология и геохимическая деятельность микроорганизмов экстремальных местообитаний»; Конференция «Энергосбережение и энергоэффективность на предприятиях водопроводно-канализационного хозяйства» (2012).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ (2 опубликованных статьи и 1 статья в печати, 1 патент, 9 тезисов).

**Место проведения работы.** Работа выполнена в лаборатории микробиологии антропогенных мест обитания Института микробиологии им. С. Н. Виноградского РАН. Филогенетические исследования проведены в ЦКП "Контроль биобезопасности ГМО, пищевого сырья, продуктов и кормов" ФЦП Роснауки на базе Центра "Биоинженерия" РАН.

**Структура и объем диссертации.** Работа состоит из введения, 4 глав, общих выводов, списка использованной литературы и приложений. Работа изложена на 147 странице машинописного текста, содержит 48 рисунка, 13 таблицы и .... приложения. Библиография включает 215 наименования, из которых 178 на иностранных языках.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объекты исследования.** Работу проводили с пробами прикрепленного и свободноплавающего активного ила из экспериментальной станции очистки сточных вод в поселке Красная поляна, Сочи; а также из двух станций очистки сточных вод, построенных по технологии компании ЭКОС, включающей физико-химической предобработку коагулянтном и рециклом водно-иловой смеси из аэротенка в микроаэрофильный денитрификатор в начале процесса, в поселках строителей олимпийских объектов вдоль реки Мзымта (канализационное очистное сооружение КОС №3 с одним денитрификатором и КОС №6 с двумя последовательными денитрификаторами). Было исследовано 5 образцов ершей с обрастаниями и 2 образца взвешенного ила. Пробы отбирали 4 раза с интервалом 6 месяцев.

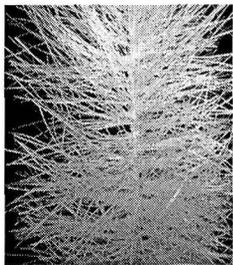
**Использованные среды.** Для исследования аэробной и анаэробной деградации летучих жирных кислот (ЛЖК), а также метанотрофной активности использовали: 1) ацетат, пропионат и n-бутират натрия до конечной

концентрации 5 мМ; 2) метан до концентрации 8-10% по объему газовой фазы. Модифицированную среду Пфеннига для метаногенов с добавлением витаминов и микроэлементов готовили по стандартной методике (Жилина, 1978). Среду для нитрифицирующих бактерий готовили согласно (Koops et al., 1991). Среду для анаммокс-бактерий готовили согласно (Liao et al., 2007) с небольшими модификациями. Свежеприготовленную среду продували аргоном. Среда для денитрифицирующих бактерий по составу была аналогичной среде для анаммокс-бактерий, но без добавления  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Для определения численности аэробных бактерий использовали глюкозо-пептонную среду с содержанием глюкозы и пептона по 2.5 г/л.

**Краткосрочные опыты.** Опыты ставили в 3-х повторностях в герметичных стеклянных флаконах объемом 120 мл. Анализ газов проводили регулярно через 1-3 суток, пробы жидкости для анализа рН, ЛЖК, ионов аммония, нитрита и нитрата отбирали 1 раз в 1-2 недели. Образование метана в пробах активного ила изучали при 9 и 20°C. Объем жидкой фазы (иловая суспензия, разбавленная 1:1 средой для метаногенов) – 20 мл, газовая фаза – аргон. Исследование влияния температуры на скорость анаммокс-процесса проводили в интервале температур от 10 до 40°C с шагом в 5°C. Определение относительной численности аэробных и анаэробных микроорганизмов в биопленках на ершах производили методом предельных разведений. Аэробное окисление аммония исследовали в колбах Эрленмейера при 30°C.

**Долгосрочные опыты.** Периодическое культивирование проводили в стационарных стеклянных реакторах объемом 1-2.5 л. Не реже 1 раза в неделю, меняли среду или добавляли соли нитрита и аммония, регулярно, 2-3 раза в неделю, определяли рН, состав газовой фазы, концентрации нитрит- и нитрат-ионов, и иона аммония, каждые 3-4 недели определяли ХПК и ЛЖК. Культивирование производили первые два месяца при 20, следующие два месяца при 25 и затем при 30°C.

Накопление анаммокс-бактерий и исследование условий их активного



роста проводили при непрерывном культивировании в лабораторном гибридном проточном реакторе с восходящим потоком среды через слой активного ила (UASB) и ершовой загрузкой (рис.1) для иммобилизации анаммокс-бактерий при 30°C с постоянным контролем рН, концентрации ионов аммония и нитрита на входе и выходе из реактора.

Рис. 1. Ерш для иммобилизации активного ила.

**Химические анализы.** Содержание кислорода, азота, метана и водорода определяли на газо-жидкостном хроматографе Кристалл 5000.1 (ЗАО ХРОМАТЕК г. Йошкар-Ола) и на хроматографе СHROM-5 (Чехословакия). Хроматографический анализ ЛЖК проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе (ВЭЖХ) «Стайер». Химическое поглощение кислорода (ХПК) определяли бихроматным методом (Орлов Д.С., Гришина Л.А., 1981). Нитрат определяли колориметрически по методике

(Bhaudari et al., 1986). Нитрит и аммоний определяли по стандартной методике (Лурье, 1971). Определение pH производили на pH-метре HANNA pH-211 (Германия). Абсолютно сухую массу ила (АСМ) определяли гравиметрически с высушиванием проб при 105°C.

**Изучение морфологии и ультратонкого строения клеток.** Морфологию бактерий изучали в световом микроскопе Olympus с фазовым контрастом, а также с использованием сканирующего электронного микроскопа JSM-T300 (Япония). Ультратонкие срезы изучали в электронном микроскопе Jeol JEM – 100С (Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

**Детекция анаэробных бактерий молекулярно-биологическим методом FISH.** Гибридизацию препаратов с зондами проводили в соответствии с методикой Stahl и Amann (1991) при температуре 46°C и условиях гибридизации для различных зондов (Amann et al., 1990; Amann et al., 1995). Идентификацию клеток планктомицетов осуществляли с зондом PLA46 для всей группы Planctomycetes (Neef et al., 1998) и Amx368 для «anaerob»-планктомицетов (Schmid et al., 2003).

**Определение филогенетической принадлежности анаэробных бактерий.** ДНК выделяли модифицированным методом (Birnboim and Doly, 1979) и Wizard-технологии фирмы Promega (США). Гены 16S рРНК амплифицировали с использованием праймеров 11F и 1492R (Lane, 1991). Для амплификации фрагментов генов, специфичных для планктомицетов, использовались праймеры Pla 46F и 1385R. Секвенирование и филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей проводили по методу (Sanger et al., 1977) на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3730. Редактирование полученных секвенсных спектрограмм проводили с помощью программы Chromas, версия 1.45 (<http://www.techelysium.com.au./chromas.html>). Первичный сравнительный анализ полученных *de novo* последовательностей с последовательностями базы данных GenBank проводили с помощью программы NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Редактирование последовательностей проводили с помощью редактора BioEdit (<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Выбранные последовательности выравнивали между собой с помощью программы CLUSTAL W v 1.75 (Thompson et al., 1994).

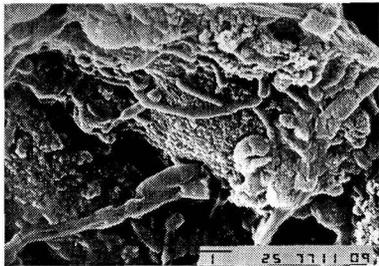
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

### **1. Образование и окисление метана и образование молекулярного азота в системе аэробной очистки сточных вод**

Исследование проводили с пробами взвешенного и иммобилизованного на ершах активного ила из экспериментальной станции очистки сточных вод ЦАО МО РФ, пос. Красная поляна, Сочи.

На рисунке 2 представлена фотография микробных обрастаний (биоленки) на волокнах ерша, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. Очевидно высокое морфологическое разнообразие микроорганизмов в биоленках. На поверхности биоленок присутствуют палочки, кокки и овальные клетки различных размеров. На отдельных снимках

видны агрегаты, похожие на метаносарцины и/или анаммокс-бактерий. Методом предельных разведений обнаружено, что рост микроорганизмов в аэробных условиях наблюдался вплоть до 12 разведения, а в анаэробных до 11-12 разведения. В анаэробных условиях образование метана наблюдалось до 4-5 разведений, в разведениях от 6-го до 11-12-го наблюдалось образование водорода и летучих жирных кислот. С помощью комбинации методов предельных разведений и анализа газов, образующихся в анаэробных условиях



культивирования, показано, что даже в биопленках, развивающихся в условиях активной аэрации, анаэробные микроорганизмы могут составлять не менее 10% от общего числа микроорганизмов.

Рис. 2. Микробные обрастания на волокнах «ершовой» насадки. Сканирующий электронный микроскоп.

Результаты исследований позволяют объяснить существенное уменьшение продукции избыточного ила, наблюдаемое на станциях аэробной очистки воды с иммобилизацией микроорганизмов, по сравнению с традиционной технологией аэробной очистки. Это происходит вследствие увеличения роли анаэробных микроорганизмов в активном иле, образующих гораздо меньше микробной биомассы по сравнению с аэробными микроорганизмами.

В результате посевов прикрепленного и свободноплавающего илов на среду для нитрификаторов, изменялась окраска индикатора в среде, уменьшалась концентрация аммония, и образовывался нитрит и небольшое количество нитрата, что свидетельствует о присутствии нитрификаторов (аэробных аммоний-окисляющих и нитрит-окисляющих бактерий) в исходных илах.

**1.1. Анаэробная деградация органических веществ с образованием метана во взвешенном и прикрепленном активном иле.** Образование метана возможно лишь при крайне низком окислительно-восстановительном потенциале среды, от -200 мВ (Mah et al., 1977) до -300 мВ и ниже (Zehnder and Stumm, 1988). Соответственно, присутствие в биопленках на ершах и в хлопьях активного ила метаногенного микробного сообщества является доказательством существования анаэробных условий для развития различных анаэробных микроорганизмов, в том числе анаммокс-бактерий.

Микробные популяции взвешенного и прикрепленного ила в анаэробных условиях при 20°C образовывали метан из эндогенных органических веществ с постоянной скоростью без выраженной фазы задержки. Образование метана наблюдалось даже при пониженной температуре после лаг-фазы. Образование метана и углекислоты происходило, вероятно, за счет анаэробного разложения органических веществ сточной воды и, возможно, лизиса неактивной биомассы. Прикрепленный ил проявил более высокую метаногенную активность, поскольку в сравнении с взвешенным илом в нем содержится большее

количество анаэробных микроорганизмов. Таким образом, исследуемый активный ил содержит аэробные и анаэробные микроорганизмы, включая метаногенные археи, образующие метан.

Как известно, при анаэробной деградации органических веществ основными промежуточными продуктами являются летучие жирные кислоты, в основном уксусная (ацетат), пропионовая (пропионат) и масляная (бутират) кислоты (Gujer, Zehnder, 1983; Заварзин, 1987). Они могут накапливаться при неполном анаэробном разложении органических веществ. Показано, что в анаэробных условиях метан образовывался из ЛЖК микробными сообществами как прикрепленного, так и взвешенного активного ила (рис. 3, рис. 4). Весь добавленный ацетат потребился прикрепленным илом без фазы задержки через 10 суток, причем из 5 ммоль добавленного ацетата образовалось 5 ммоль метана, что соответствует стехиометрии ацетокластического метаногенеза (рис. 3а).

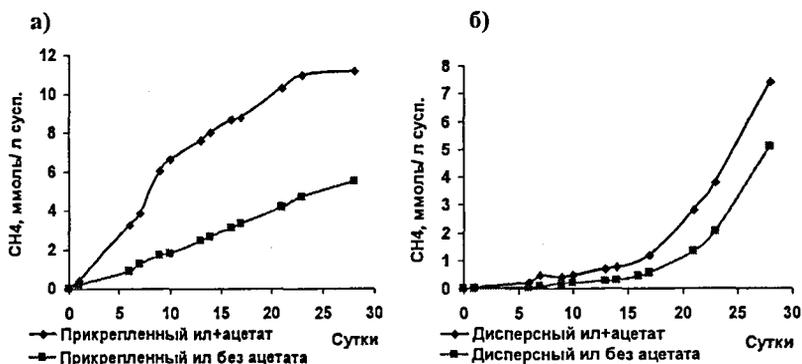


Рис. 3. Образование метана микробным сообществом прикрепленного (а) и свободноплавающего (б) ила.

Следует отметить, что взвешенный ил потреблял ацетат намного медленнее, чем прикрепленный, с заметной лаг-фазой. Это является свидетельством того, что, благодаря наличию во внутренних слоях биопленок анаэробных микрозон, число активных метаногенов в прикрепленном активном иле выше, чем в свободноплавающем.

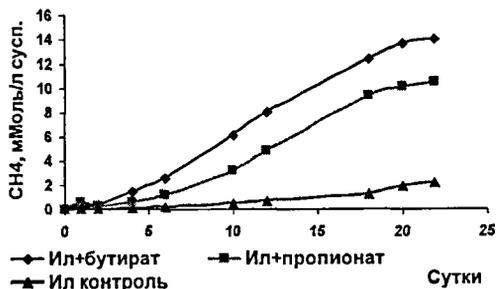


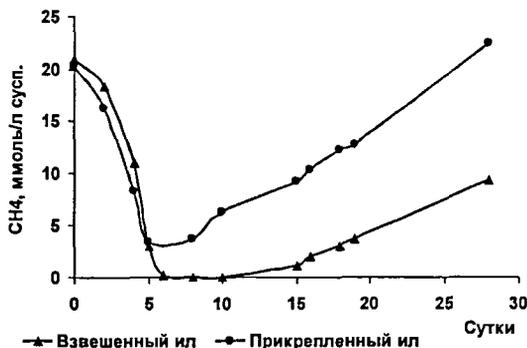
Рис. 4. Образование метана микробным сообществом взвешенного ила из пропионата и бутирата.

Образование метана из пропионата и бутирата начиналось после непродолжительной лаг-фазы. Количество образованного метана

хорошо коррелировало с количеством потребленных ЛЖК, учитывая, что из 1 ммольа ацетата, пропионата и бутирата в среднем образуется соответственно 1, 1.75 и 2.5 ммольа метана. Так, из 5 ммольей добавленных пропионата и бутирата образовалось около 9 и 12.5 ммольей метана, соответственно (рис. 4).

Таким образом, во взвешенном и в иммобилизованном иле присутствуют все ключевые группы анаэробных микроорганизмов, способных разлагать продукты кислотного брожения – важных предшественников метана.

**1.2. Окисление метана в микробных биопленках на волокнах ершей и во взвешенном иле.** Показано, что микробная популяция взвешенного и прикрепленного ила практически полностью окисляла добавленный метан уже через 5 суток, а при истощении кислорода начиналось его образование, вероятно, за счет разложения эндогенных органических веществ. Скорость



окисления метана свежими пробами активного ила была одинаковой в пробах прикрепленного и свободноплавающего илов, а скорость его образования была выше в пробах прикрепленного ила (рис. 5).

Рис. 5. Окисление и образование метана микробным сообществом взвешенного и прикрепленного ила.

Эти результаты свидетельствуют об одновременном образовании и окислении метана микробной популяцией прикрепленного ила. Метан может образовываться в анаэробной зоне биопленки и окисляться во внешнем аэробном слое, а также свободноплавающим илом. Это указывает на важную роль анаэробного микробного сообщества в деградации органических веществ и на функционирование метанового цикла при аэробной очистке воды.

**1.3. Образование молекулярного азота активным илом.** С целью исследования образования молекулярного азота был поставлен длительный эксперимент с использованием среды, содержащей нитрит и аммоний. В течение шести месяцев культивирования активного ила нитрит активно потреблялся, а потребления аммония не наблюдалось, а даже происходило увеличение его концентрации за счет разложения азотсодержащих органических веществ биомассы ила (рис. 6). В этот период протекала гетеротрофная денитрификация, что подтверждалось активным образованием молекулярного азота. В дальнейшем содержание растворенных органических веществ снизилось до следовых значений. Хотя потребление нитрита снизилось, но

начал потребляться аммоний и шло образование молекулярного азота, что указывает на осуществление процесса анаммокс и развитие анаммокс-бактерий. В пробах ила после 4 месяцев культивирования методом *in situ*-гибридизации (FISH) с Су3-меченым олигонуклеотидным зондом PLA46 показано присутствие физиологически-активных планктомицетов, к которым принадлежат все известные на сегодняшний день анаммокс-бактерии. (рис. 7).

Полученные результаты указывают на то, что в активном иле экспериментальной станции очистки сточных вод в пос. Красная поляна, Сочи, удаление азота происходит преимущественно за счет процессов нитри-

и денитрификации, однако даже в условиях активной аэрации в активном иле присутствуют анаммокс-бактерии, которые, вероятно, вносят определенный вклад в общее удаление азота.

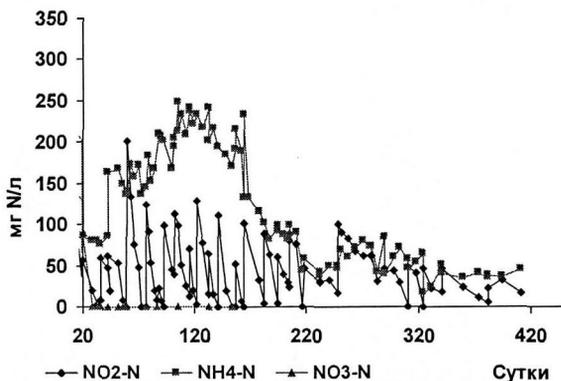


Рис. 6. Изменение концентрации аммонийного и нитритного азота в реакторе с активным илом.

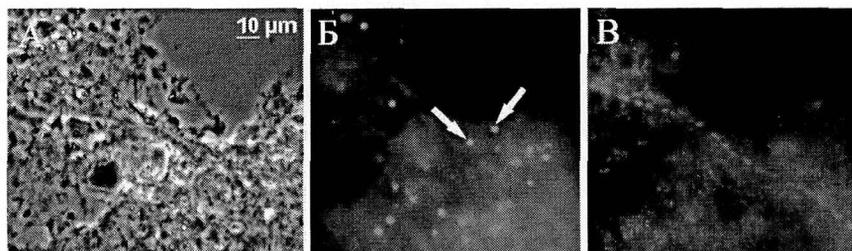


Рис. 7. *In situ* гибридизация образца с Су3-меченым олигонуклеотидным зондом PLA46 планктомицетов на микрочастице активного ила после 4 месяцев культивирования: А - фазовый контраст, Б - микрофотографии гибридизации с зондом, В - окраска ДАФИ.

## 2. Удаление азота в результате процессов денитрификации и анаммокс в системе микроаэрофильно-аэробной очистки сточных вод

Как показывает практика очистки сточных вод, для эффективного удаления азотсодержащих загрязнений в рамках традиционной технологии нитри-денитрификации соотношение БПК<sub>5</sub>/азот в сточной воде должно быть не ниже 6 (Николаев и др., 2009). В результате физико-химической предобработки коагулянтном на КОС «ЭКОС» до половины органических загрязнений удаляется непосредственно перед биологической очисткой, и соотношение БПК<sub>5</sub>/азот в

очищаемой воде становится меньше б. В то же время качество очищенной на КОС воды соответствует жестким нормативам сброса в водные объекты рыбохозяйственного значения (Табл. 1).

Несхождение баланса по азоту позволило предположить, что на станциях очистки наряду с традиционной нитри-денитрификацией протекает относительно недавно открытый автотрофный процесс анаммокс, который не нуждается в присутствии органического донора электронов. Для подтверждения этого предположения в биопленках прикрепленного ила методами лабораторного культивирования были исследованы процессы образования молекулярного азота в пробах активного ила из КОС №3 и №6.

Таблица 1. Содержание основных загрязнений в сточной воде, поступающей на очистку на КОС «ЭКОС» и выпускаемой после очистки в реку Мзымта.

Основные загрязнения	Концентрация на входе, мг/дм <sup>3</sup>	Концентрация на выходе, мг/дм <sup>3</sup>
БПК полное	149.5	2.8
Азот аммонийный	18.3	0.33
Азот нитритов	0.1	0.005
Азот нитратов	0.0	4.8

**2.1. Процессы денитрификации и анаммокс в периодических накопительных реакторах.** Основную работу по исследованию анаммокс-процесса в периодических реакторах проводили с обрастаниями на ершах из денитрификаторов 1-ой и 2-ой ступени (Д-1 и Д-2) станции КОС №6, отобранными после 8 месяцев эксплуатации станции. В предварительных опытах с пробами свежего активного ила из обеих КОС было показано, что в анаэробных условиях идет активное образование метана, а в аэробных его окисление. Во всех реакторах наблюдались очень похожие ход и результаты экспериментов по исследованию образования молекулярного азота (рис. 8, Табл. 2). В течение первого месяца в реакторах шло потребление нитрита и аммония, свидетельствующее об активности анаммокс-бактерий, а так же наблюдалось небольшое образование метана. В последующие три-четыре месяца шло активное потребление нитрита, без уменьшения концентрации аммония. Более того, шло образование аммония из неактивной биомассы, и осуществлялся процесс денитрификации. Тем не менее, из данных таблицы 2 и из полного уравнения (1) анаммокс-реакции



следует, что вклад анаммокс-процесса в первые 2-3 недели культивирования мог составлять до 30% от общего удаленного азота, а в период активной денитрификации около 10%. При этом исходные биопленки на ершах разрушились, что свидетельствует об изменении микробной популяции по сравнению с началом эксперимента.

Существенное снижение содержания органических веществ в культивируемой среде к концу пятого месяца эксперимента свидетельствовало об уменьшении интенсивности процессов деградации органических веществ. Только в это время стало возможным создание селективных условий для

анаммокс-бактерий. В обоих реакторах началось потребление нитрита и аммония в соотношении  $N-NO_2/N-NH_4 \approx 1.29$ , что свидетельствует о процессе анаммокс (Табл. 2).

Таблица 2. Средняя скорость потребления(-) или образования(+) нитрита и аммония в разные периоды культивирования активного ила из 1-го и 2-го денитрификаторов станции №6.

Период измерения, месяц	Д1		Д2	
	N-NO <sub>2</sub> , мг/(л*сутки)	N-NH <sub>4</sub> , мг/(л*сутки)	N-NO <sub>2</sub> , мг/(л*сутки)	N-NH <sub>4</sub> , мг/(л*сутки)
1	-7,5	-3,5	-7,8	-2,5
2	-7,5	0	-11	0
3	-10,2	0	-10,4	-1,0
4	-12,5	-1,0	-10,3	-1,1
5	-13	-2,1	-11,5	-1,5
Период превалирования процесса анаммокс				
6	-1,9	-0,8	-3,5	-2,3
7	-2,5	-2,1	-3,1	-2,5
8	-2,1	-2,2	-2,6	-2,2
9	-2	-2,2	-2,5*	-2,4*
10	-2,2	-1,2	-7,9*	-5,0*
11	-1,1	-1,3	-4,8*	-4,6*
12	-6,7	-2,8	-4,6*	-5,1*
13	-6,5	-4,8	-5,2*	-4,3*
14	-9,2	-8,0	-7,0*	-6,2*
15	-9,5	-10,8	-3,7*	-3,5*

Примечание: \*- после отбора большей части содержимого из периодического реактора в проточный гибридный реактор.

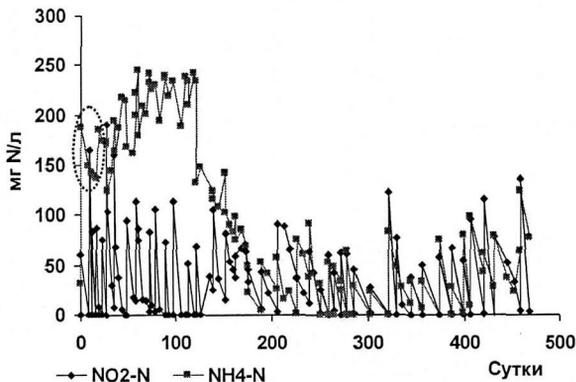


Рис. 8. Изменение концентрации аммонийного и нитритного азота в реакторе с прикрепленным илом из денитрификатора 2-ой ступени (Д-2) КОС №6.

Образование молекулярного азота уменьшилось по сравнению с периодом денитрификации. В целом, сравнивая результаты культивирования проб ершей с обрастаниями из

2-х последовательных денитрификаторов Д1 и Д2 КОС №6, отмечено, что к концу 8 месяца активность анаммокс-процесса была несколько выше в реакторе Д2. К тому же, период активной денитрификации, после которого стало заметно потребление аммонийного азота анаммокс-бактериями, в реакторе Д2 закончился почти на 1 месяц раньше, чем в реакторе Д1 (табл. 2). Для подбора

условий активного роста анаммокс-бактерий было решено инокулировать проточный реактор прикрепленным илом из денитрификатора Д2.

В реакторе с активным илом из денитрификатора станции №3, отобранном после 10 месяцев эксплуатации станции, в первую неделю эксперимента наблюдалось снижение концентрации аммонийного азота, затем в течение около трех месяцев культивирования потребления аммония не наблюдалось (рис. 9). Более того, шло активное образование аммония вследствие лизиса клеток неактивной биомассы. Потребление аммония постепенно начало превышать его образование примерно к 80 суткам, а впоследствии потребление аммония и нитрита стало близким к эквимолярному. Таким образом, дефицит растворенного кислорода и органических веществ — важные условия для

существования анаммокс-бактерий в системах очистки сточных вод.

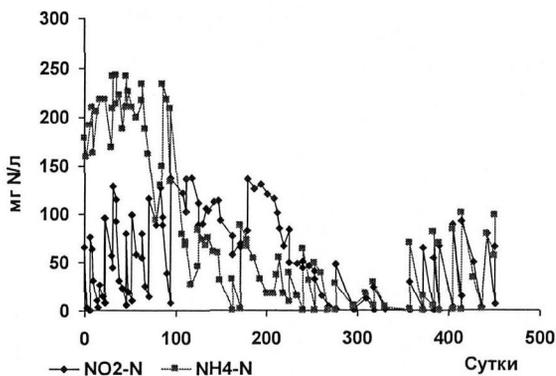


Рис. 9. Изменение концентрации аммонийного и нитритного азота в реакторе с активным илом, отобранном из денитрификатора КОС №3 после 10 месяцев эксплуатации.

В результате исследования проб прикрепленного активного ила, отобранных из денитрификатора станции №3 через 17 и 22

месяцев с момента запуска станции, показано, что активность анаммокс-процесса *in situ* по мере эксплуатации станции увеличивалась. На это указывало увеличение скоростей потребления аммонийного азота в начальный период (2-3 недели) культивирования этих проб. За период эксплуатации станции после отбора первой и последней проб (12 мес.) скорость потребления аммонийного азота повысилась на 8-10 %. Это свидетельствует об увеличении активности анаммокс-бактерий в активном прикрепленном иле. Результаты исследований свидетельствуют о благоприятных условиях для развития анаммокс-бактерий в прикрепленном активном иле станции очистки сточных вод с физико-химической предобработкой и рециклом воды из аэротенка в микроаэрофильный денитрификатор.

**2.2. Исследование влияния факторов внешней среды на скорость удаления азота.** Процессы удаления азота (анаммокс в сочетании с денитрификацией) протекали в интервале температур от 10 до 40°C с широким оптимумом при 25-35°C (рис. 10а). При температуре 40°C скорость процесса была намного ниже, чем при 35°C, т.е. резко падала. Достаточно высокая скорость процесса наблюдалась при пониженной температуре. При 10 и 15°C она была всего в два

с половиной раза ниже, а при 20°C в полтора раза ниже, чем при оптимальной температуре.

Исследование влияния pH исходной среды на скорость потребления аммония и нитрита показало, что процесс удаления азота за счет анаммокс-процесса протекал в интервале начального pH от 6 до 9 с оптимумом при pH от 7 до 8. (рис. 10б). В вариантах опыта с начальной кислой реакцией среды активность анаммокс-бактерий была ниже в 3 раза. К концу опыта, во всех флаконах, за исключением флаконов с исходным pH 9, произошло подщелачивание среды и pH повысился до величин от 7.82 (исходный pH 6.0) до 8.7 (исходный pH 8.5). Таким образом, скорость процесса анаммокс резко возрастает при повышении pH от 6.5 до 7.0, остается максимальной в интервале pH от 7.0 до 8.0 и снижается при дальнейшем повышении pH.

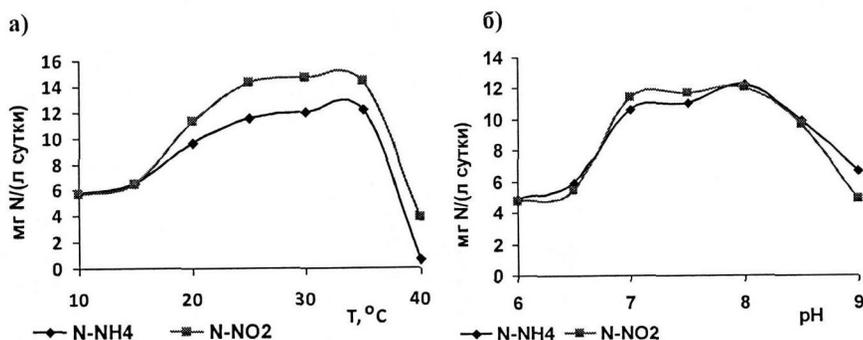


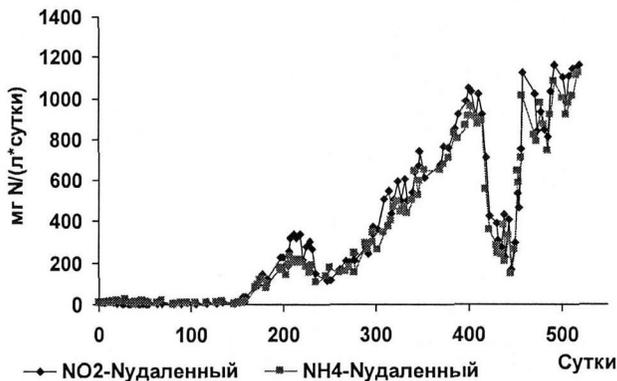
Рис. 10. Влияние температуры (а) и исходной реакции среды (б) на среднюю скорость потребления нитрита и аммония в процессе анаммокс.

**2.3. Исследование процессов образования молекулярного азота и накопления анаммокс-бактерий в проточном гибридном реакторе.** В условиях культивирования при постоянном протоке среды, не содержащей органических веществ и других акцепторов электронов помимо нитрита, создаются элективные условия для развития анаммокс-бактерий. При росте анаммокс-бактерий pH среды повышается (Tang et al., 2009). Другие микроорганизмы в таких условиях погибают или вымываются из реактора. Таким способом были выделены все известные на сегодняшний день культуры анаммокс-бактерий (Zhang et al., 2008). После девяти месяцев культивирования в стационарном периодическом реакторе ерш с прикрепленной и взвешенной биомассой из денитрификатора второй ступени КОС №6 был перенесен в колонку проточного реактора.

2.3.1. Вывод на рабочий режим проточного анаммокс-реактора и исследование его работы при постепенном увеличении нагрузки по азотным субстратам. При переносе ерша из периодического в проточный реактор большая часть биомассы свалилась с волокон ершей, и в нижней части колонки проточного реактора

образовался слой микробного осадка. В первые месяцы культивирования суточное потребление общего азота не превышало 10-20 мг N/л объема реактора, с эффективностью удаления азота около 20% (рис. 11, рис. 12а). Величина ХПК в нижней части реактора на 40-е сутки составляла около 200 мг/л. При дробной подаче среды с невысокой концентрацией субстрата это способствовало развитию гетеротрофных денитрифицирующих бактерий в нижней части реактора и удалению части нитритного азота в процессе денитрификации. Соотношение удаленного нитритного и аммонийного азота было ниже 1 (рис. 12а), что указывало на неполное удаление аммония и в этот период. Только после 4-х месяцев культивирования параллельно с увеличением нагрузки на реактор по азоту началось постепенное увеличение скорости удаления азота. Так за 5-ый месяц по сравнению с предыдущим общее удаление азота выросло в 3 раза, а к концу 6-го месяца уже в 26 раз, превысив 200 мг N/(л\*сутки) (рис. 11). После 5 месяцев культивирования ХПК в реакторе снизился до предела чувствительности метода, летучие жирные кислоты (ЛЖК) также не определялись, что свидетельствовало о вымывании из реактора продуктов лизиса неактивной биомассы ила. Соотношение удаленного нитритного и аммонийного азота возрастало и приблизилось к 1,3, что соответствует процессу анамнокс, и эффективность удаления азота возрастала (рис. 12а, рис. 12б).

На 163-е сутки реактор был переведен на проточный режим с подачей порций среды 16 раз в сутки, постепенно увеличивалась нагрузка повышением концентраций нитритного и аммонийного азота и объема подаваемой среды (табл. 3). При повышении концентрации нитрита до 150-155 мг/л (220-е сутки) произошло снижение скорости потребления азотных соединений и образования молекулярного азота, возможно из-за ингибирования нитритом (рис. 11). Восстановление прежней активности заняло около месяца. Таким образом, анамнокс-бактерии довольно чувствительны к резкому повышению концентрации нитрита. При накоплении культуры анамнокс-бактерий очень важен контроль над процессом адаптации к меняющимся условиям



культивирования, следует избегать резких скачков в увеличении нагрузки на реактор (Tang et al., 2009).

Рис. 11. Изменение скорости удаления азота в проточном реакторе.

Количество образуемого молекулярного азота довольно хорошо

коррелировало с теоретически ожидаемым в течение всего периода культивирования (рис. 13). При уменьшении нагрузки по азоту (410-445 сутки) скорость его потребления биомассой анаммокс-бактерий, а соответственно и количество образованного газа уменьшались (рис. 11, рис. 13). При последующем увеличении концентрации азотных субстратов скорость потребления повышалась без фазы задержки.

К 500-м суткам эксперимента нагрузка по азоту составила 3750 мг N/л в сутки при эффективности удаления более 90%, причем такая величина нагрузки реактора по азоту сравнима с лучшими мировыми достижениями для лабораторных реакторов. Биомасса в реакторе приобрела красноватую окраску, хорошо просматривались обрастания на волокнах ершей в виде скопления колоний красного цвета.

На основании данных о скорости потребления аммонийного азота за период от 262 до 415 суток культивирования (рис. 11) было определено время удвоения анаммокс-бактерий в проточном реакторе, которое составило около 1 месяца.

Таблица 3. Увеличение нагрузки по азоту в проточном реакторе.

Сутки	N-NO <sub>2</sub> , мг/л	N-NH <sub>4</sub> , мг/л	Скорость протока среды, л/сутки	Нагрузка по азоту, мг/(л*сутки)	Скорость образования N <sub>2</sub> , л/сутки
0 – 40	50	50	0.9	112.5	0.045
41 – 150	50	50	1	125.0	0.070
151 – 162	50	50	1.2	150.0	0.080
163 – 176	100	100	1	250.0	0.150
177 – 205	100	100	2	500.0	0.250
206 – 220	150	114	2	660.0	0.380
221 – 224	135	103	2	595.0	0.320
225 – 228	120	91	2	527.5	0,310
229 – 231	135	103	2	595.0	0.390
232 – 234	145	110	2	637.5	0.400
235 – 277	135	103	2	595.0	0.395
278 – 308	135	103	3	892.5	0.510
309 – 316	145	145	3	1087.5	0.720
317 – 327	155	155	3	1162.5	0.840
328 – 333	165	165	3	1237.5	0.910
334 – 345	165	165	3.5	1443.8	0.985
346 – 373	175	175	3.5	1531.3	1.050
374 – 380	210	200	3.5	1793.8	1.155
381 – 409	225	250	3.5	2078.1	1.190
410 – 445	45	45	3.5	393.8	0.490
446 – 545	225	225	4.5	2531.3	1.485
545-по н.в.	250	250	6	3750.0	2.220

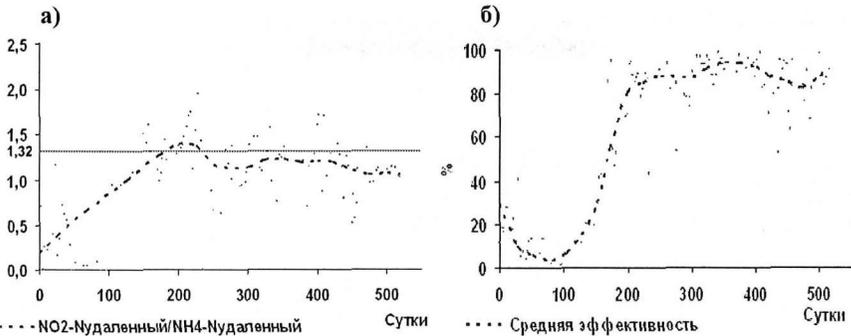


Рис. 12. Соотношение потребленного нитритного и аммонийного азота (а), а также эффективность удаления азота (б) при проточном культивировании.

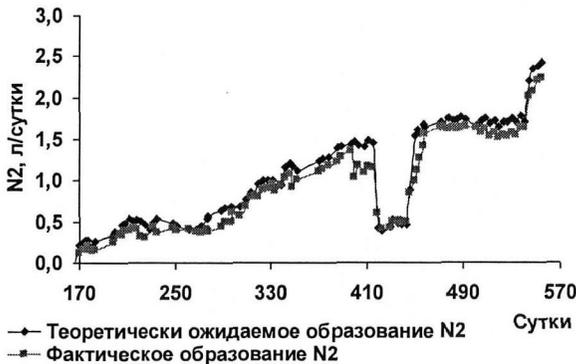


Рис. 13. Скорость расчетного и наблюдаемого образования молекулярно азота в проточном реакторе. *Примечание:* падение скорости образования  $N_2$  в период с 410-х по 445-е сутки обусловлено уменьшением нагрузки по азоту.

2.3.2. Изменение концентрации азотных субстратов и pH в проточном реакторе по высоте колонки. Для понимания процесса распределения концентраций азотных субстратов и кислотности по высоте колонки были проведены соответствующие измерения до и после подачи свежей среды насосом в реактор (табл. 4).

Показано, что концентрация нитритного и аммонийного азота в верхней части колонки даже в момент подачи среды не превышала 30 – 40 мг/л, что в 3 – 4 раза меньше, чем в нижней части. Это указывает на то, что по высоте реактора создаются элективные условия для развития анаммокс-бактерий с разными потребностями к концентрации субстратов в среде. В проточном реакторе с увеличением скорости использования азота, а следовательно и скорости роста анаммокс-бактерий, наблюдалось увеличение pH в реакторе, причем увеличение pH было особенно заметно с увеличением скорости потребления азота от 0 до 400-500 мг N/л в сутки (рис. 14). Реакция среды, подаваемой в реактор близка к

нейтральной. В верхней части и на выходе из реактора величина рН была около 8.5. При этом на волокнах ершей наблюдалось развитие анамокс-бактерий.

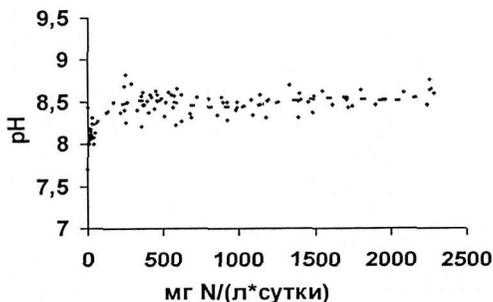


Рис. 14. Повышение рН среды в реакторе при увеличении скорости удаления азота.

Возможно, в частях реактора, где различаются условия по концентрации субстратов и рН, развиваются разные штаммы или виды анамокс-бактерий

Таблица 4. Показания рН и концентраций нитритного и аммонийного азота по высоте колонки непосредственно после (1) и перед (2) подачи очередной порции исходной среды.

Анализируемая проба	рН		N-NO <sub>2</sub> , мг/л		N-NH <sub>4</sub> , мг/л	
	1	2	1	2	1	2
Исходная среда	7,75	7,79	110,18	108,6	93,10	92,19
Низ колонки	7,98	8,18	81,17	46,25	59,90	17,42
Середина колонки	8,14	8,48	43,22	17,65	38,81	0
Верх колонки	8,27	8,50	33,9	14,82	24,89	0

**2.3.3. Идентификация анамокс-бактерий.** В пробах активной биомассы, взятых из нижней части проточного реактора после 9 месяцев культивирования, с помощью зонда Аmх368 были обнаружены скопления красноватых колоний, характерных для анамокс-бактерий, которые представляли значительную часть активной микробной популяции (рис. 15). При этом в осадке в нижней части реактора анамокс-бактерии развивались в виде шарообразных микроколоний, окруженных плотной оболочкой, а на поверхности нитей ершей в виде сплошных биопленок с неровной поверхностью.

Электронно-микроскопический анализ ультратонких срезов показал, что анамокс-бактерии в условиях проточного реактора существуют в виде микроколоний, окруженных плотной оболочкой, и погружены в гликокаликс (рис. 16а). Строение их клеток типично для анамокс-бактерий: большую часть клетки занимает анамоксосома, которая ограничена 2-мя клеточными мембранами (рис. 16б).

В результате амплификации фрагментов генов и клонирования продуктов амплификации образца биомассы красноватого цвета, взятого из нижней части проточного реактора после 21 месяца его работы, было получено и проанализировано 89 клонов с последовательностями, полученными в результате ПЦР с праймером P1a 46F (две библиотеки), и 46 клонов – с праймером 11F. Из клонов, полученных в результате ПЦР с праймером P1a 46F, 31 клон имели 93% сходство с последовательностями некультивируемых

бактерий, родственных Chloroflexi, 7 клонов имели 82% сходство с некультивируемыми планктомицетами, 48 клонов имели 95% сходство с *Candidatus Jettenia asiatica* и 2 оставшихся клона имели 94% сходство с *Candidatus Brocadia fulgida* (рис. 17). Клоны, имеющие последовательности, полученные с помощью праймера 11F, не имели сходства с последовательностями анаммокс-бактерий.

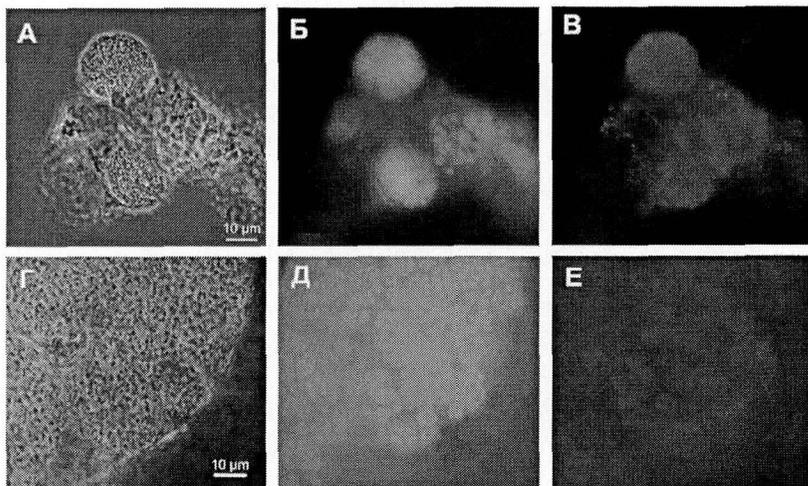


Рис. 15. Микрофотография анаммокс-бактерий в образцах осадка (А, Б, В) и биопленки (Г, Д, Е), взятых из нижней части проточного реактора после 9 месяцев культивирования: А, Г - фазовый контраст; Б, Д - гибридизация с зондом Amx368; В, Е - окраска ДАФИ.

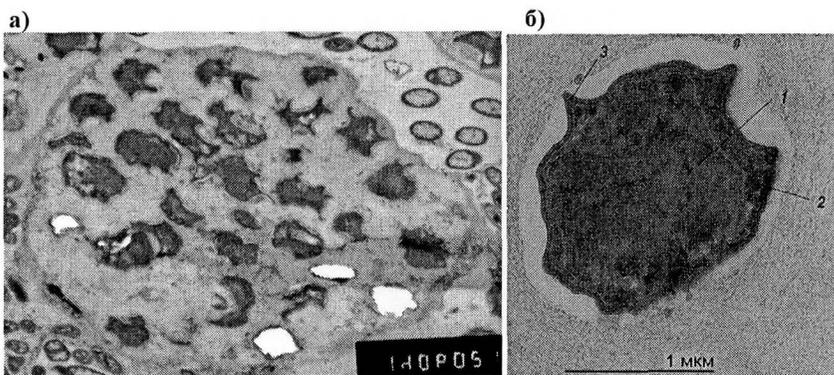


Рис. 16. Ультратонкий срез микроколонии анаммокс-бактерий (а) и строение клетки анаммокс-бактерии (б) из проточного реактора. 1 - анаммоксосома, 2 - рибоплазма, 3 - париоплазма.

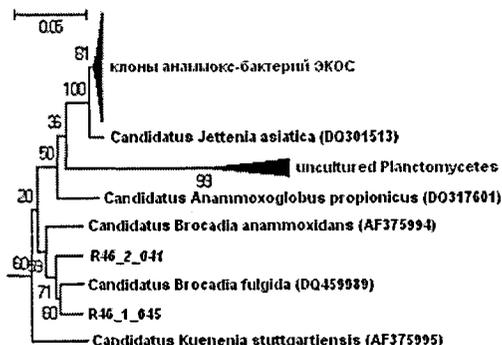


Рис. 17. Филогенетическое положение сходства по данным сиквенса 16S рРНК анаммокс-бактерий из проточного реактора.

Эти результаты с большой вероятностью позволяют предположить, что в проточном реакторе, инокулированном исходно микробной популяцией из станции очистки сточных вод ЭКОС №6, расположенной в долине реки

Мзымта в поселке строителей олимпийского объекта РЖД, присутствует новый вид анаммокс-бактерий (рабочее название «есос»). Более того, не исключено, что благодаря градиенту рН и концентраций азотных субстратов в верхней части колонки могла накопиться биомасса другого нового вида анаммокс-бактерий. Эти предварительные результаты открывают перспективу дальнейших исследований.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью биотехнологических, микробиологических, молекулярных и электронно-микроскопических методов проведено исследование анаэробных процессов (метаногенез и анаммокс), протекающих в системах аэробной очистки бытовых сточных вод с иммобилизацией биомассы активного ила.

Показано, что даже в биопленках, развивающихся в условиях активной аэрации, анаэробные микроорганизмы могут составлять значительную часть прикрепленных микроорганизмов. Вследствие увеличения роли анаэробных микроорганизмов, образующих гораздо меньше микробной биомассы по сравнению с аэробными микроорганизмами, наблюдается существенное уменьшение продукции избыточного ила на станциях аэробной очистки сточных вод с иммобилизацией микробной биомассы. Во взвешенном и в иммобилизованном иле присутствуют все ключевые группы анаэробных микроорганизмов, способных разлагать продукты кислотного брожения – важных предшественников метана. В активном иле функционирует полный метановый цикл: метан может одновременно образовываться в анаэробной зоне биопленки и окисляться во внешнем аэробном слое, а также свободноплавающим илом.

Показано, что удаление азота в системах аэробной очистки бытовых сточных вод с иммобилизацией микроорганизмов происходит в сопряженных процессах нитрификации, денитрификации и анаэробного окисления аммония (анаммокс). При культивировании свежих проб прикрепленного ила в селективной для анаммокс-бактерий среде наблюдается удаление аммонийного азота, что свидетельствует о возможности протекания анаммокс-процесса.

Отмечено, что во взвешенном иле аэробного биореактора условия для развития анаммокс-бактерий относительно неблагоприятные. Вследствие постоянного протока и рецикла водно-иловой массы взвешенный осадок подвергается резкой смене условий среды, таких как аэрация, состав и концентрация соединений азота, окислительно-восстановительный потенциал и др. Для чрезвычайно медленно растущих микроорганизмов смена условий среды имеет отрицательное воздействие. Большая часть аммонийного азота, содержащегося в сточной воде и необходимого для функционирования анаммокс-бактерий, окисляется нитрифицирующими бактериями, которые находятся как в свободноплавающем иле, так и в поверхностных слоях биопленок прикрепленного на ершах ила. Таким образом, в активном иле аэробного биореактора удаление азота происходит преимущественно за счет процессов нитри- и денитрификации, однако даже в условиях активной аэрации в нем присутствуют анаммокс-бактерии, которые вносят определенный вклад в общее удаление азота.

Введение ряда приемов, а именно (1) физико-химической предобработки и (2) рецикла воды из аэробного биореактора в микроаэрофильный денитрификатор, в технологическую схему аэробной очистки с (3) иммобилизацией микроорганизмов позволяет существенно увеличить роль процесса анаммокс в удалении соединений азота. В ходе физико-химической предобработки коагулянтом до половины органических загрязнений изымается из очищаемой воды непосредственно перед биологической очисткой, создавая тем самым дефицит доноров электрона для гетеротрофных денитрификаторов, а следовательно экологическую нишу для развития автотрофных анаммокс-бактерий. Окисленные формы азота, благодаря рециклу очищаемой воды из аэробного биореактора в денитрификатор, выделенного в отдельный блок с микроаэрофильным режимом, удаляются в сопряженных процессах денитрификации и анаммокс (деаммокс), причем вклад последнего может составлять до трети от общего удаленного азота. Регулярное исследование проб прикрепленного активного ила в течение года эксплуатации станции очистки сточных вод №3 показало увеличение активности анаммокс-процесса *in situ*. Показано, что процесс удаления азота за счет анаммокс-процесса протекал в интервале начального рН от 6 до 9 с оптимумом при рН от 7 до 8, а также в интервале температур от 10 до 40°C с широким оптимумом при 25-35°C. На основании данных о скорости потребления аммонийного азота было измерено время удвоения анаммокс-бактерий в проточном реакторе, которое составило около месяца. Невысокая скорость роста анаммокс-бактерий указывает на необходимость повышения нагрузки по азоту путем увеличения скорости протока. Методом проточного культивирования получена биомасса, значительную часть активной микробной популяции которой представляли анаммокс-бактерии, что было подтверждено *in situ* гибридизацией со специфичным зондом *Apx368*.

Обнаружение функционирования процесса анаммокс в биопленках активного иммобилизованного ила позволило существенно оптимизировать процесс очистки воды и повысить эффективность удаления азота, за счет

развития анаммокс-бактерий, которые являются наиболее медленно растущими бактериями из известных на сегодняшний день. Это достигнуто, в первую очередь, путем изменения режима аэрации в биореакторах. В денитрификаторе она снижена до интенсивности, необходимой для слабого перемешивания, предотвращающего образование осадка и обеспечивающего контакт иммобилизованного активного ила с очищаемой водой. В аэротенке аэрация снижена до уровня, обеспечивающего преимущественное образование нитрита, являющегося субстратом роста и для анаммокс-бактерий, и для денитрификаторов. При этом была достигнута экономия за счет уменьшения расхода энергии на перемешивание и подачу воздуха. Для поддержания оптимальной слабощелочной среды в денитрификаторе и обеспечения анаммокс-бактерий источником углерода применено добавление небольших количеств бикарбоната.

Получен патент на комплектно-блочную модульную очистную установку с эффективным удалением азота с помощью иммобилизованного аэробно-анаэробного микробного сообщества, включающего анаммокс-бактерии.

В настоящее время продолжается работа по совершенствованию технологии, повышению скорости процесса очистки и накопления биомассы анаммокс-бактерий. В лабораторном анаэробном проточном гибридном реакторе путем постепенного увеличения нагрузки по азоту, достигнуты высокая плотность анаммокс-бактерий и скорость образования молекулярного азота, соответствующая самым высоким достижениям зарубежных исследователей. Разрабатываются методика и рекомендации для практического применения процесса анаммокс для очистки концентрированных стоков с высоким содержанием азотных загрязнений.

Результаты предварительной идентификации анаммокс-бактерий из станций очистки сточных вод ЭКОС, расположенных в долине реки Мзымта в Сочинском регионе указывают на обнаружение нового вида или видов анаммокс-бактерий и открывают перспективу продолжения фундаментальных исследований анаммокс-бактерий.

## ВЫВОДЫ

1. В результате проведенных исследований активного ила из станций аэробной очистки сточных вод в Красной Поляне и аэробно-анаэробной очистки сточных вод в двух КОС ЭКОС подтверждена высокая активность микробного ила, иммобилизованного на нитях ершового носителя.

2. В активном прикрепленном иле из обоих типов станций очистки сточных вод показано присутствие аэробных и анаэробных микроорганизмов и обнаружено функционирование метаногенного микробного сообщества, которое осуществляет полную анаэробную деградацию органических соединений до метана и углекислоты.

3. В прикрепленном на ершовом носителе иле происходит одновременное образование и окисление метана. Метан может образовываться в анаэробной

зоне биопленки и окисляться во внешнем аэробном слое, а также свободноплавающим илом.

4. Высокое содержание анаэробных микроорганизмов в активном иле обуславливает низкий прирост микробной биомассы и свидетельствует о наличии в биопленках на ершовом носителе анаэробных микро-зон с низким окислительно-восстановительным потенциалом среды, благоприятным для развития анаммокс-бактерий.

5. Показано, что в процессе БХ-ДЕАМОКС (технология компании «ЭКОС») удаление азота в виде  $N_2$  происходит за счет двух анаэробных процессов – денитрификации и анаммокс, функционирование которых показано методами лабораторного культивирования. То есть, получены доказательства наличия процесса анаммокс при очистке бытовых сточных вод в полномасштабных станциях очистки с применением комбинированной системы с физико-химической предобработкой и биологической очистки

6. В результате исследования процесса анаммокс в периодических и проточном реакторах накоплена активная микробная биомасса, обогащенная анаммокс-бактериями, потребляющая азотные субстраты в соотношении  $N-NO_2/N-NH_4$  близким к 1.3, что соответствует процессу анаммокс; достигнута нагрузка по азоту в 3750 мг N/л в сутки с эффективностью удаления около 95%.

7. На основе способности окислять аммоний нитритом и молекулярными методами *in situ*-гибридизации (FISH) и амплификации фрагментов генов с последующим клонированием продуктов амплификации в биомассе накопительных реакторов обнаружены бактерии, относящиеся к филогенетической группе анаммокс-планктомицетов, с большой вероятностью принадлежащие к новому виду анаммокс-бактерий.

8. Впервые показано, что осуществление процесса анаммокс при низком содержании органических веществ в очищаемой воде обеспечивает эффективное удаление азота и обеспечивает глубокую очистку воды.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. *Ножевникова А.Н., Симањкова М.В., Литтти Ю.В.* Использование микробного процесса анаэробного окисления аммония (анаммокс) для биотехнологической очистки стоков // Биотехнология. 2011. № 5. С. 8-31.

2. *Ножевникова А.Н., Литтти Ю.В., Некрасова В.К., Куличевская И.С., Григорьева Н.В.* Обнаружение и характеристика анаэробного окисления аммония (АНАММОКС) в иммобилизованном активном микробном иле локальных станций очистки сточных вод // Микробиология. 2012. Т 81. № 1. С. 28-38.

3. *Литтти Ю.В., Некрасова В.К., Куликов Н.И., Ножевникова А.Н.* Образование и окисление метана в иммобилизованном иле в системе очистки сточных вод с активной аэрацией // Микробиология. — 2013. — Т. — в печати.

4. *Куликов Н.И., Гвоздяк П.И., Зубов М.Г., Ножевникова А.Н., Литтти Ю.В.* Комплектно-блочная модульная очистная установка заводского изготовления // Патент РФ 94568, U1. 2010.

5. *Литтти Ю.В., Ножевникова А.Н., Зубов М.Г., Куликов Н.И.* Очистка бытовых сточных вод с низкой концентрацией загрязнений с реализацией процесса анаммокс //

Материалы конференции «Энергосбережение и энергоэффективность на предприятиях водопроводно-канализационного хозяйства», 6-7 июня 2012 г., Москва. АКВАТЭК.

6. Литтми Ю.В., Некрасова В.К., Симанькова М.В., Ножевникова А.Н. Обнаружение метанового цикла в системе аэробной очистки воды с прикрепленным активным илом // Сборник тезисов V Молодежной школы-конференции с международным участием "Актуальные аспекты современной микробиологии", 26-27 октября 2009 г., Москва, стр. 38.

7. Nozhevnikova A., Littti Yu., Nekrasova V., Kulikov N., Simankova M. Methane production and oxidation in immobilized active sludge from aerobic wastewater treatment installation // Book of abstracts III International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld2009), 2-4 December 2009, Lisbon (Portugal), p. 83.

8. Литтми Ю.В., Некрасова В.К., Григорьева Н.В., Куличевская И.С., Ножевникова А.Н. Обнаружение процесса Анаммокс в иммобилизованном активном иле из очистных станций, работающих по технологии компании ЭКОС // Сборник тезисов 6-ой Молодежной школы-конференции с международным участием "Актуальные аспекты современной микробиологии", 25-27 октября 2010 г., Москва, стр. 113.

9. Литтми Ю.В., Некрасова В.К., Куличевская И.С., Ножевникова А.Н. Исследование роли анаэробных микробных процессов при аэробной очистке сточных вод в биореакторах с иммобилизацией активного ила // Материалы VI Московского международного конгресса "Биотехнология: состояние и перспективы развития", часть 2, 21-25 марта 2011 г., Москва, стр. 45-46.

10. Ножевникова А.Н., Литтми Ю.В., Некрасова В.К., Куличевская И.С. «Микробиологическая характеристика сообществ микроорганизмов в биореакторах многофазной системы. Совместные исследования по использованию бактерий «Анаммокс» в системе доочистки сточных вод на локальных КОС р-на Адлер-Красная поляна» // Тезисы конференции «Инновационные технологии и оборудование для очистки сточных вод и обработки осадка», Сочи, 19-23 октября 2010 г, стр. 5.

11. Ножевникова А.Н., Литтми Ю.В., Некрасова В.К., Куличевская И.С. Анаэробные микробные процессы в аэробных системах очистки с иммобилизованным активным илом // Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием. АВТОТРОФНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ. К 85-летию со дня рождения академика РАН Е.Н.Кондратьевой. МГУ им. М.В.Ломоносова, Биологический факультет 23-26 декабря 2010 г. Москва, МАКС Пресс 2010, стр. 75

12. Ножевникова А.Н., Калитстова А.Ю., Литтми Ю.В., Некрасова В.К. Формирование специфических микробных сообществ в антропогенных экосистемах (на примерах полигонов ТБО и систем очистки сточных вод) // Международная конференция «Экология и геохимическая деятельность микроорганизмов экстремальных местообитаний» Улан-Удэ (Россия) – Улаанбаатар (Монголия), 5-16 сентября 2011 г., стр. 140-141.

13. Nozhevnikova A., Littti Yu., Nekrasova V., Kulitchevskaya I. Anaerobic processes (Methanogenesis and Anammox) in aerobic wastewater treatment installations with immobilized microorganisms // BIT's 1st World Congress of Environmental Biotechnology – 2011, October 19-22, 2011, p. 87.

Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю д.б.н., Ножевниковой А.Н. за всестороннюю поддержку при выполнении диссертации, Некрасовой В.К. за неоценимую помощь при планировании и выполнении работы, к.б.н. Куличевской И.С. и д.б.н. Кузнецову Б.Б. за помощь в проведении молекулярно-биологических исследований, к.б.н. Григорьевой Н.В. за помощь в проведении химических анализов, Кострикиной Н.А. за помощь в проведении электронно-микроскопических исследований, а также всем сотрудникам лаборатории микробиологии антропогенных мест обитания ИНМИ РАН за постоянную поддержку при выполнении диссертационной работы.

Подписано в печать: 01.11.2012

Заказ № 7781 Тираж - 100 экз.

Печать трафаретная.

Типография «11-й ФОРМАТ»

ИНН 7726330900

115230, Москва, Варшавское ш., 36

(499) 788-78-56

[www.autoreferat.ru](http://www.autoreferat.ru)