

УДК 579.66

АНАЭРОБНОЕ ОКИСЛЕНИЕ АММОНИЯ (АНАММОКС) В БИОПЛЕНКАХ ИММОБИЛИЗОВАННОГО АКТИВНОГО ИЛА ПРИ ОЧИСТКЕ СТОЧНЫХ ВОД С НИЗКОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ ЗАГРЯЗНЕНИЙ

© 2012 г. А. Н. Ножевникова*,¹, Ю. В. Литги*, В. К. Некрасова*, И. С. Куличевская*,
Н. В. Григорьева*, Н. И. Куликов**, М. Г. Зубов**

* Учреждение Российской академии наук Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва

** ЗАО “Компания ЭКОС”, Сочи

Поступила в редакцию 13.04.2011 г.

Исследовано образование молекулярного азота микробной популяцией иммобилизованного активного ила станций комплексной очистки бытовых сточных вод (КОС), на которых реализуется разработанный ЗАО “Компания ЭКОС” процесс очистки с физико-химической предобработкой и рециклом очищаемой воды. Для иммобилизации микроорганизмов используется жесткий гибкий волокнистый носитель “ерш”. В биопленках, развивающихся на волокнах носителя и в дисперсном иле показано присутствие аэробных и анаэробных микроорганизмов и функционирование метаногенного микробного сообщества. Установлено, что высокая эффективность удаления азота при низком соотношении C/N обусловлена сопряженными процессами нитрификации, денитрификации и анаэробного окисления аммония нитритом (анаммокс), функционирование которых показано методами лабораторного культивирования и исследования процессов в стационарных и проточных реакторах. Показано, что вклад процесса анаммокс может составлять до трети от общего удаленного азота на КОС. Методом флуоресцентной *in situ* гибридизации обнаружены бактерии, относящиеся к порядку *Planctomycetales*, и идентифицированы бактерии “анаммокс”, принадлежащие к этой филогенетической группе. Впервые получены доказательства важной роли процесса анаммокс при очистке сточных вод с низкой концентрацией загрязнений в комбинированной системе физико-химической и биологической очистки (БХ-ДЕАМОКС).

Ключевые слова: анаэробное окисление аммония нитритом, анаммокс, анаммокс-бактерии, аэробная очистка, аэробные, микроаэрофильные, анаэробные условия, биопленки, денитрификация, нитрификация, метаногенез.

В современном мире постоянно возрастает количество сточных вод, образующихся в результате бытовой и хозяйственной деятельности людей, что требует повышения эффективности и удешевления методов их очистки. Основой биологической очистки сточных вод, которая остается наиболее экономичным и экологичным процессом, является аэробная и/или анаэробная деградация и минерализация органических веществ микроорганизмами. Развитие и совершенствование современных методов биологической очистки сточных вод особенно от азотных загрязнений является насущной задачей, так как попадание их в водоемы, в грунтовые и подземные воды катастрофически ухудшает качество пресной воды, необходимой для снабжения населения. В широко применяемой в настоящее время новой технологии очистки бытовых сточных вод анаэробный блок удаления азота (денитрификатор) располагается в начале процесса, и осуществляется ре-

цикл очищенной в аэротенках воды, обогащенной нитратом и нитритом (“Кейптаунская схема”). Это позволяет снять существенную часть азотных загрязнений в начале процесса, сократить время очистки и затраты энергии [1].

В настоящее время большое внимание привлекает процесс анаэробного окисления аммония нитритом с образованием молекулярного азота, возможность которого была доказана термодинамическими расчетами чуть более 30 лет назад [2]. Теоретически предсказанный процесс получил экспериментальное подтверждение только в 90-х годах 20-го века и получил название анаммокс-процесс (ANAMMOX – ANaerobic AMMonium OXidation) [3]. Открытие процесса анаммокс привело к пересмотру биологического цикла азота в биосфере [4]. Перспективным является применение процесса анаммокс для очистки стоков с высоким содержанием аммония [5]. Процесс анаммокс осуществляют новые хемоавтотрофные анаммокс-бактерии, использующие для получения энергии реакцию окисления аммония нитри-

¹ Адресат для корреспонденции (e-mail: nozhevni@mail.ru).

том и использующие в качестве источника углерода углекислоту и/или бикарбонат. Описанные к настоящему времени анаммокс-бактерии относятся к пяти разным родам группы анаммокс-бактерий, входящим в порядок *Planctomycetales*, отдел *Planctomycetes*, домен *Bacteria*. К настоящему времени описано 7 candidatus-видов анаммокс-бактерий. Большинство анаммокс-бактерий, выделенных из сточных вод, развивается в интервале рН от 6.7 до 9.0 с оптимумом рН 8.0–8.3 и оптимальной температурой 35–40°C. Это одни из самых медленно растущих бактерий из известных на сегодняшний день. Согласно данным, опубликованным в 2002–2003 годах, время их удвоения составляет не менее 11 сут [6], а на практике около 2–3 недель [5, 7]. Однако в последнее время было показано, что в зависимости от условий культивирования и метода измерения скорости роста время удвоения анаммокс-бактерий может составлять от 5.5–7.5 [8] до 1.8 суток [9]. Медленный рост анаммокс-бактерий серьезно ограничивает практическое освоение процесса анаммокс. С учетом подбора оптимальных условий для функционирования сопряженного аэробного нитрифицирующего реактора (система SHARON), вывод на режим первого в мире промышленного анаммокс-реактора занял около 4-х лет [10]. К настоящему времени на основе процесса анаммокс разработаны технологические схемы очистки стоков с высоким содержанием азотных загрязнений и работают пилотные и несколько полномасштабных очистных сооружений [11, 12].

В России в Сочинском регионе в долине реки Мзымта в вахтовых рабочих поселках строителей объектов Олимпиады 2014 г. ЗАО “Компания ЭКОС” по собственному проекту построено шесть станций локальной очистки сточных бытовых вод. Качество очищенной на КОС воды соответствует нормам сброса в водоемы рыбохозяйственного назначения, что свидетельствует о высокой эффективности удаления азота. При этом продукция избыточного ила составляет не более 25% по сравнению с традиционной технологией аэробной очистки. Разработанная технология отличается рядом особенностей, создающих условия для развития анаэробных микроорганизмов, в том числе анаммокс-бактерий. Поступающие на очистку сточные воды после механического удаления крупных взвесей проходят физико-химическую обработку коагулянтами на основе полиакриламида для удаления мелких взвесей, вместе с которыми удаляется около половины органического углерода. Концентрация аммония в очищаемых стоках при этом не уменьшается. Далее очищаемая вода поступает на биологическую очистку, которая осуществляется в две ступени – в денитрификаторе со слабой аэрацией и в аэротенке с интенсивной аэрацией. При этом осуществляется рецикл очищаемой воды,

обогащенной нитритом и нитратом, из аэротенка в денитрификатор(ы), где она смешивается с поступающей на очистку водой, содержащей аммоний. На всех ступенях биологической очистки и доочистки применяется жесткая гибкая загрузка в виде ершей для иммобилизации активного ила [13]. На волокнах ершей развиваются биопленки, внутри которых образуются градиенты окислительно-восстановительного потенциала и концентраций субстратов и метаболитов. Между микробными компонентами в биопленках устанавливаются трофические и регуляторные связи вплоть до симбиоза [14, 15]. Низкое соотношение органического углерода и азота в воде, поступающей на очистку, и высокая степень очистки сточной воды от азота в сооружениях, построенных по проекту ЭКОС, позволили предположить возможность участия процесса анаммокс в удалении азота.

Целью работы было получить доказательства осуществления процесса анаэробного окисления аммония нитритом и развития анаммокс-бактерий в биопленках на твердом носителе и в дисперсном иле и ориентировочно оценить вклад этого процесса в удаление азота при очистке низкоконцентрированных сточных вод по технологии ЗАО “Компания ЭКОС”.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Работу проводили с пробами прикрепленного и свободноплавающего активного ила из двух станций очистки сточных вод, построенных в поселках строителей олимпийских объектов вдоль реки Мзымта. Пробы отбирали из КОС № 3 с одним денитрификатором и КОС № 6 с двумя последовательными денитрификаторами (1-я и 2-я ступени). Было исследовано 5 образцов ершей с обрастаниями и 2 образца дисперсного ила. Пробы отбирали 4 раза с интервалом 6 мес. Отобранные пробы немедленно помещали в сосуды объемом 1–3 литра, заливали очищаемой водой, герметично закрывали и транспортировали в течение суток в сумке-термостате при температуре 10–15°C. В лаборатории пробы до постановки опытов хранили при 4°C не более четырех суток.

Использованные среды. Модифицированную среду Пфеннига для метаногенов с добавлением витаминов и микроэлементов готовили по стандартной методике [16].

Среду для нитрифицирующих бактерий готовили согласно [17].

Среда для анаммокс-бактерий содержала в мг/л: NaHCO_3 – 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.12; $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.18; KH_2PO_4 – 0.027; NH_4Cl – от 191 до 391.5; NaNO_2 – от 246 до 665; 1 мл/л р-ра микроэлементов (мг/л): ЭДТА – 5; H_3BO_3 – 0.014;

$\text{CoCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 2$; $\text{ZnCl}_2 - 0.203$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 0.99$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0.25$; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 1.24$; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0.19$; $\text{Na}_2\text{SeO}_3 - 0.105$. pH среды 7.6–7.8. Свежеприготовленную среду продували аргоном. В долгосрочных опытах при стационарном культивировании иногда добавляли в реакторы без смены среды только субстраты для анаммокс-бактерий – NaNO_2 и NH_4Cl до необходимой конечной концентрации.

Среда для денитрифицирующих бактерий по составу была аналогичной среде для анаммокс-бактерий, но без добавления NH_4Cl . В качестве донора электронов и источника углерода служили органические вещества, выделяемые в среду в результате отмирания гетеротрофной биомассы.

Минеральная среда для определения численности аэробных бактерий содержала в г/л: $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0.7$; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} - 1.5$; $\text{KNO}_3 - 1.0$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0.2$; $\text{CaCl}_2 - 0.02$; глюкоза – 2.5; пептон – 2.5; микроэлементы – 1.0 мл/л (состав как в среде для метаногенов).

Краткосрочные опыты. Опыты ставили в стеклянных флаконах объемом 120 мл, которые закрывали резиновыми пробками и металлическими колпачками с отверстием для отбора проб газа. Анализ газов проводили регулярно, как правило, 1 раз в сут; пробы жидкости для анализа pH, ЛЖК, ионов аммония, нитрита и нитрата отбирали по мере необходимости. Все опыты ставили в 3-х повторностях.

Анаэробную деградацию органических веществ с образованием метана в пробах активного ила изучали при 20°C. Объем жидкой фазы (иловая суспензия, разбавленная 1 : 1 средой для метаногенов) – 20 мл, газовая фаза – аргон.

Гетеротрофную денитрификацию в сочетании с процессом анаммокс в свежих пробах исследовали при 30°C. Объем жидкой фазы (измельченная ножницами ершовая масса с прикрепленным илом, разбавленная 1 : 3 средой для денитрифицирующих бактерий) – 100 мл, газовая фаза – аргон. Периодически измеряли состав газовой фазы, pH и концентрации ионов нитрита, нитрата и аммония. После отбора проб для анализа газовую фазу заполняли аргоном. Нитрит натрия добавляли по мере его исчерпания.

Исследование влияния температуры на скорость анаммокс-процесса проводили в интервале температур от 10 до 40°C с шагом в 5°C. Жидкая фаза объемом 60 мл состояла из активного ила из денитрификатора 1-ой ступени, предварительно обогащенного анаммокс-бактериями путем культивирования в стационарном накопительном реакторе в течение шести месяцев, и среды для анаммокс-бактерий в соотношении 1 : 2, газовая фаза – аргон. Периодически измеряли концентрацию аммония и нитрита.

Определение относительной численности аэробных и анаэробных микроорганизмов в биопленках на ершах производили методом предельных разведений. Соскоб с волокон ершей из свежей пробы из КОС № 6 гомогенизировали со стерильными стеклянными бусами на миксере ВП в течение 30 мин в атмосфере аргона. Полученную суспензию в соотношении 1 : 10 разводили для учета анаэробов средой для метаногенов с добавлением глюкозы и пептона (по 2.5 г/л), а для аэробов – средой, состав которой приведен выше. Делали тринадцать 10-кратных разведений и инкубировали анаэробов в герметичных склянках в атмосфере аргона, аэробов – под ватными пробками при 30°C.

Окисление аммония в дисперсном и прикрепленном иле исследовали в аэробных условиях в колбах Эрленмейера. 100 мл среды для нитрифицирующих бактерий инокулировали 25 г измельченной ножницами ершовой массы с прикрепленным илом или 10 мл дисперсного ила. Колбы закрывали ватно-марлевыми пробками и инкубировали в термостате при 30°C.

Долгосрочные опыты. Активность процессов денитрификации и анаммокс и накопление анаммокс-бактерий исследовали при периодическом и непрерывном культивировании в анаэробных условиях в атмосфере аргона.

Стационарное культивирование с периодической сменой среды проводили в стеклянных реакторах объемом 1–2.5 л. Сосуды с пробой и добавленной средой тщательно, в течение 5–10 мин продували аргоном, закупоривали резиновыми пробками с двумя выводами для отбора проб газа из верхней части и жидкости из средней части реактора. После исчерпания субстратов, не реже 1 раза в неделю, меняли среду или добавляли соли нитрита и аммония в соответствующих концентрациях. Регулярно, 2–3 раза в неделю, определяли pH, состав газовой фазы, концентрации нитрит- и нитрат-ионов, и иона аммония. Каждые 3–4 недели определяли ХПК и ЛЖК. Все манипуляции со стационарными реакторами проводили под током аргона. Культивирование производили первые два месяца при 20, следующие два мес. при 25 и затем при 30°C.

Накопление анаммокс-бактерий и исследование условий их активного роста проводили при непрерывном культивировании. На рис. 1 представлена схема проточного лабораторного гибридного реактора с восходящим потоком среды (UASB-реактора) и ершовой загрузкой для иммобилизации анаммокс-бактерий. Реактор представляет собой колонку из органического стекла высотой 90 см с рабочим объемом 1.5 л. В верхней части колонки имеется гидрозатвор и отбойники для биомассы и для образующегося газа, который проходит через компенсаторный сосуд и поступа-

ет на газовый счетчик. Свежая среда подавалась в нижнюю часть колонки с помощью перистальтического насоса в первые 6 мес. со скоростью 1, затем 2 л/сут. Подача среды производилась соответствующими порциями 16 раз в сут. Для обеспечения анаэробных условий сосуд со свежей средой был соединен с подушкой с аргоном. Установка была помещена в термостатную комнату с температурой 29–31°C. Для контроля над процессом из нижнего и верхнего пробоотборников на рабочей части колонки регулярно отбирали пробы, в которых определяли рН, ХПК, концентрации нитрита и аммония и по разнице рассчитывали количество потребленных субстратов. Учет образующегося азота производили с помощью газового счетчика.

Химические анализы. Содержание кислорода, азота, метана и водорода определяли на газо-жидкостном хроматографе Кристалл 5000.1 (ЗАО ХРОМАТЕК г. Йошкар-Ола) с системой из 2-х параллельно соединенных колонок с выходом на детектор по теплопроводности и пламенно-ионизационный детектор через метанатор ($T = 350^\circ\text{C}$), газ-носитель – гелий. Определение газов проводили также на хроматографе СHROM-5 (Чехословакия) с катарометром и колонкой, заполненной молекулярными ситами 5А, газ-носитель аргон.

Для определения ЛЖК использовали надосадочную жидкость после центрифугирования микробной суспензии из флаконов и реакторов. Хроматографический анализ ЛЖК проводили на ВЭЖХ “Стайер” (Россия).

Химическое поглощение кислорода (ХПК) определяли бихроматным методом [18]. Нитрат определяли по описанной ранее методике [19]. Нитрит и аммоний определяли по стандартной методике [20]. Определение рН производили на рН-метре HANNA рН-211 (Германия). Абсолютно сухую массу ила (АСМ) определяли высушиванием пробы при 105°C в сушильном шкафу до постоянного веса.

Детекция анаммокс-бактерий молекулярно-биологическим методом FISH. Фиксацию и подготовку образцов активного ила для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) проводили согласно методике, описанной в [21]. Для гибридизации фиксированных образцов ила с зондами 1–2 мкл суспензии фиксированного образца наносили на обработанные в 0.1% растворе желатина предметные стекла с окошками, разделенными тефлоновым покрытием. Полученные препараты последовательно обрабатывали в серии растворов этанола (50, 80 и 100%). Гибридизацию препаратов с зондами проводили в соответствии с методикой [22] при температуре 46°C и условиях гибридизации для различных зондов. Использовали такие же концентрации формамида в гибридиза-

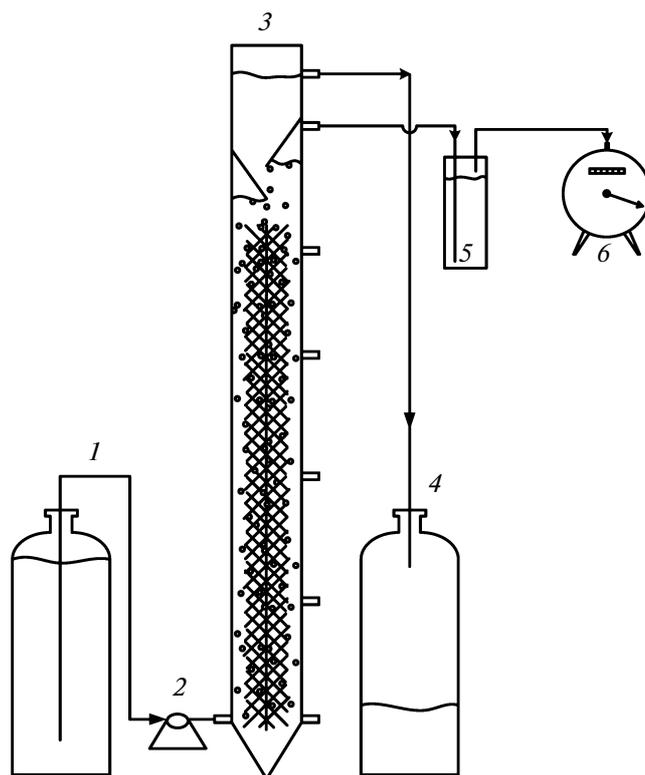


Рис. 1. Схема лабораторного проточного гибридного реактора, объем 2.5 л: 1 – сосуд со средой, 2 – перистальтический насос, 3 – UASB реактор с волокнистой загрузкой “Ерш” в рабочем объеме, гидрозатвором и отбойниками для биомассы и образующегося газа (азота) в верхней части реактора, 4 – сборник для стока отработанной среды, 5 – газокомпенсатор, 6 – газовый счетчик.

ционном буфере и NaCl в буфере для промывки, как в опубликованных ранее работах [23, 24].

Идентификацию клеток планктомицетов осуществляли путем гибридизации фиксированных образцов ила с эквимольной смесью разработанных ранее 16S рРНК-специфичных олигонуклеотидных зондов. Зонд PLA46 – для всей группы *Planctomycetes* [25] и Amx368 – для “anammoх”-планктомицетов, разработанный в работе [6]. Синтез зондов, меченых флуоресцентным красителем Су3, осуществлялся компанией “Синтол” (Москва, Россия). По завершении процедуры гибридизации препараты доокрашивали 0.5 мкМ раствором ДНК-специфичного флуоресцентного красителя – ДАФИ (4',6'-диамидино-2-фенилиндол) – в течение 5 мин, промывали дистиллированной водой и высушивали. Препараты анализировали с использованием эпифлуоресцентного микроскопа Zeiss Axioplan 2 (Йена, Германия) со светофильтрами Zeiss 20 для Су3-меченых зондов.

Таблица 1. Потребление и образование аммония и нитрита микробной популяцией дисперсного ила в стационарном реакторе

Период времени, месяц культивирования	Потребление (–) и образование (+) нитрита и аммония, мг/(л сут)	
	N–NO ₂	N–NH ₄
1-й	–1.5	+1.0
3-й	–3.4	+36.0
4-й	–5.2	+32.5
5-й	–10.1	+35.0
10-й	–5.8	–1.5

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Процессы денитрификации и анаммокс в стационарных накопительных реакторах

Для доказательства, что даже в условиях аэрации во внутренних слоях биопленок на ершах действительно создаются анаэробные условия, необходимые для существования анаммокс-бактерий, были проведены опыты с пробами ершей на проверку их метаногенной активности. В одних и тех же пробах свежего активного ила в аэробных условиях кислород потреблялся на окисление органических веществ, а после исчерпания кислорода происходила их анаэробная деградация с образованием конечного продукта – метана. В результате посевов прикрепленного и дисперсного илов на среду для нитрификаторов, изменялась окраска среды, уменьшалась концентрация аммония, и образовывался нитрит и небольшое количество нитрата, что свидетельствует о присутствии нитрификаторов. Методом предельных разведений и аэробные, и анаэробные микроорганизмы обнаружены во всех исследованных пробах. В аэробных и анаэробных условиях рост микроорганизмов наблюдался вплоть до 12 разведения. Таким образом, в исследованной нами системе очистки воды активный ил является аэробно-анаэробным, что обуславливает низкий выход избыточного ила.

Процессы образования молекулярного азота исследовали в хлопьях дисперсного и в биопленках прикрепленного ила. Дисперсный ил из денитрификаторов обеих станций проявил достаточно хорошую нитрифицирующую и денитрифицирующую активности. Однако даже после нескольких месяцев культивирования в анаэробных условиях потребления аммония не наблюдалось. Более того, шло активное образование аммония вследствие лизиса клеток неактивной биомассы и деградации азотсодержащих веществ. Потребление аммония началось только на 10-й мес. культивирования. В табл. 1 приведены средние скорости потребления нитрита и образования и потребления аммония. Полученные результаты указывают на то, что в реальных условиях КОС в

свободно плавающем иле условия для развития анаммокс-бактерий не вполне благоприятны. Вследствие постоянного протока и рецикла водно-иловой массы из аэротенка в денитрификатор, взвешенный дисперсный осадок подвергается резкой смене таких условий среды, как концентрация растворенного кислорода, состав и концентрация и соединений азота, и органических веществ. Для чрезвычайно медленно растущих микроорганизмов смена условий среды имеет отрицательное воздействие.

В экспериментах с прикрепленным илом указания на осуществления процесса анаммокс были получены в самом начале культивирования в анаэробных условиях. Ерши с обрастаниями из денитрификатора КОС № 3 и из 1-й и 2-й ступеней денитрификатора КОС № 6 были помещены в стационарные накопительные реакторы, в которые периодически добавляли соли нитрита и аммония и регулярно меняли среду. Во всех реакторах наблюдались очень похожие ход и результаты экспериментов, которые приведены на рис. 2 и в табл. 2. В течение первого месяца во всех реакторах шло потребление нитрита и аммония, и образовывался N₂. Хотя аммония потреблялось в 2.5–3.5 раза меньше, чем нитрита, это свидетельствует о функционировании в исходных пробах прикрепленного ила процесса анаммокс. К сожалению, точно оценить вклад процесса анаммокс в суммарное удаление азота с помощью использованных нами методов не представляется возможным. Аммоний в начальный период культивирования свежееотобранных проб мог использоваться как анаммокс-бактериями, так и аммоний-окисляющими бактериями. Несмотря на то, что все манипуляции с пробами проводились в атмосфере аргона, присутствие следов растворенного кислорода полностью исключить нельзя. Его могли использовать аммоний-окисляющие бактерии. Однако следует отметить, что в исходном иле присутствовало большое количество гетеротрофных аэробных бактерий, активно использующих кислород для окисления органических веществ, содержащихся в исследуемых пробах. Таким образом, из данных табл. 2 можно предположить, что

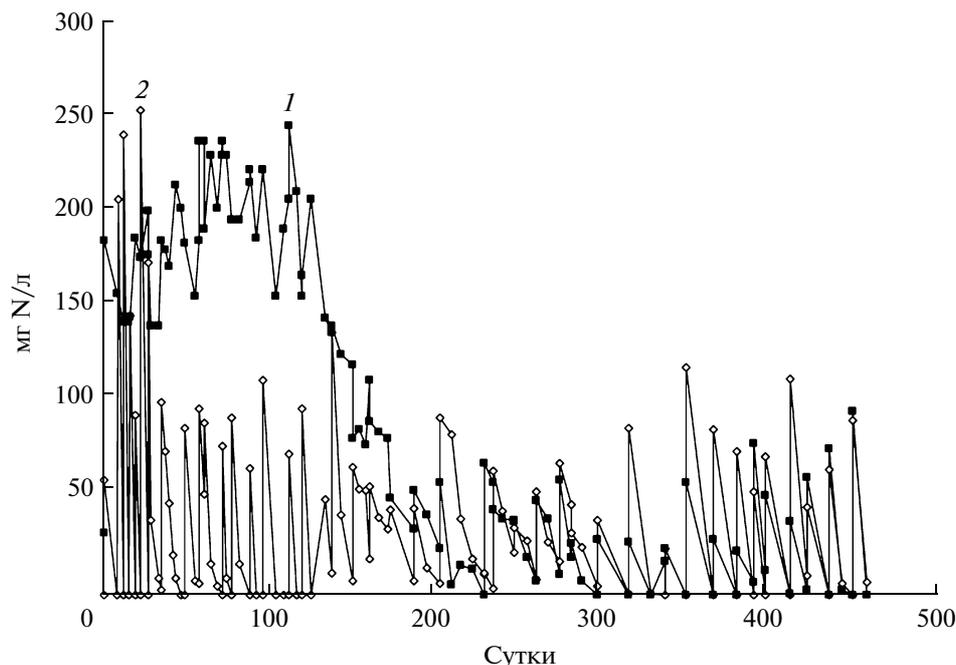


Рис. 2. Изменение концентрации аммонийного (1, квадраты) и нитритного (2, ромбы) азота в стационарном реакторе с илом на ерше из денитрификатора 1-й ступени КОС № 6 в течение полутора лет.

доля анаммокс-процесса, оцениваемая по количеству потребленного аммонийного азота, могла составлять максимум до трети от общего удаленного азота. В этот же период во всех реакторах наблюдалось слабое образование метана. В последующие три–четыре месяца, как и в предыдущем опыте с дисперсным илом, шло активное потребление нитрита практически без уменьшения концентрации аммония. Это свидетельствует об ак-

тивном процессе денитрификации, преобладающем над метаногенезом. Так как используемая в первые месяцы среда содержала сульфид, вероятно активность и тионовых денитрификаторов, тем более что при увеличении концентрации сульфида в среде увеличивалась скорость образования молекулярного азота. Полученные результаты не означают, что аммоний совсем не потреблялся и процесс анаммокс не функционировал. В

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

Период измерения, месяц культивирования	Денитрификатор 1-й ступени		Денитрификатор 2-й ступени	
	N–NO ₂ , мг/(л сут)	N–NH ₄ , мг/(л сут)	N–NO ₂ , мг/(л сут)	N–NH ₄ , мг/(л сут)
Период преобладания процесса денитрификации				
1 -й	–7.5	–3.1	–7.8	–2.5
2 -й	–7.5	0	–11	0
3 -й	–10.2	0	–10.4	–1.0
4 -й	–12.5	–1.0	–10.3	–1.1
5 -й	–13	–2.1	–11.5	–1.5
Период преобладания процесса анаммокс				
6 -й	–1.9	–0.8	–3.5	–2.3
7 -й	–2.5	–2.1	–3.1	–2.5
8 -й	–2.1	–2.2	–2.6	–2.2
9 -й	–2.4	–2.2	–2.5	–2.4
10 -й	–2.6	–2.2	–2.8	–2.5

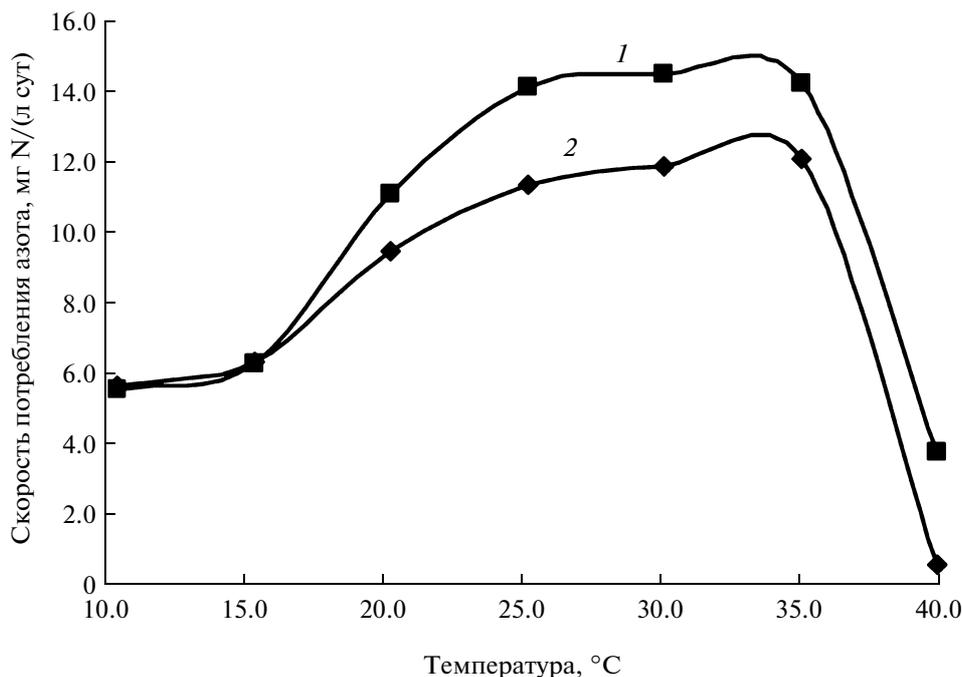


Рис. 3. Влияние температуры на среднюю скорость потребления нитрита (1, квадраты) и аммония (2, ромбы) в процессе анаммокс.

этот период начался активный лизис клеток микроорганизмов, в результате ХПК увеличился до 300–500 мг/л. При разложении азотсодержащих органических соединений шло активное образование аммония, который выделялся в среду, что не позволяло точно измерить его потребление. Тем не менее, из данных табл. 2 следует, что около 10% молекулярного азота в этот период могли образоваться за счет процесса анаммокс. Следует отметить, что при этом исходные биопленки на ершах разрушились, и волокна ершей оголились. Это свидетельствует об изменении микробной популяции по сравнению с началом эксперимента.

В конце пятого месяца эксперимента ХПК существенно понизился, в среде отсутствовали летучие жирные кислоты. Это свидетельствовало об уменьшении интенсивности процессов лизиса клеток неактивной биомассы и исчерпанию легко деградируемых органических веществ в реакторах. В это время стало возможным создание селективных условий для анаммокс-бактерий. Со 150-х сут эксперимента использовали среду для анаммокс-бактерий и поддерживали концентрации аммония и нитрита — около 50 мг/л по азоту. В обоих реакторах началось потребление почти равных (по азоту) количеств нитрита и аммония, что свидетельствует об активном процессе анаммокс (табл. 2, рис. 2). Образование молекулярного азота уменьшилось по сравнению с периодом денитрификации. Для достижения высоких скоростей процесса необходим рост популяции анаммокс-

бактерий, который занимает длительное время, измеряемое месяцами. Кислотность среды в реакторах на всем протяжении эксперимента поддерживалась в интервале pH 7–8.

Исследование влияния температуры на скорость потребления аммония и нитрита, проведенное после шести месяцев культивирования исходного ила в накопительном стационарном реакторе, показало, что процесс анаммокс протекал в интервале температур от 10 до 40°C с широким оптимумом при 25–35°C (рис. 3). При повышении температуры до 40°C скорость процесса 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, что весьма необычно для анаммокс-бактерий, выделенных из очистных сооружений [11] и указывает на вероятное присутствие в популяции анаммокс бактерий в стационарных реакторах новых анаммокс-бактерий. Соотношение скоростей потребления аммонийного и нитритного азота близкое к 1.0 : 1.3 соответствует теоретическому для процесса анаммокс [4].

Исследование процесса “анаммокс” при проточном культивировании

В условиях культивирования при постоянном протоке среды, не содержащей органических веществ и других акцепторов электронов помимо

нитрита, создаются элективные условия для развития анаммокс-бактерий. Следует отметить, что при росте анаммокс-бактерий рН среды повышается. Другие микроорганизмы в таких условиях погибают или вымываются из реактора. Таким способом были выделены все известные на сегодняшний день монокультуры анаммокс-бактерий [26]. В хорошо работающих анаммокс-реакторах более 90% микробной популяции может быть представлено анаммокс-бактериями [7, 11].

После девяти месяцев культивирования в стационарных условиях ерш с прикрепленной и дисперсной биомассой из денитрификатора второй ступени был перенесен в колонку проточного реактора. В табл. 3 представлены результаты по использованию аммонийного и нитритного азота в проточном анаммокс-реакторе, работающем в течение 9 месяцев. Производительность реактора составила 0.3 кг N/(м³ сутки). К концу этого периода соотношение скоростей потребления нитритного и аммонийного азота приблизилось к 1.3, что соответствует теоретическому расчету для процесса анаммокс. Анаэробизис в колонке достигался за счет удаления следов кислорода в нижней части колонки, где могли быть аэробные микроорганизмы. Химическое потребление кислорода (ХПК) в средней части реактора было ниже чувствительности метода определения, что свидетельствует об отсутствии или крайне малом содержании растворенных органических веществ в среде. На волокнах ершовой насадки развились новые биопленки красновато-бурого цвета, в которых даже в световом микроскопе видны характерные округлые колонии и крупные агрегаты, характерные для анаммокс-бактерий. В пробах из осадка в нижней части реактора анаммокс-подобные шаровидные колонии погружены в остатки лизированных клеток исходного ила. Ниже описана идентификация анаммокс-бактерий методом FISH. С увеличением скорости использования азота, а, следовательно, и скорости роста анаммокс-бактерий наблюдалось увеличение рН в эффлюенте из реактора. Однако даже в верхней части колонки его значение было в пределах роста для анаммокс-бактерий.

Обнаружение анаммокс-бактерий в биопленках активного ила методом FISH

В пробах ила, взятых непосредственно на станциях очистки на реке Мзымта в начале исследований, методом гибридизации *in situ* (FISH) с Су3-меченым олигонуклеотидным зондом PLA46 обнаружено присутствие планктомицетов. Также были обнаружены скопления клеток или микроколоний, по морфологии сходные с анаммокс-бактериями, которые гибридизировались с зондом Amx368, но встречались редко, в среднем 1–2 агрегата на поле зрения. После нескольких

Таблица 3. Средняя скорость потребления аммонийного и нитритного азота микробной биомассой в колонке, мг/(л сут) в течение 9 мес. культивирования

Месяц культивирования	Потребление, мг/(л сутки)	
	N–NO ₂	N–NH ₄
1-ый	2.6	2.6
3-ий	3.5	2.8
5-ый	4.9	3.9
6-ой	55.3	46.1
7-ой	120.9	89.2
8-ой	154.8	124.1
9-ый	156.0	154.7

месяцев культивирования проб в стационарных условиях, когда начался период преваляирования процесса анаммокс, плотность колоний и агрегатов анаммокс-бактерий в пленках с ершей и в хлопьевидном осадке увеличилась до десятка микроколоний в поле зрения микроскопа. Отдельные агрегаты, состоящие из 2-х, 4-х и 8-ми микроколоний, гибридизирующихся зондом Amx368, были обнаружены в образцах дисперсного ила (рис. 4а). В пробах активной биомассы, взятых из проточного реактора после девяти месяцев культивирования, с помощью зонда Amx368 в биопленках на волокнах ершей обнаружены скопления колоний анаммокс-бактерий, которые представляли значительную часть активной микробной популяции (рис. 4б). Таким образом, получены бесспорные доказательства присутствия анаммокс-бактерий в активном аэробно-анаэробном иле.

Вклад процесса анаммокс в удаление азота в производственных условиях

По мере эксплуатации КОС в долине реки Мзымта процесс удаления азота за счет сочетания денитрификации и анаммокс (ДЕАМОКС) стабилизировался. Исследование проб, взятых из денитрификатора КОС № 3 после полутора и двух лет ее эксплуатации, подтвердило достаточно высокую активность процесса анаммокс *in situ*. В краткосрочных опытах при стационарном культивировании на среде для анаммокс-бактерий потребление нитрита и аммония начиналось сразу и шло одновременно с процессом денитрификации. При этом скорость удаления азота была на 10–15% выше, чем в пробах, взятых после одного года эксплуатации КОС (табл. 2). По нашим данным на долю анаммокс-процесса может приходиться до трети удаленного азота. Эти результаты находятся в хорошем соответствии с расчетными. Следует отметить, что на КОС, с которыми мы работали, качество очистки воды соответствует нор-

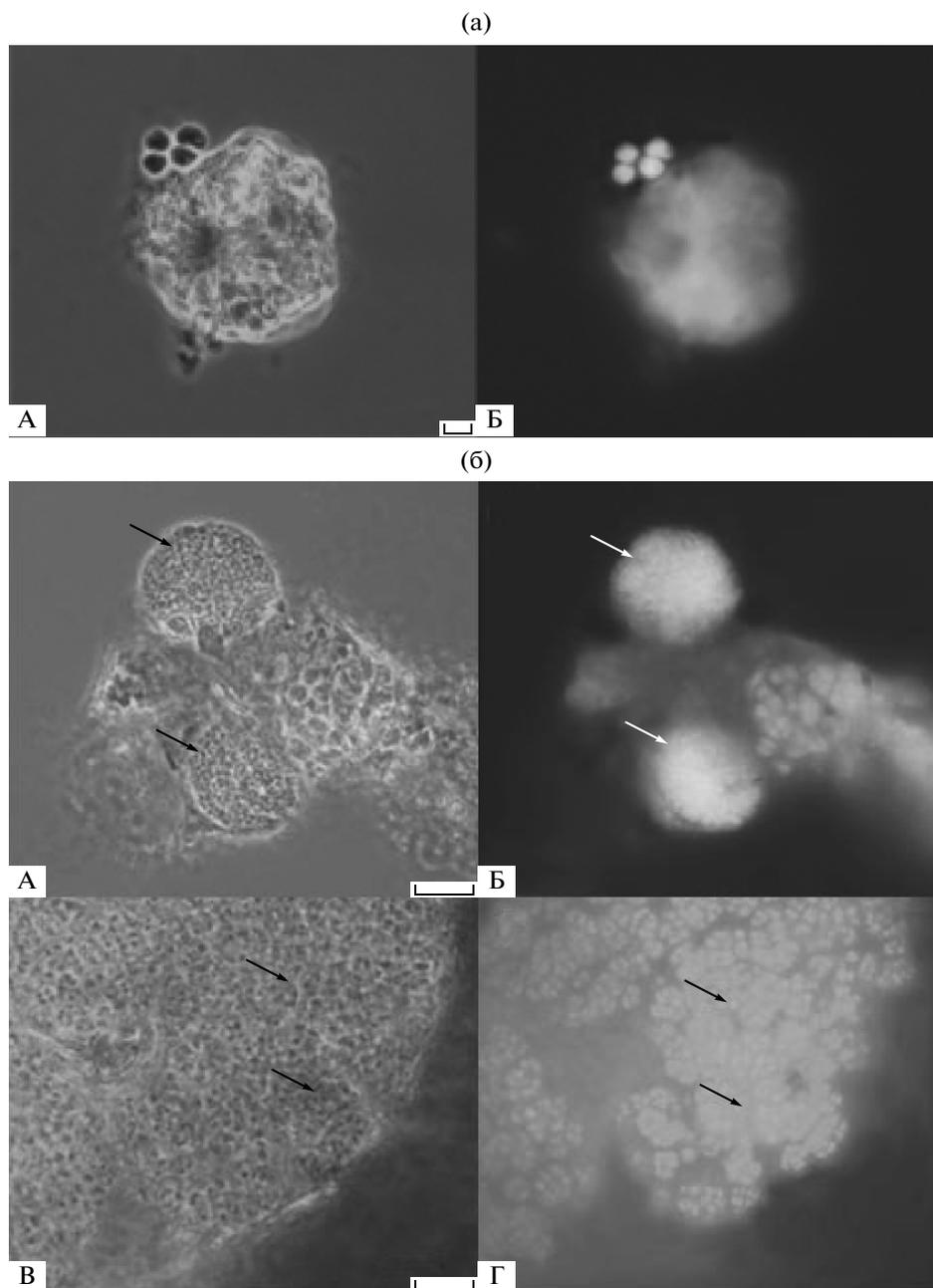


Рис. 4. Детекция анаэробных бактерий методами микроскопии с фазовым контрастом и *in situ* гибридизации с Cu_3 -меченым олигонуклеотидным зондом Amx368: а – на твердой частице из накопительного стационарного реактора; б – в осадке из нижней части проточного реактора (А, Б) и в биопленке из средней части проточного реактора (В, Г). А, В – фазовый контраст; Б, Г – гибридизация с зондом.

Стрелками указаны скопления колоний анаэробных бактерий. Масштабная метка 10 мкм.

мам сброса в водоемы рыбохозяйственного назначения [27], содержание аммонийного азота в очищенной воде не превышает 0.2–0.3 мг/л. Для осуществления процесса денитрификации необходимо соотношение БПК к N равное 5–6 : 1, или $C_{орг} : N$ равное 2.5–3.0 : 1.0 [1]. Такое соотношение соответствует составу бытовых сточных вод, поступающих на очистку. При предобработке по-

ступающего на КОС стока коагулянтom удаляется около 50% органического углерода загрязнений, при этом содержания аммонийного азота не уменьшается. Оставшихся органических соединений недостаточно для удаления всего содержащегося в сточной воде аммония в процессе нитри-денитрификации. Более точную оценку вклада анаэробного процесса в удаление азота можно

получить с использованием метода включения атомов стабильных изотопов ^{15}N [28]. Тем не менее, полученные результаты указывают на развитие и активность анаммокс-бактерий в биомассе на ершах непосредственно в производственных условиях. Осуществление процесса анаммокс обеспечивает удаление азота при низком содержании или отсутствии органических веществ. Технология, разработанная ЗАО “Компания ЭКОС”, является полномасштабной реализацией сочетания процессов денитрификации и анаммокс – ДЕАМОХ [5], и названа БХ-ДЕАМОКС [12].

В результате проведенных исследований получено экспериментальное подтверждение развития анаммокс-бактерий и функционирования процесса анаммокс при очистке бытовых сточных вод в комбинированной системе физико-химической и биологической очистки с иммобилизацией активного ила на твердом гибком носителе (БХ-ДЕАМОКС). В процессе БХ-ДЕАМОКС впервые обнаружена важная роль анаммокс-бактерий в очистке низко концентрированных сточных вод.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки (госконтракт № 02.740.11.0023).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Загорский В.А., Данилович Д.А., Козлов М.Н., Мойжес О.В., Белов Н.А., Дайнеко Ф.А., Мухин В.А. Опыт промышленного внедрения технологий биологического удаления азота и фосфора // Водоснабжение и санитарная техника. 2001. № 12.
2. Broda E. Two kinds of lithotrophs missing in nature // Z. Allg. Mikrobiol. 1977. V. 17. P. 491–493.
3. Mulder A., van de Graaf A.A., Robertson L.A., Kuenen J.G. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized-bed reactor // FEMS Microbiology Ecology. 1995. V. 16. P. 177–183.
4. Jetten M.S.M., Strous M., van de Pas-Schoonen K.T., Schalk J., van Dongen U.G.J.M., van De Graaf A.A., Logemann S., Muyzer G., van Loosdrecht M.C.M., Kuenen J.G. The anaerobic oxidation of ammonium // FEMS Microbiol. Rev. 1999. V. 22. P. 421–437.
5. Аношьева М.Г., Калюжный С.В. Анаэробное окисление аммония: Микробиологические, биохимические и биотехнологические аспекты // Успехи современной биологии. 2007. Т. 127. № 1. С. 34–43.
6. Schmid M., Walsh K., Webb R., Rijpstra W.I.C., van de Pas-Schoonen K.T., Verbruggen M.J., Hill T., Moffett B., Fuerst J., Schouten S., Damste' J.S.S., Harris J., Shaw P., Jetten M.S.M., Strous M. *Candidatus "Scalindua brodae,"* sp. nov., *Candidatus "Scalindua wagneri,"* sp. nov. two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria // System. Appl. Microbiol. 2003. V. 26. P. 529–538.
7. Strous M., Kuenen J.G., Fuerst J.A., Wagner M., Jetten M.S.M. The anammox case – A new experimental manifesto for microbiological eco-physiology // Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol. 2002. V. 81. P. 693–702.
8. Van der Star W.R.L., Miclea A.I., van Dongen U.G.J.M., Muyzer G., Picioreanu C., van Loosdrecht M.C.M. The membrane bioreactor: a novel tool to grow anammox bacteria as free cells // Biotechnol. Bioeng. 2008. V. 101. P. 286–294.
9. Isaka K., Date Y., Sumino T., Yoshie S., Tsuneda S. Growth characteristic of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in an anaerobic filtrated reactor // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 70. P. 47–52.
10. Van der Star W.R., Abma W.R., Blommers D., Mulder J.W., Tokutomi T., Strous M., Picioreanu C., van Loosdrecht M.C. Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: Experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam // Water Res. 2007. V. 41. № 18. P. 4149–4163.
11. Van Hulle S., Vandeweyer H., Meesschaert B., Vanrolleghem P., Dejans P., Dumoulin A. Engineering aspects and practical application of autotrophic nitrogen removal from nitrogen rich streams // Chem. Engin. J. 2010. V. 162. P. 1–20.
12. Ножевникова А.Н., Симанькова М.В., Лутти Ю.В. Использование микробного процесса анаэробного окисления аммония (АНАММОКС) в биотехнологии очистки стоков с высоким содержанием азота (обзор) // Биотехнология. 2011. № 5. С. 8–31.
13. Куликов Н.И., Гвоздяк П.И., Зубов М.Г., Ножевникова А.Н., Лутти Ю.В. Комплектно-блочная модульная очистная установка заводского изготовления // Патент РФ 94568, U1. 2010.
14. Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Биопленка – “город микробов” или аналог многоклеточного организма? // Микробиология. 2007. Т. 76. № 2. С. 149–163.
15. Плакунов В.К., Николаев Ю.А. Микробные биопленки: перспективы использования при очистке сточных вод // Вода: химия и экология. 2008. № 2. С. 11–13.
16. Жилина Т.Н., Заварзин Г.А. Методы выделения и культивирования метанообразующих бактерий // Теоретические и методические основы изучения анаэробных микроорганизмов. Пушино: Академия наук СССР, 1978. С. 158–163.
17. Koops H.-P., Böttcher B., Möller U., Pommerening-Rösler A., Stehr G. Classification of eight new species of ammonia-oxidizing bacteria: *Nitrosomonas communis*, sp. nov., *Nitrosomonas ureae* sp. nov., *Nitrosomonas aestuarii* sp. nov., *Nitrosomonas marina* sp. nov., *Nitrosomonas nitrosa* sp. nov., *Nitrosomonas eutropha* sp. nov., *Nitrosomonas oligotropha* sp. nov. // J. Gen. Microbiol. 1991. V. 13. P. 1689–1699.
18. Орлов Д.С., Гришина Л.А. Практикум по химии гумуса. М.: Изд-во МГУ, 1981. 272 с.
19. Bhaudari B., Simlot M.M. Rapid micro-method for determination of nitrate in presence of nitrite for biochemical studies // Indian J. Exper. 1986. V. 24. P. 223–327.
20. Лурье Ю.Ю. Унифицированные методы анализа вод. М.: Химия, 1971. С. 134.
21. Dedysh S.N., Pankratov T.A., Belova S.E., Kulichevskaya I.S., Liesack W. Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria community composition in an acidic Sphagnum peat bog // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. № 3. P. 2110–2117.

22. *Stahl D.A., Amann R.* Development and application of nucleic acid probes // Eds. Stackebrandt E., Goodfellow M., *Nucleic acid techniques in bacterial systematic.* New York, N.Y: John Wiley & Sons, Inc., 1991. P. 205–248.
23. *Amann R.I., Krumholz L., Stahl D.A.* Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology // *J. Bacteriol.* 1990. V. 172. P. 762–770.
24. *Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H.* Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation // *Microbiol. Rev.* 1995. V. 59. P. 143–169.
25. *Neef A., Amann R., Schlesner H., Schleifer K.-H.* Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes // *Microbiology (UK).* 1998. V. 144. P. 3257–3266.
26. *Zhang L., Zheng P., Tang C.J., Jin R.C.* Anaerobic ammonium oxidation for treatment of ammonium-rich wastewaters // *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 2008. V. 9. № 5. P. 416–426.
27. *Risgaard-Petersen N., Nielsen L.P., Rysgaard S., Dalsgaard T., Meyer R.L.* Application of the isotope pairing technique in sediments where anammox and denitrification coexist // *Limnol. Oceanogr.* 2003. V. 1. P. 63–73.
28. *Гвоздяк П.И.* Микробиология и биотехнология очистки воды // *Химия и технология воды.* Т. II. № 9. С. 854–858.