

*Микробиологические
методы
очистки воды
Лекция 9*

Кинетическое лимитирование роста и жизненные стратегии микроорганизмов

Культивирование микроорганизмов вне зависимости от способа (в лабораторных, производственных или природных условиях) всегда лимитируется присутствием субстратов, т.е. веществ, которые микроорганизмы способны использовать в качестве источников питания и источников химических элементов, входящих в состав клеток микроорганизмов.

В процессе культивирования часто наблюдается лимитирование роста микроорганизмов недостатком субстратов. При этом происходит остановка роста из-за нехватки одного из субстратов в среде. Для объяснения механизма такого кинетического лимитирования роста используется принцип Либиха:

— на рост клеток определяющее влияние оказывает «узкое место» метаболизма. Применительно к рассматриваемому процессу этот принцип следует сформулировать следующим образом:

скорость биологической реакции (роста) микроорганизма зависит от концентрации или интенсивности потока лимитирующего субстрата.

Если скорость реакции в "узком месте" метаболизма клеток выше скорости потока среды в хемостате (в стационарном режиме), то скорость прироста популяции также выше. Плотность популяции будет прирастать до того момента, пока концентрация субстрата в культуральной среде не снизится до стационарной величины, при которой скорость реакции в "узком месте" метаболизма клеток сравняется со скоростью потока субстрата в ферментер.

Кинетическое лимитирование роста и жизненные стратегии микроорганизмов

В большинстве случаев лимитирование роста одноклеточных энергетическими субстратами, источниками углерода, минеральными компонентами среды и т.д. выражаются в виде гиперболической зависимости (кривая с насыщением) скорости роста популяций от концентрации или интенсивности потока субстратов, одним из крайних случаев которой является зависимость типа Моно, идентичной формуле Михаэлиса-Ментен:

$$\mu = \mu_{max} * S / (K_s + S),$$

где μ — удельная скорость роста популяции микроорганизмов,

S — расход поступающего субстрата

Уравнение Михаэлиса — Ментен — основное уравнение ферментативной кинетики, описывает зависимость скорости реакции, катализируемой ферментом, от концентрации субстрата. Уравнение названо в честь физико-химиков Леонора Михаэлиса и Мод Леоноры Ментен.

Уравнение имеет вид:

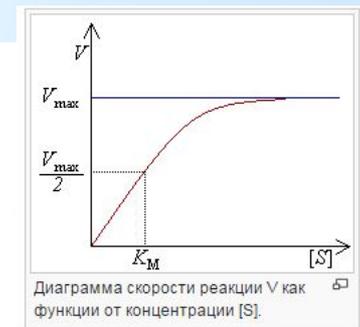
$$v = \frac{V_m S}{S + K_M},$$

где

- V_m — максимальная скорость реакции, равная $k_{cat} E_0$;
- K_M — константа Михаэлиса. По определению, $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$, где k_{-1} есть константа скорости реакции

распада фермент-субстратного комплекса на фермент и исходный субстрат, k_1 есть константа скорости реакции образования фермент-субстратного комплекса и k_2 есть константа скорости реакции распада фермент-субстратного комплекса на фермент и продукт (см. ниже вывод уравнения для скорости реакции). Константа Михаэлиса численно равна концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину от максимальной^[1];

- S — концентрация субстрата.



Кинетическое лимитирование роста и жизненные стратегии микроорганизмов

Поскольку большинство реакций в клетке имеет ферментативный характер, общая скорость процессов биосинтеза определяется скоростью самой медленной из этих реакций; скорость же последней зависит от концентрации субстрата в соответствии с формулой Михаэлиса-Ментен. Данная модель является упрощенной и не учитывает ряд факторов.

Со способностью противостоять лимитированию роста и выживать в условиях лимитирования связывают также реализацию микроорганизмами различных жизненных стратегий (K-, R-, L-типы отбора).

Жизненная стратегия — это "способ выживания и поддержания стабильности популяций в сообществах и экосистемах"

Знание ростовых характеристик важно для прогноза исхода конкурентной борьбы популяций за общий лимитирующий субстрат. Располагая информацией о наследственно закрепленных кинетических свойствах членов микробного сообщества и об экотопических условиях, можно прогнозировать динамику микробной сукцессии в средах с различными режимами поступления органических веществ.

Три типа жизненных стратегий микроорганизмов

Три типа стратегий микроорганизмов, эволюционно закрепленных под действием К-, R- и L-типов отбора

К-отбор, или отбор насыщения	R-отбор, или отбор насыщения	L-отбор
<p>Действует в климаксных сообществах. Питательные вещества поступают непрерывно и стабильно. Экологические условия относительно постоянны, стрессы отсутствуют. Преимущество имеют популяции с высокой конкурентной способностью. Они полно и экономично потребляют непрерывно возобновляемые питательные ресурсы, поддерживая высокую популяционную плотность. К-стратеги (коринеподобные бактерии, липомицеты, простекобактерии) инерционны, но имеют высокое сродство к субстрату и экономичный обмен при глубоком лимитировании. Это помогает им выживать в зрелых (климаксных) сообществах при максимальной конкуренции.</p>	<p>Действует после нарушения стабильности климаксных экосистем из-за резкого увеличения потока питательных веществ или элиминирования значительной части организмов. В условиях временного избытка пищи преимущества имеют популяции, обладающие быстрой реакцией и высокой скоростью нелимитированного роста. Они дают вспышки численности на начальных стадиях сукцессии и вытесняются из сообщества на более поздних стадиях К-стратегами. R-стратеги (псевдомонады, дебариомицеты, энтеробактерии, мукоровые грибы) обладают высокой скоростью сбалансированного роста, гибкой метаболической системой, но быстро отмирают при голодании.</p>	<p>Действует в неблагоприятных условиях среды, приводящих к различного рода стрессам. Стрессы могут быть экологическими (неоптимальные температура, pH, тоничность среды и т.д.) и биоценологическими (антагонизм, голодание из-за перехвата пищи конкурентами и т.п.). Продуктом L-отбора являются популяции, обладающие резистентностью к данному виду стресса. L-стратеги (бациллы) являются слабыми конкурентами, но способны образовывать покоящиеся формы клеток.</p>

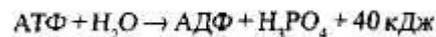
Аденозинтрифосфорная кислота (АТФ) и ее роль в клетке

В цитоплазме каждой клетки, а также в митохондриях, хлоропластах и ядрах содержится аденозинтрифосфорная кислота (АТФ). Она поставляет энергию для большинства реакций, происходящих в клетке. С помощью АТФ клетка синтезирует новые молекулы белков, углеводов, жиров, избавляется от отходов, осуществляет активный транспорт веществ, биение жгутиков и ресничек и т. д.

Молекула АТФ представляет собой нуклеотид, образованный азотистым основанием аденином, пятиуглеродным сахаром рибозой и тремя остатками фосфорной кислоты. Фосфатные группы в молекуле АТФ соединены между собой высокоэнергетическими (макроэнергетическими) связями :

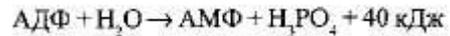


Связи между фосфатными группами не очень прочные, и при их разрыве выделяется большое количество энергии. В результате гидролитического отщепления от АТФ фосфатной группы образуется аденозиндифосфорная кислота (АДФ) и высвобождается порция энергии:

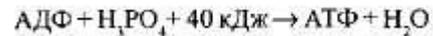


Аденозинтрифосфорная кислота (АТФ) и ее роль в клетке

АДФ также может подвергаться дальнейшему гидролизу с отщеплением еще одной фосфатной группы и выделением второй порции энергии; при этом АДФ преобразуется в аденозин-монофосфат (АМФ), который далее не гидролизуется:



АТФ образуется из АДФ и неорганического фосфата за счет энергии, освобождающейся при окислении органических веществ и в процессе фотосинтеза. Этот процесс называется фосфорилированием. При этом должно быть затрачено не менее 40 кДж/моль энергии, которая аккумулируется в макроэргических связях:



Способность микроорганизмов к деструкции соединений азота

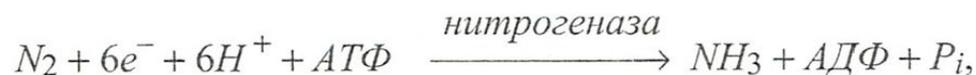
Азот является важным элементом питания микроорганизмов. Если углерод является основой всех классов органических соединений в клетке, то азот входит в состав таких функционально важных соединений как белки, аминокислоты, пептиды, азотистые основания, полиамины, полимеры клеточной стенки микроорганизмов, некоторые витамины и коферменты. В количественном отношении доля азота бактериальной клетке составляет до 12% всей сухой биомассы, в грибах — до 10% веса сухого мицелия.

Различные микроорганизмы могут использовать многие источники азота, включая органические и неорганические формы. Многие виды бактерий, грибов и дрожжей интенсивно используют соли аммония, а также легко усваивают органические формы азота — белки, аминокислоты, пептиды.

При развитии микроорганизмов в слабощелочной среде как источник азота может использоваться аммиак, но при невысоком его содержании в среде (из-за его ингибирующего действия на биосинтетические процессы).

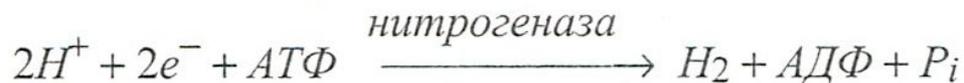
Большая часть видов микроорганизмов-деструкторов не способна фиксировать газообразный азот. Лишь сахаролитические клостридии (*Clostridium butyricum*, *Cl. pasteurianum* и др.) в анаэробных зонах в процессах брожения углеводов способны усваивать молекулярный азот. Помимо них в фиксации молекулярного азота могут участвовать и другие облигатно- и факультативно-анаэробные бактерии.

Способность микроорганизмов к ассимиляции молекулярного азота обусловлена действием фермента нитрогеназы, катализирующего реакцию:



где P_i — фосфат.

Помимо этого нитрогеназа катализирует энергозависимую реакцию образования H_2 :

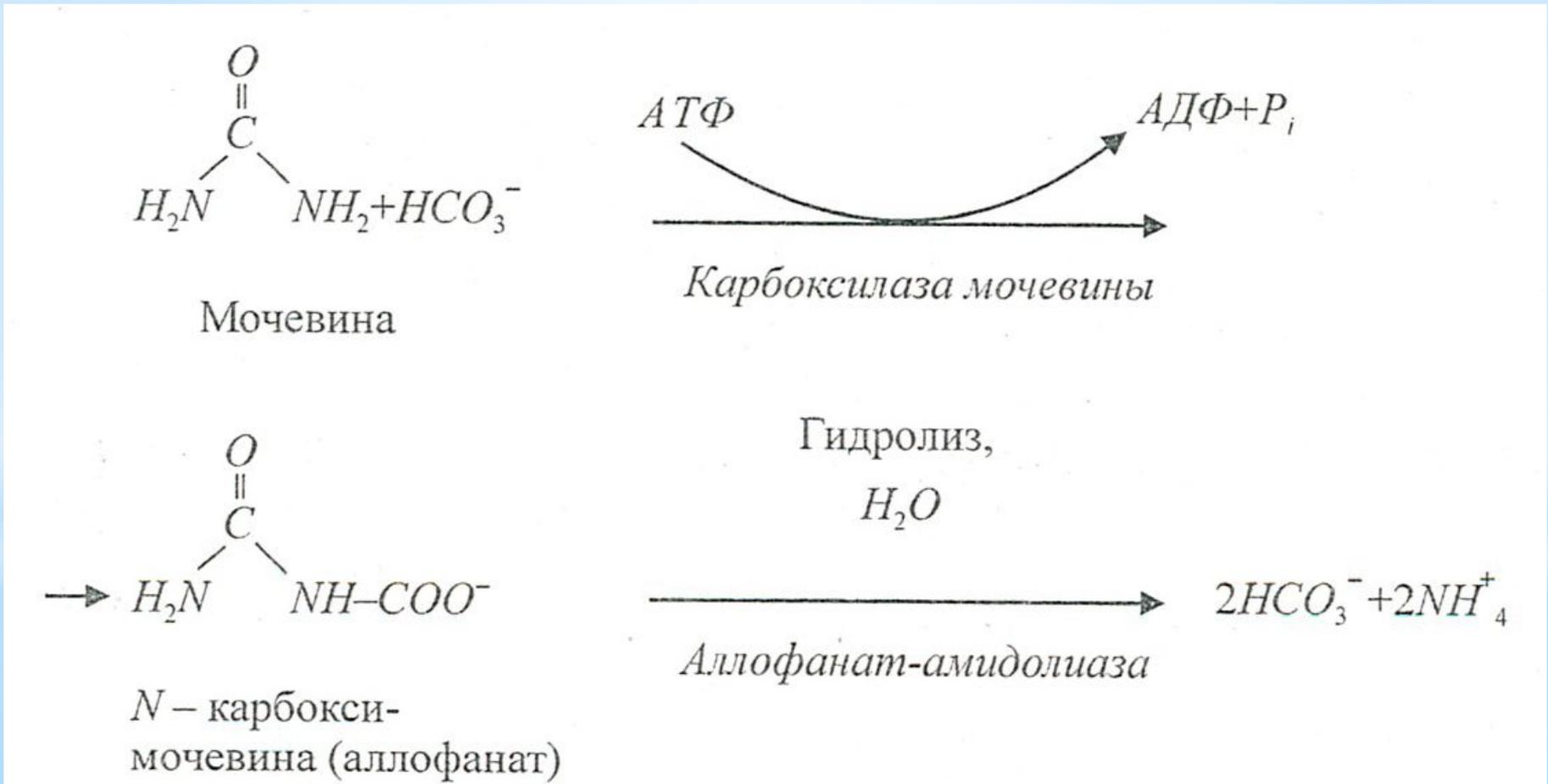


Способность к образованию газа водорода свойственна многим азотфиксирующим бактериям.

Микробиологические методы очистки воды

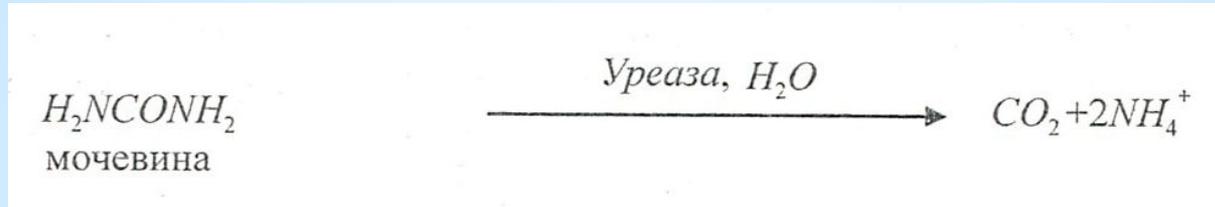
Основные источники азота в бытовых сточных водах

В городских и бытовых сточных водах основным источником азота является мочевина или ее производные — соли аммония. Образование аммонийных ионов из мочевины (ее гидролиз) может происходить двумя путями. У многих микроорганизмов, прежде чем мочевины подвергается гидролизу, она должна быть карбоксилирована при помощи биотинсодержащего фермента — карбоксилазы мочевины. Процесс протекает с затратой энергии АТФ:



Основные источники азота в бытовых сточных водах

У некоторых микроорганизмов мочевины может подвергаться непосредственному гидролизу с помощью имеющегося у них фермента уреазы:

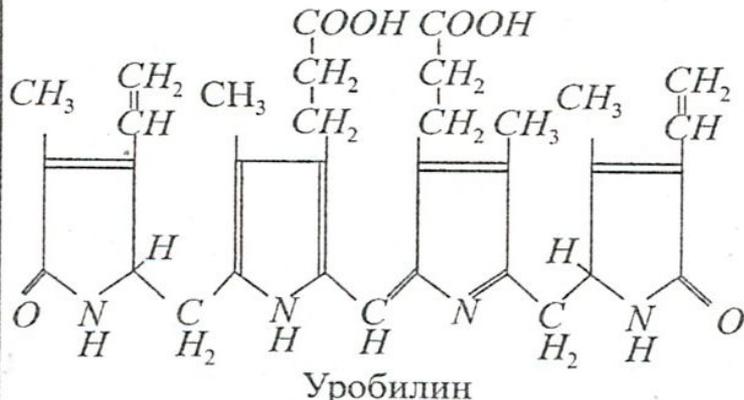


Такую прямую аммонификацию мочевины способны осуществлять уробактерии, некоторые грибы и актиномицеты. Для биоочистки может представлять интерес специфическая группа уробактерий. Это спорообразующие аэробные *Bac. pasteurii* и *Sporosarcina urea*. Опыты по гибридизации ДНК показали, что эти организмы родственны в генетическом отношении. Основным субстратом дыхания и роста у них является мочевины. Хотя мочевины является нейтральным веществом, ее гидролиз приводит к образованию значительных количеств щелочи, поскольку на 1 моль расщепленной мочевины образуется 2 моля аммиака. Развиваясь при высоком pH, эти организмы получают экологические преимущества при росте на содержащих мочевины субстратах.

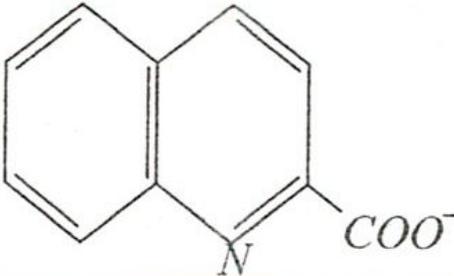
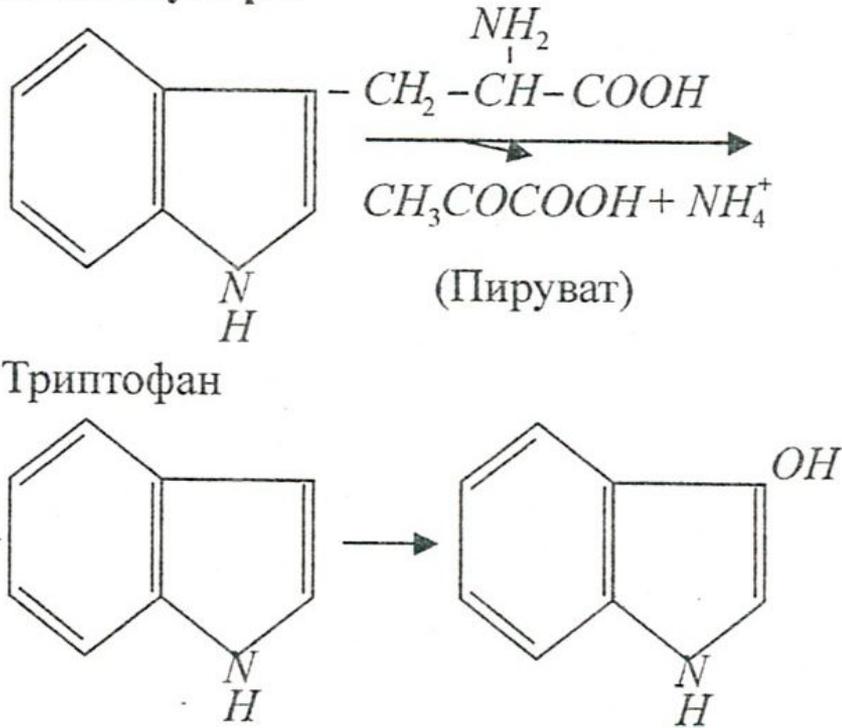
Эти организмы могут быть интересны для очистки сточных вод животноводческих комплексов.

В бытовых и городских сточных водах кроме мочевины содержатся и другие конечные продукты азотного обмена. Это копропорфирины (уробилин, стеркобилин, (3-холестанол, (3-копростанол), креатинин, мочевая кислота, хинальдиновая кислота; 1,4-диаминобутан, гиппуровая кислота, азотсодержащие органические сульфаты.

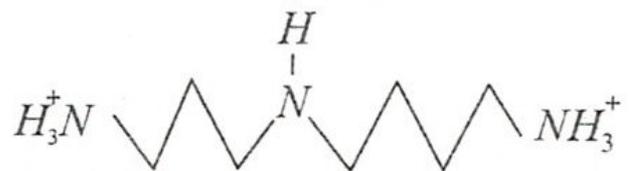
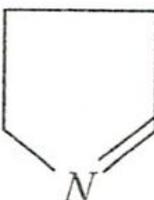
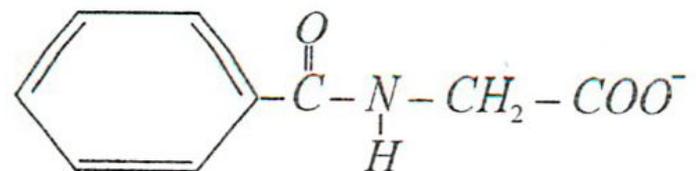
Конечные продукты азотного обмена, присутствующие в городских и бытовых сточных

№ п/п	Вещество, его химическая формула	Примечания
1.	<p>Мочевина $O = C \begin{matrix} / NH_2 \\ \backslash NH_2 \end{matrix}$</p> <p>соли аммония, NH_4^+</p> <p>аммиак NH_3</p>	Основной конечный продукт обмена
2.	<p>Копропорфирины: уробилин и стеркобилин (тетрапирроловые пигменты с открытой цепью)</p>  <p style="text-align: center;">Уробилин</p> <p>гем $\xrightarrow{-CO, Fe}$ биливердин $\xrightarrow{+2H^+}$ билирубин \rightarrow $\xrightarrow{+8H^+}$ мезобилирубиноген $\xrightarrow{-2H^+}$ уробилин</p> <p>β - холестанол и его изомер β - копростанол</p>	<p>Образуются при распаде желчных пигментов (билирубина и др., образующихся из гема крови)</p> <p>Уропорфирины придают моче известный желтый цвет. В норме их содержание невелико, но значительно увеличивается при заболевании, называемом порфирией.</p> <p>Образуются в кишечном тракте под действием бактерий</p>

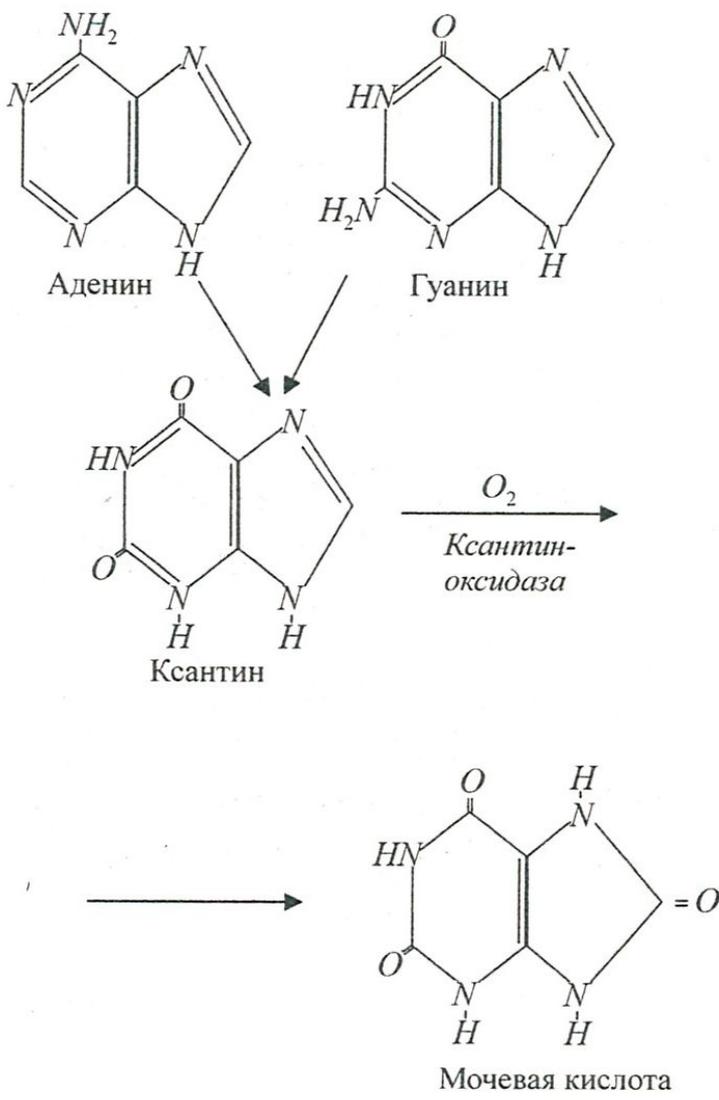
Конечные продукты азотного обмена, присутствующие в городских и бытовых сточных водах

№ п/п	Вещество, его химическая формула	Примечания
4.	<p>Хинальдиновая кислота</p> 	<p>Один из главных продуктов превращения аминокислоты триптофана (через кинуренин), экскретируемых с мочой</p>
5.	<p>Индоксилсульфат</p>  <p>Триптофан</p> <p>Индол</p> <p>Индоксил</p>	<p>Продукт превращения триптофана бактериями кишечника</p>

Конечные продукты азотного обмена, присутствующие в городских и бытовых сточных водах

№ п/п	Вещество, его химическая формула	Примечания
6.	<p>1, 4 - диаминобутан — продукт окисления полиамина спермидина</p> <div style="text-align: center;">  <p>спермидин</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>путресцин (дication 1, 4- диаминобутана)</p> </div> <div style="text-align: center;"> $H_2NCH_2CH_2CH_2CHO \longrightarrow$  <p>Δ' - пирролин</p> </div> <p>α - аминобутиральдегид</p>	<p>В значительных количествах экскретируется с мочой. В клетках <i>E.coli</i> превращается в α - аминобутиральдегид и далее циклизуется в Δ'-пирролин</p>
7.	<p>Гиппуровая кислота</p> <div style="text-align: center;">  </div>	<p>Обычный выводимый с мочой продукт “детоксикации” бензойной кислоты.</p>

Конечные продукты азотного обмена, присутствующие в городских и бытовых сточных водах

№ п/п	Вещество, его химическая формула	Примечания
	<p>Мочевая кислота</p>  <p>Аденин</p> <p>Гуанин</p> <p>Ксантин</p> <p>Ксантин-оксидаза</p> <p>Мочевая кислота</p>	<p>Образуется при распаде пуринов (аденина, гуанина). Основной конечный продукт (вместо мочевины) у птиц и пресмыкающихся. Мочевая кислота выделяется человеком, но затем катаболизируется бактериями. При лечении подагры (нарушении метаболизма пуринов) изомером гипоксантина — аллопуринолом — выделяется ксантин.</p> <p>Наряду с бактериями, осуществляющими ферментативную гидролитическую деструкцию мочевой кислоты, специализированный вид - <i>Bac. fastidiosus</i> осуществляет её окислительную деструкцию. Продуктами окисления являются мочевины, глиоксильная кислота и CO_2.</p>

№ п/п	Вещество, его химическая формула	Примечания
	<p>Органические сульфаты:</p> <p>9.1 Кислотосодержащие эфиры типа:</p> $R - O - SO_3^-$ <p><i>O</i> – сульфаты **</p> <p>9.2 Производные сульфаминовой кислоты:</p> $R - NH - SO_3^-$ <p><i>N</i> – сульфаты **</p> <p>9.3 Сульфозэфиры фенолов</p>	<p>Найдены в продуктах обмена, выделяемых с мочой.</p> <p>Они происходят из сульфозэфиров мукополисахаридов и стероидов, повсеместно распространенных, а также из холинсульфатов и 2-сульфатов аскорбиновой кислоты, содержащихся в каждой клетке.</p>

* — к атомам *O* и *N* присоединяется не сульфат, а сульфурильный радикал.

Введение азота с некоторыми азотсодержащими конечными продуктами обмена человека в сточные воды

Компонент	Количество азота*, г/(сут*чел)	Вклад в концентрацию азота в городских сточных водах, ** мг/дм³
мочевина	6,00-18,00	17,14-51,43
аммиак	0,40-1,00	1,14-2,86
мочевая кислота	0,08-0,20	0,23-0,57
аминокислоты	0,08-0,15	0,23-0,43
липиды	0,30-0,70	0,86-2,00
креатинин	0,30-0,70	0,86-2,00
гиппуровая кислота	0,04-0,08	0,11-0,23

**) по Уайт А. и др., 1981.*

***) расчетные концентрации при норме водопотребления 350 л/(сут*чел).*

Из организма человека за сутки выводится в среднем около 27 грамм мочевины (с содержанием азота 46,6%), что соответствует 80-90% всего азота в моче. Это примерно в 20 раз больше суммарного количества аммиака и мочевой кислоты и в 75-120 раз больше количества аминокислот, выведенных за тот же период. Мочевина, как видно из таблицы, является постоянным и основным источником азота в бытовых и городских сточных водах.

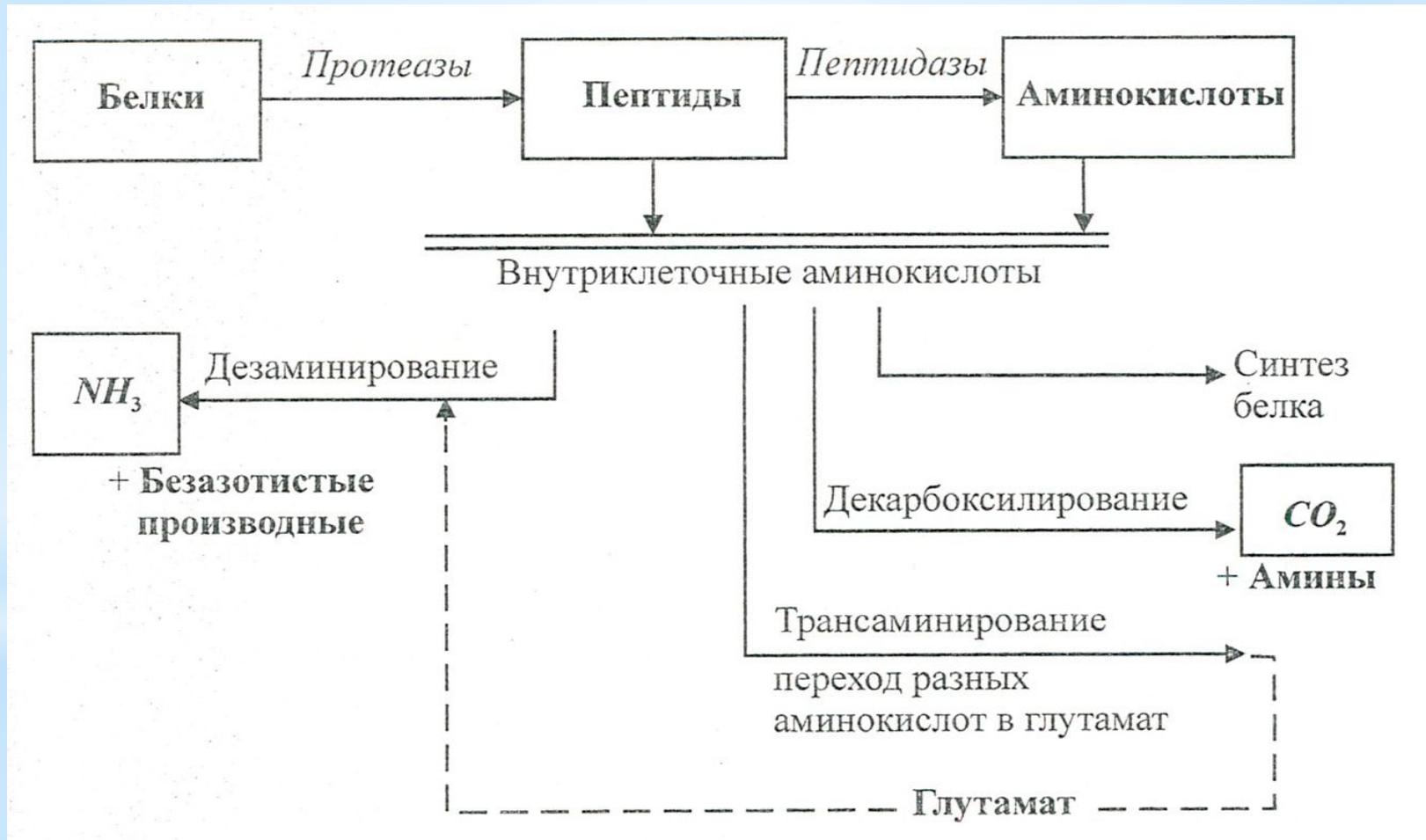
Источники азота в городских и бытовых сточных водах

Важное значение имеет присутствие белкового азота — белков, пептидов, аминокислот. Они могут находиться также в попадающих в сточные воды остатках пищи, неусвоенных белках, пептидах, аминокислотах, остатках пищеварительных соков, в клетках кишечного эпителия, в слизи, крови, в мертвой биомассе микроорганизмов, а также в отходах отраслей промышленности, перерабатывающих животное и растительное сырье, и т. д.

Белки и пептиды сточных вод не могут проходить через клеточную мембрану бактерий; они должны быть предварительно расщеплены внеклеточными протеолитическими ферментами (протеазами, пептидазами) на фрагменты - низкомолекулярные пептиды и аминокислоты. Последние, в свою очередь, активно поглощаются и используются многими микроорганизмами и могут служить не только источниками азота, но и источниками углерода, и факторами роста.

Содержание воды в биомассе живых организмов

Внутри клетки аминокислоты либо используются без изменений для синтеза белка, либо подвергаются различным превращениям, в том числе дезаминированию с выделением аммиака:

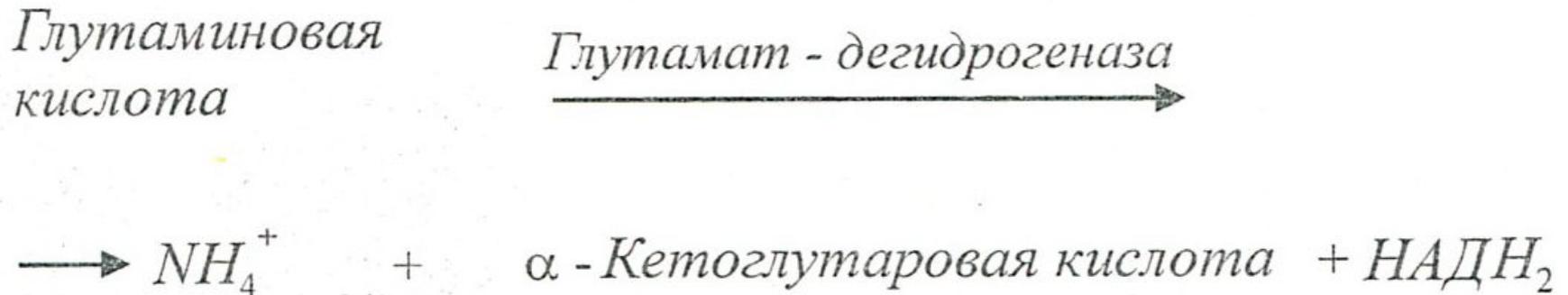


Процессы деструкции с выделением аммиака

Процессу деструкции с выделением аммиака (или ионов NH_3) — аммонизации — в сточных водах подвергаются различные природные и синтетические азотсодержащие органические соединения (источники азота).

Наиболее изученными в биохимическом отношении являются процессы превращения аминокислот. Сюда относятся процессы дезаминирования (окислительного, гидролитического), переаминирования и декарбоксилирования. Для окисления индивидуальных аминокислот существуют различные пути, включающие большое число реакций.

Многие из аминокислот структурно связаны с центральными промежуточными продуктами клеточного метаболизма углеводов, и их расщепление осуществляется очень легко. Например, при дезаминировании глутаминовой кислоты образуется α -кетоглутаровая кислота — безазотистое соединение и компонент цикла трикарбоновых кислот (ЦТК):



Это одна из центральных реакций дезаминирования аминокислот в клетках. Многие другие аминокислоты путем трансаминирования сначала превращаются в глутаминовую кислоту, которая потом и дезаминируется. При этом аминогруппы, собранные из разных аминокислот, освобождаются в виде ионов NH_4^+ .

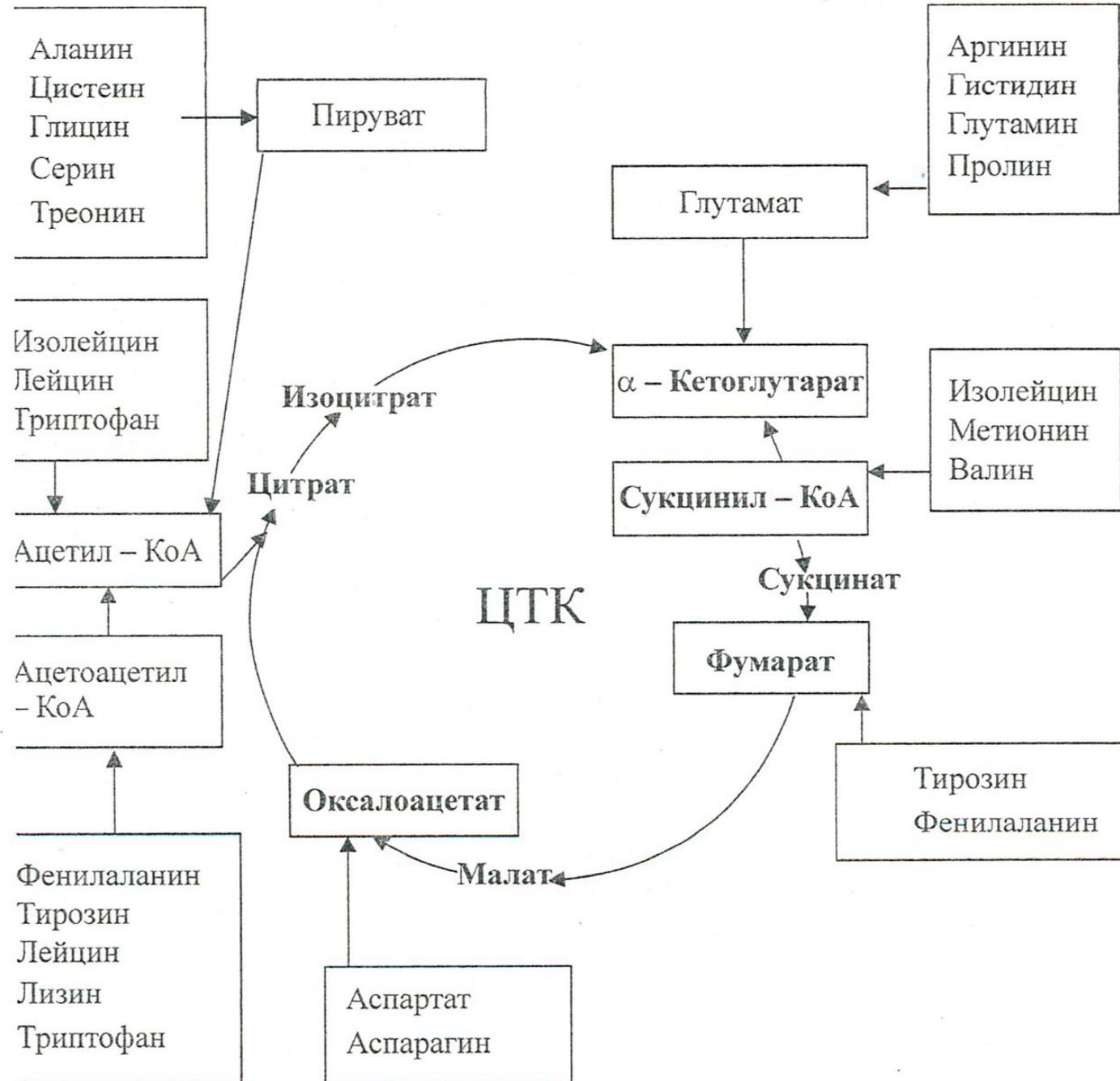
Микробиологические методы очистки воды

Пути введения углеродных скелетов аминокислот в цикл трикарбоновых кислот

Все пути приводят в конечном счете к небольшому числу безазотистых продуктов, вовлекаемых в окисление через ЦТК.

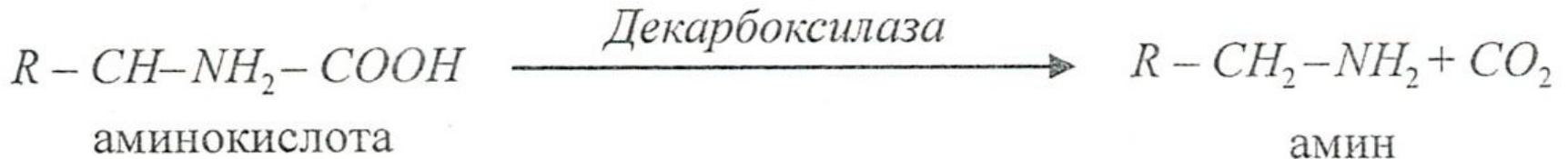
Углеродные скелеты десяти аминокислот превращаются через пируват или ацетоацетил-КоА в ацетил-КоА.

Углеродные скелеты пяти других аминокислот превращаются в α -кетоглутарат, трех аминокислот — в сукцинил-КоА и двух — в оксалоацетат. Две аминокислоты, а именно фенилаланин и тирозин, расщепляются таким образом, что одна часть их углеродного скелета поступает в ЦТК в виде ацетил-КоА, а другая — в виде фумарата



Продукты ферментативного расщепления аминокислот

Не все атомы углерода аминокислот включаются в ЦТК; некоторые из них теряются в виде CO_2 в результате реакций декарбоксилирования:



Эти реакции приводят к образованию аминов, соответствующих аминокислотам (гистамин, триптамин, окситирамин и др.). При этом могут образовываться в небольшом количестве и летучие метил- и этиламины (триметиламин, триэтиламин, изобутиламин и др.), имеющие неприятный запах. При бактериальном брожении (например, у *E. coli*) из белков образуются два амина — путресцин и кадаверин, относящиеся к группе полиаминов:



1, 4 - диаминобутан
(путресцин)



1, 5 - диаминопентан
(кадаверин)

Они образуются при декарбоксилировании орнитина и лизина, соответственно. Вне клеток путресцин и кадаверин обладают ядовитыми свойствами ("трупные яды").

Аэробное и анаэробное разложение белков и продуктов их протеолиза.

*В аэробных условиях белки и продукты их протеолиза (пептиды, аминокислоты и др.) в сточных водах подвергаются окислению и может наступить их полная минерализация. В качестве конечных продуктов образуются аммиак, углекислый газ, вода, соли серной и фосфорной кислот (при аммонификации соответствующих сложных белков). В этих процессах в сточных водах принимают активное участие многочисленные виды бактерий, в том числе псевдомонады (*Ps. putida*, *Ps. putresfaciens* и др.), бациллы (*Bac. subtilis*, *Bac. mycoides*, *Bac. mesentericus* и др.), *Proteus vulgaris*, *E. coli* и другие.*

В анаэробных условиях процессы разложения белков в сточных водах могут осуществлять клостридии, протей, энтеробактерии, водные мицелиальные грибы в различных процессах брожения. В этих условиях, помимо аммиака и углекислого газа, могут выделяться различные органические кислоты, спирты, амины, водород, сероводород и другие вещества, в том числе фенол, крезол, ацетон, скатол, меркаптан.

Преобразования соединений азота при участии микроорганизмов в анаэробных условиях

Диамины образуются при аммонификации продуктов протеолиза белков – диаминомонокарбоновых аминокислот. Так, при декарбоксилации лизина и орнитина, как упоминалось выше, образуются диамины кадаверин, путресцин и углекислый газ. Эти амины, сероводород, меркаптаны, аммиак, фенол, крезол, индол, скатол ядовиты и имеют неприятный запах.

*Аммонификации в анаэробных условиях, помимо белков, пептидов и мочевины, легко подвергаются мочева кислота, пуриновые и пиримидиновые азотистые основания. Её осуществляют представители родов *Clostridium* и *Peptococcus*. Аммонификации могут подвергаться синтетические азотсодержащие соединения, попадающие в сточные воды при производстве и применении пестицидов, растворителей, взрывчатых веществ, окислителей ракетного топлива и т. д. Например, аммонифицируются пестициды — производные мочевины, карбаматов, триазина, содержащие азот в виде амидо ($-CONH_2$) - или имидогрупп ($-NH$). В процессах деструкции этих веществ в сточных водах могут принимать участие различные псевдомонады и бациллы, разрушающие пестициды с образованием соответствующих аминов и аммиака.*

Синтетические нитросоединения (типа нитробензойной кислоты) также могут разрушаться микроорганизмами в процессе аммонификации. При этом вначале нитрогруппа восстанавливается до аминогруппы, а затем следует дезаминирование продукта реакции.

Известен и другой путь деструкции нитросоединений, а именно прямое гидролитическое отщепление нитрогруппы с выделением нитритов. Оба пути в конечном итоге приводят к образованию протокатеховой кислоты, которая тем в серии последовательных ферментативных реакций превращается в янтарную кислоту (сукцинат), включающуюся в цикл Кребса (ЦТК). Эти процессы привлекают внимание исследователей в связи с их значением в круговороте углерода и азота в водоемах. Сбалансированность этих процессов, приводящая к самоочищению водоемов, является примером для процессов биологической очистки.

Микробиологические методы очистки воды

Пути введения окисленных форм азота в цикл трикарбоновых кислот

*Окисленные формы азота в сточных водах — нитраты и нитриты. Нитраты могут использоваться многими микроорганизмами, но не всеми. Прежде чем включиться в органические соединения, нитрат должен быть восстановлен до иона NH_4 . Нитрит является продуктом нитрат-нитритного дыхания бактерий р. *Nitrosomonas* и физиологически близких ему видов — грамотрицательных хемолитотрофных бактерий. Они фиксируют CO_2 в цикле Кальвина, а энергию для восстановления CO_2 получают от окисления аммиака (аммоний- окисляющие бактерии).*

*Нитрит может окисляться до нитрата бактериями р. *Nitrobacter*, использующими для получения энергии окисление нитритов (нитритокисляющие бактерии).*

*Наиболее интересной является группа гетеротрофных нитрификаторов — микроорганизмов, способных осуществлять процессы окисления соединений азота (органических и неорганических) для получения энергии. К гетеротрофным нитрификаторам относятся бактерии *Arthrobacter globiformis*, *Alcaligenes faecalis*, *Aerobacter aerogenes*, *Thiosphaera pantotropha*, встречающиеся в сточных водах.*

Замечательным в этом процессе является то, что многие гетеротрофные нитрификаторы одновременно осуществляют процесс денитрификации, и в этом случае накопления нитратов не происходит.

Оптимальные условия проведения процессов нитрификации и денитрификации

Предпочтительным источником азота у микроорганизмов служит аммиак (ион NH_4^+), который может использоваться практически всеми микроорганизмами. При этом доступность источника азота определяется соотношением главных источников питания — углерода, азота и фосфора. Согласно рекомендации СНиП 2.04.03-85, соотношение должно быть следующим:

$$\text{БПК} : \text{N} : \text{P} = 100 : 5 : 1$$

В этом соотношении БПК является мерой количества источника углерода, N— количества азота в аммонийной форме и P — количества фосфора в виде фосфатов.

Сравнительное содержание элементов питания в сточных водах и в питательной среде

Показатель	Сточные воды		Питательная среда
	бытовые (отстоенные)	городские	
ХПК, мг/дм ³	370	121	1480
Азот аммонийный, мг/дм ³	46	19	196
С : N (БПК : N)	8 : 1	6 : 1	8 : 1
Фосфаты, мг/дм ³	7	5	28
ХПК : N : P	53 : 7 : 1	21 : 4 : 1	53 : 7 : 1
На 100 частей БПК			
ХПК : N : P	100 : 12 : 2	100 : 16 : 4	100 : 13 : 2

Ни лабораторная питательная среда, ни бытовые и ни городские сточные воды не удовлетворяют соотношению

$$\text{БПК} : \text{N} : \text{P} = 100 : 5 : 1$$

Городские сточные воды содержат значительный избыток фосфора и азота, то есть существует большой лимит по углеродному питанию для микроорганизмов-гетеротрофов, являющихся основными минерализаторами загрязнений.

Микробиологические методы очистки воды

Необходимый баланс углерода азота и фосфора в сточных водах

В некоторых видах промстоков, например в сточных водах нефтеперерабатывающих заводов, в стоках некоторых микробиологических производств и производств пищевой промышленности, наоборот, азота и фосфора может быть меньше рекомендуемого, и их необходимо добавлять в виде хлористого аммония и фосфатов. В бытовых и городских сточных водах доступного бактериям азота всегда достаточно.

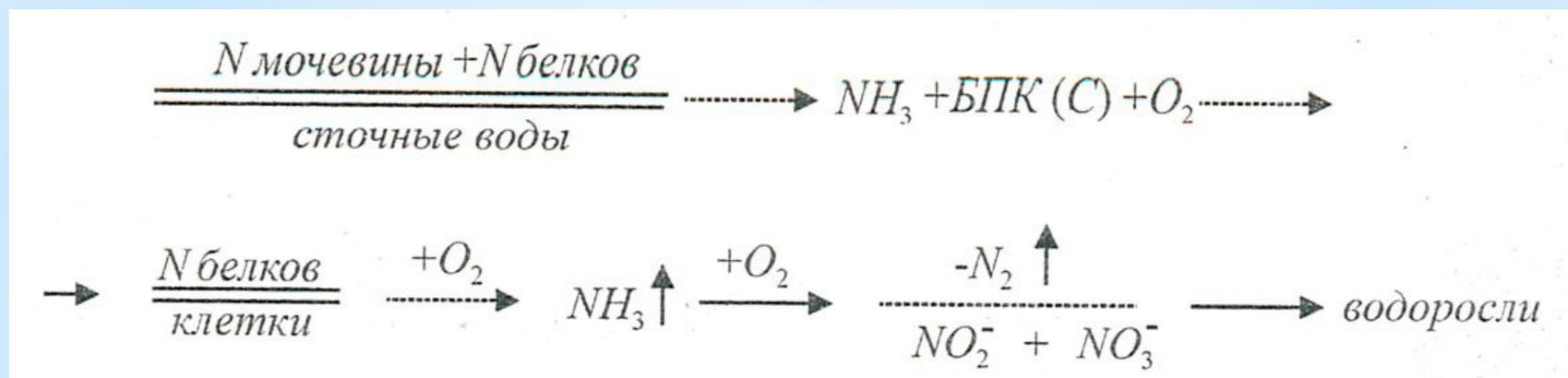
Аммонийный азот, как было показано, образуется в основном при гидролизе мочевины и аммонификации белкового азота.

В каждом конкретном случае оптимальное соотношение БПК : N : P индивидуально, так как оно определяется количеством видовым составом микроорганизмов, который, в свою очередь, зависит от состава очищаемой воды.

Сравнение состава "усредненных" бытовых стоков со стехиометрическими зависимостями между C, N и P в бактериальных клетках показывает, что только часть фосфора или азота вводится в ил. Неорганические питательные вещества, содержащиеся в выпусках сточных вод, прошедших биологическую очистку, могут быть превращены в клеточный материал водорослей. При этом свет, CO₂ и другие необходимые водорослям соединения обычно присутствуют в водоеме-приемнике в достаточном количестве.

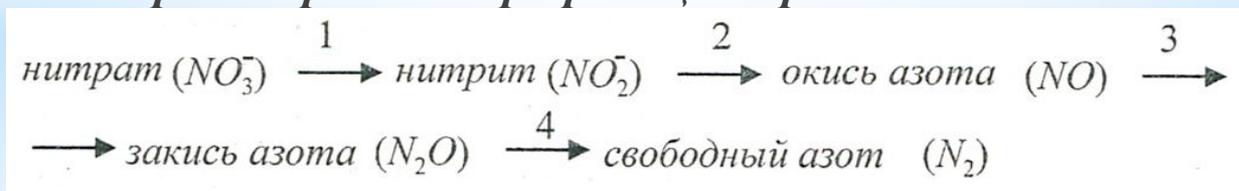
Цикл превращения азота в процессах биоокисления бытовых сточных вод

Цикл превращений азота в процессах биоокисления загрязнений сточных вод в общем виде может быть представлен схемой:



Под БПК(С) здесь понимается наличие в воде источника углеродного питания клеток. Наиболее интенсивно азот используется в период роста клеток, а в период окисления клеточного материала он высвобождается вновь в виде аммиака. Выделившийся аммонийный азот может окисляться до нитратов и нитритов, либо повторно использоваться для нового цикла синтеза. На заключительных этапах превращений соединений азота группа бактерий — факультативных анаэробов-денитрификаторов окисленные формы азота восстанавливает до N_2 или других газообразных продуктов.

Восстановление нитрата при денитрификации протекает в несколько этапов:



Принципиально весь путь (реакции 1-4) и каждая ступень пути способствуют росту популяций бактерий.

Группы микроорганизмов, восстанавливающих соединения азота в анаэробном дыхании при денитрификации

группа микроорганизмов	реакция	типы бактерий	характеристика процесса
Организмы, способные восстанавливать нитраты только до нитритов	1	многие гетеротрофные бактерии, а также некоторые автотрофные, например <i>Thiobacillus thioparus</i>	Процесс представляет собой нитритное дыхание
Организмы, способные восстанавливать нитриты до закиси азота	1-3	<i>Achromobacter nephrii</i> , <i>Aquaspirillum itersonii</i> , <i>Halobacterium sp.</i> , <i>Pseudomonas spp.</i>	
Организмы, способные восстанавливать до свободного азота нитриты, но не нитраты	2-4	<i>Neisseria</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Corynebacterium nephridiv</i> , до NiO и NO — <i>Pseudomonas tutzerii</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Achromobacter cycloclastes</i> .	
Организмы, способные редуцировать закись азота до свободного азота	4	многие гетеротрофные бактерии, а также некоторые автотрофные, например <i>Thiobacillus thioparus</i>	
Организмы, способные восстанавливать нитраты только до нитритов	4	например, <i>Vibrio succinogenes</i> , <i>Camphylobacter itus</i>	
Организмы, способные осуществлять редукцию нитратов до газообразного азота	2-4	представители очень многих родов и физиологических групп: представители пурпурных бактерий <i>Rhodopseudomonas sphaerogenies</i> , хемолитотрофные сероокисляющие бактерии <i>Thiobacillus denitrificans</i> , <i>Ъ. versutus</i> , <i>Thiomicrospira</i> , <i>Thermothrix</i> , <i>Thiosphaera</i> , почкующиеся бактерии <i>fyphomicrobium sp.</i> , грамотрицательные бактерии родов <i>Alcaligenes</i> , <i>Aeroxonas</i> , <i>Aquaspirillum</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Camphylobacter</i> , <i>Chromoacterium</i> , <i>Halobacterium</i> , <i>Gluconobacter</i> , <i>Flavobacterium</i> <i>Neisseria</i> , <i>Paracoccus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Veilonella alcalescens</i> ; грамположительные бактерии р. <i>Bacillus</i> 11 видов), <i>CI. perfringens</i> , <i>Propionibacterium pentosaceum</i> , некоторые виды рода <i>Corynebacterium</i> и др.	

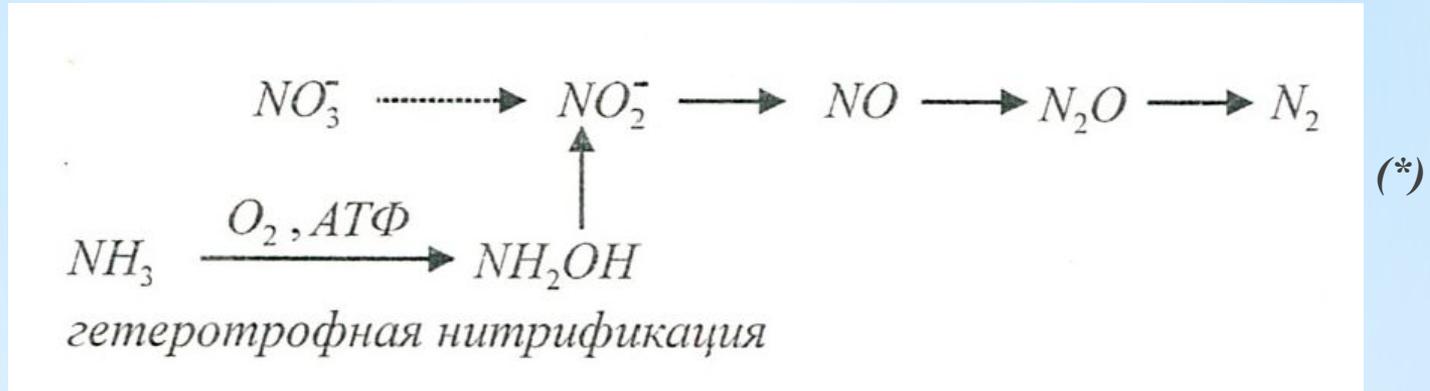
Аэробные денитрификаторы

Многие денитрификаторы способны развиваться автотрофно за счет окисления водорода (водородная денитрификация). Осуществлять денитрификацию с использованием водорода в качестве донора электронов способен целый ряд факультативно анаэробных бактерий. К ним относятся *Paracoccus denitricans*, *Micrococcus lactilyticus* (*Veilonella alcalescens*), отдельные штаммы *Th. denitrificans*, *A. eutrophus*, *Proteus mirabilis*, *P. saccharophyla*, *E. coli*, *V. succinogenes*, *Camphylobacter* (штам. DSM 806 и DL-1), *Th. versutus*, *Thiosphaera pantotropha*, *Hyphomicrobium* sp.

Существует также метилотрофная денитрификация, т. е. окисление одноуглеродных соединений, иных, чем формиат (метанол, метиламин, ди- и три- метиламин), с участием нитратов в качестве акцептора электронов, свойственная представителям рода *Hyphomicrobium*, а также *Paracoccus denitrificans*. Обнаружены и другие бактерии, не получившие видового названия.

Аэробные денитрификаторы

Некоторые виды способны осуществлять процесс денитрификации даже при наличии в среде растворенного кислорода. При этом у *Thiosphaera pantotropha* зарегистрировано одновременное протекание процессов дыхания с потреблением в качестве акцепторов электронов как кислорода, так и нитратов. Предполагают, что в этих случаях одновременно функционируют две различные ветви цитохромного участка дыхательной цепи и реакции протекают по схеме:



Чувствительность денитрифицирующих бактерий к растворенному кислороду (в условиях хемостатного культивирования) варьирует в широких пределах и составляет 95% от полного насыщения у *Tsa. pantotropha*, 55-75% — у *A. faecalis*, 15% — у *Nyphomicrobium sp.*, 10% — у *Paracoccus denitrificans*.

Процессы (*) могут дать объяснение фактам так называемой аэробной денитрификации, т. е. образования N_2 за счет денитрификации в присутствии в среде значительных количеств кислорода, что имеет место и при биоочистке сточных вод. Поэтому окисленные формы азота отсутствуют на начальных этапах биологической очистки даже в том случае, если какие-либо производственные стоки при сбросе их в общую канализацию содержат в своем составе нитраты и нитриты. Эти окисленные формы появляются в достаточно очищенных сточных водах, и наличие нитратов и нитритов является свидетельством глубоко прошедшего процесса

Микробиологические методы очистки воды биоочистки.

Диссимиляционная нитратредукция и восстановление нитратов

Процесс диссимиляционной нитратредукции осуществляют микроорганизмы различных физиологических и таксономических групп. Среди них:

Aerobacter aerogenes, Aquaspirillum itersonii, Camphylobacter fetus, C. sputorum, Citrobacter freundii, Cytophaga sp., E. coli, Klebsiella aerogenes, Selenomonas ruminantium, Serratia marcescens, Proteus mirabilis, Staphylococcus aureus, Spirillum sp., V. succinogenes, B. stearrowthermophilus, нитратные бактерии рода Rhodopseudomonas, сульфатредуцирующие бактерии Desulfobulbus propionics, некоторые штаммы Desulfovibrio desulfuricans, Desulfomonas pigra, Desulfobacterium catecholicum. У некоторых видов сульфатредукторов нитрат служит предпочтительным акцептором электронов в присутствии сульфатов. Установлена также способность к редукции нитрата до аммиака при окислении водорода у представителей рода Desulfovibrio. В этом случае необходимо присутствие в среде ацетата и CO_2 для целей конструктивного метаболизма.

Процессы восстановления нитратов до N_2 и NH_3 могут происходить при биоочистке одновременно. Процесс диссимиляционной нитратредукции протекает преимущественно в условиях, при которых имеется высокое соотношение аммоний : нитраты. Этот процесс преобладает над денитрификацией в аноксидных условиях, тогда как в аэрируемом поверхностном слое отмечено относительное преобладание денитрификации.

Биохимической основой биологической очистки, нацеленной на деструкцию органических соединений, являются метаболические процессы у микроорганизмов-деструкторов, поддерживаемые процессами питания. Обеспечение необходимого сочетания основных элементов питания, прежде всего С, N и P, является одновременно основой успешного проведения процессов биоочистки.

Соединения фосфора в сточных водах

Фосфор, как и азот, имеет большое значение в жизнедеятельности микроорганизмов, так как он входит в состав ядерного вещества, участвует в синтезе белка, в реакциях фосфорилирования. Наряду с углеродом и азотом, он относится к числу важнейших биогенных элементов. Известно, что фосфор встречается в живых организмах, в том числе и в микроорганизмах, только в пентавалентном состоянии в виде свободных фосфат-ионов (PO_4^{3-}) или в виде органических фосфорсодержащих соединений.

Живые клетки не способны поглощать большинство органических фосфорсодержащих соединений, за исключением глицерофосфатов и фосфолипидов, которые иногда используют как источники фосфора в составе питательных сред для выращивания микроорганизмов.

Другие органические фосфаты перед их использованием должны быть минерализованы, так как основные потребности в фосфоре удовлетворяются в результате поглощения фосфатных ионов, из которых внутри клетки синтезируются затем органические фосфорсодержащие соединения: нуклеиновые кислоты (РНК, ДНК), фосфолипиды, нуклеопротеиды, фосфопротеиды, полимеры клеточной стенки грамположительных бактерий, различные нуклеотиды, многие ферменты, а также полиметафосфаты, накапливающиеся в клетках при избытке фосфатов. Все активные формы низкомолекулярных соединений, участвующие в процессах энергетического обмена и биосинтеза, представляют собой фосфорилированные формы.

Соотношение содержания фосфора, кальция и магния в клетках микроорганизмов

Фосфор играет большую роль в физиологии микроорганизмов, участвуя в важнейших информационных и энергетических процессах в клетке, хотя содержание его в составе биомассы клеток невелико. Например, содержание фосфора в бактериальных клетках составляет приблизительно 1,5% веса сухой биомассы, но может изменяться, возрастая с увеличением скорости роста и уменьшаясь со снижением температуры. Эти изменения отражают динамику РНК в клетках. При этом у бактериальных клеток существует специфическое соотношение между количествами магния, калия, фосфора и РНК. Эти соотношения отличаются для грамотрицательных (А) и грамположительных (Б) бактерий:

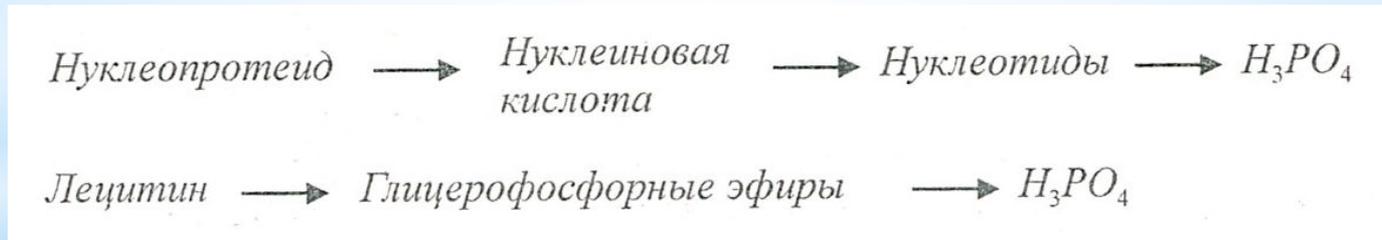
		Mg	:	K	:	РНК-нуклеотид	:	PO_4^{3-}
А	=	1		4		5		8
Б	=	1		13		5		13

Молекулярное соотношение этих компонентов не зависит от скорости роста, температуры, но при лимитации роста фосфатом у грамположительных бактерий оно становится таким же, как и у грамотрицательных бактерий. Существование оптимальных соотношений компонентов необходимо учитывать как при составлении питательных сред для выращивания микроорганизмов, входящих в состав биоселективных препаратов, так и при оценке возможностей микроорганизмов по изъятию соединений фосфора из сточных вод.

Формы существования фосфора в сточных водах

В сточные воды соединения фосфора попадают с остатками растений, с биомассой микроорганизмов, с физиологическими выделениями человека и животных, с неиспользованными остатками удобрений (например, суперфосфата), с фосфорсодержащими пестицидами (например, с хлорофосом). Главными источниками фосфорных соединений в бытовых и городских сточных водах являются синтетические моющие средства (СМС), содержащие полифосфаты, например $\text{Na}_6(\text{PO}_3)_6$ и физиологические выделения людей. Известно, например, что из 3,3 г/сутки фосфатов (в пересчете на P_2O_5) бытовых сточных вод 1,6 г/сутки, т. е. примерно 50%, происходят из СМС.

Органические формы фосфора, находящиеся в сточных водах в растительных и животных остатках, а также в биомассе микроорганизмов, минерализуются с помощью многоэтапного ферментативного гидролиза. Вначале происходит дезинтеграция клеток с помощью литических ферментов с выделением биополимеров. Тем более, что разбавление и недостаток питания, имеющие место в сточных водах, стимулируют процессы автолиза в биомассе микроорганизмов. Фосфорорганические биомолекулы расщепляются далее при участии ферментов нуклеаз и фосфатаз по схеме:



Освобождающаяся H_3PO_4 быстро связывается с основаниями, образуя соли. Водорастворимые фосфаты Na , K и аммония доступны для гидробионтов, а нерастворимые в воде фосфаты Al , Ca , Mg или Fe растворяются кислотообразующими микроорганизмами, в том числе серобактериями, тионовыми и нитрифицирующими бактериями.

Микробиологические методы очистки воды

Способность микроорганизмов к деструкции соединений фосфора

Способностью к минерализации фосфорорганических соединений обладают многие бактерии, микроскопические грибы и актиномицеты. Для очистки сточных вод имеют значение экзонуклеазы бактерий. Их могут выделять в среду, т. е. в очищаемые сточные воды, некоторые неспоровые бактерии родов *Pseudomonas*, *Micrococcus* (например, 5'-нуклеотидазы *Micrococcus sodonensis*), *erratia* (РНКазы *Serratia marcescens*), а также гемолитические стрептококки и золотистые стафилококки (ДНКазы).

Основными продуцентами нуклеаз являются грамположительные споровые палочки, что связано с особенностями строения их клеточной стенки. В связи с этим важнейшими минерализаторами фосфорорганических соединений в сточных водах могут быть представители рода *Bacillus* (*Bac. amyloliquefaciens*, *Bac. subtilis*, *Bac. amylolyticus*, *Bac. licheniformis*, *Bac. umilis*, *Bac. intermedius*, *Bac. mesentericus*, особенно *Bac. mesentericus* var. *phosphaticum*). При этом следует отметить, что скорость секреции нуклеаз ингибируется фосфатами по принципу обратной связи, что может иметь место в сточных водах, содержащих фосфатов более 0,1-1,0 мг/мл.

Токсичные для животных, в том числе для гидробионтов сточных вод, фосфорорганические пестициды (например, хлорофос), мишенями для которых являются нервные клетки, а точнее фермент ацетилхолинэстераза, могут разлагаться бактериями.

Микроорганизмы, способные к накоплению фосфора

Многие бактерии, дрожжи, водоросли очистных сооружений используют некоторое количество фосфатов на синтез биомассы. Число микроорганизмов, способных потреблять значительное количество фосфатов, невелико, и они относятся к различным таксономическим группам.

Избыточный фосфор, как было показано в ряде исследований, накапливается в микроорганизмах в виде различных биополимеров. Например, у *Arthrobacter globiformis* фосфор накапливается в форме РНК (до 40% от сухого вещества клетки), у *Methanobacterium thermoautotrophicum* — в виде метафосфогена, у патогена *Neisseria gonorrhoeae* — в виде связанных с капсулой полифосфатов. Многие микроорганизмы содержат фосфор в составе полифосфатных гранул (метахроматин, волютин) в цитоплазме.

Активно поглощают фосфаты бактерии рода *Acinetobacter*, которые в аэробных условиях аккумулируют фосфор в виде полифосфатных гранул в количестве до 20% от сухого веса клеток и выделяют его при анаэробных условиях культивирования. При этом сверхнакопление фосфата (до 140 мг/л) происходит на среде, богатой ацетатом и при высокой концентрации бактерий (10^8 клеток/мл). Поскольку образование ацетата происходит в анаэробных условиях культивирования, предполагается, что основное назначение анаэробных зон в процессе биологической очистки сточных вод от фосфора — образование ацетата или других небольших молекул органических соединений.

Культура *Citrobacter freundii* также способна накапливать фосфор в виде лабильных органических соединений, в частности в виде АТФ, потребляя фосфаты в экспоненциальной фазе роста в аэробных условиях. Культура способна за 72 часа поглотить фосфора до 100 мг/л, но с увеличением концентрации фосфора растет и время его поглощения. Расход АТФ в анаэробных условиях сопровождается выбросом фосфата.

Бактерии, способные накапливать фосфор, выделены из активных илов. Значительные количества фосфата накапливают, например, *Arthrobacter ureafaciens* и *Aerobacter aerogenes*.

Микробиологические методы очистки воды

Некоторые виды бактерий активного ила, накапливающие фосфор

Виды бактерий	Накопление фосфатов, пг/клетку	
	Фаза роста	
	экспоненциальная	стационарная
<i>Bacillus cereus</i>	0,45	0,08
<i>Acinetobacter calcoaceticus var. anitratus</i>	0,12	-0,07 *
<i>Acinetobacter calcoaceticus var. lwoffii</i>	0,04	0,005
<i>Citrobacter freundii</i>	0,04	-0,02 *
<i>Pseudomonas cepacia</i>	0,015	0,01
<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	0,001	0,0

Наиболее перспективным накопителем фосфатов оказалась культура *Bac. cereus*, которая поглощала фосфаты не только в экспоненциальной, но и в стационарной фазах роста, и в больших количествах, чем другие бактерии. Эта способность связывается с более крупными размерами клеток *Bac. cereus* по сравнению с размерами клеток других исследованных микроорганизмов.

Известно также, что типичный обитатель активного ила многих сооружений биологической очистки — *Zoogloea ramigera* — также способна накапливать фосфор.

Но, несмотря на потенциально высокие способности микрофлоры активного ила к минерализации и поглощению соединений азота и фосфора, при традиционной технологии биологической очистки сточных вод обычно удаляется не более 30-50% азота и фосфора

Микробиологические методы очистки воды

Показатели качества поступающей и очищенной городской сточной воды при традиционной биологической очистке (БПК, азот, фосфор)

Показатель	Сточная вода	
	мг/дм ³	
	поступающая в аэротенк	очищенная, сбрасываемая в Финский залив
<i>БПК₅</i>	47,00-110,00	3,70-5,00
<i>БПК_{полн.}</i>	69,00-173,00	6,80-11,30
<i>N_{общ.}</i>	22,50-31,50	13,60-15,50
<i>N_{аммон.}</i>	16,50-17,50	7,00-8,50
<i>NO₂⁻</i>	0,06-0,09	0,22-0,35
<i>NO₃⁻</i>	0,20-0,30	5,40-7,00
<i>фосфаты</i>	4,10-5,50	2,60-4,20
<i>фосфор общий</i>	16,00-27,00	4,70-5,30

Очищенные сточные воды содержат в избытке азот и фосфор, особенно фосфор. Считается, что именно фосфор являясь главным биогенным элементом, приводящим к эвтрофикации водоемов- приемников, особенно морей, в которых несбалансированный рост альгофлоры обычно сдерживается недостатком фосфатов.

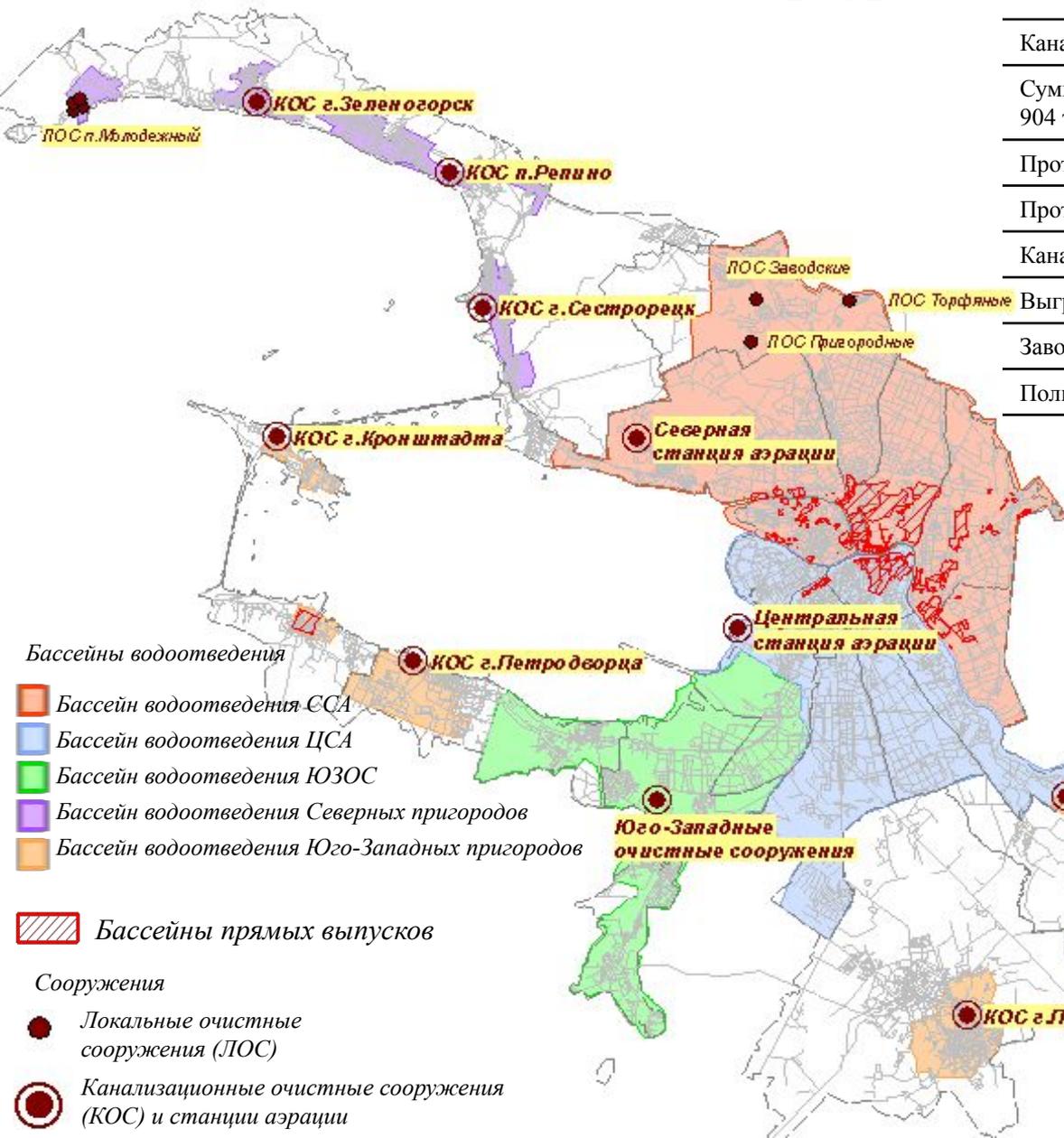
Показатели качества поступающей и очищенной городской сточной воды при традиционной биологической очистке (БПК, азот, фосфор)

*Учитывая огромные массы сточных вод, крупные города вносят большой вклад в эвтрофикацию водоемов-приемников, в частности в эвтрофикацию Балтийского моря, уже прослеживаемую по изменению структуры фитоценоза и более раннему началу развития водорослей, особенно синезеленых (*Aphanizomenon flosaquae*), вызывающих сокращение толщины трофогенного слоя даже в центральном районе и к югу от Стокгольма.*

Для Балтийского моря, согласно рекомендациям Хельсинкской комиссии стран Балтийского моря, установлены следующие среднегодовые концентрации БПК₅, азота и фосфора в биологически очищенных водах, мг/дм³:

$$БПК_5 = 15 - 20; P_{общ.} = 1 - 1,5; N_{общ.} = 8 - 12.$$

Основные показатели системы водоотведения Санкт-Петербурга на 01.01.2010



Бассейны водоотведения

- Бассейн водоотведения ССА
- Бассейн водоотведения ЦСА
- Бассейн водоотведения ЮЗОС
- Бассейн водоотведения Северных пригородов
- Бассейн водоотведения Юго-Западных пригородов
- Бассейны прямых выпусков

Сооружения

- Локальные очистные сооружения (ЛОС)
- Канализационные очистные сооружения (КОС) и станции аэрации

Канализационные очистные сооружения (КОС) - 21 шт.
Суммарный объем очищенных сточных вод (в сухую погоду) - 1 904 тыс. м ³ /сут.
Протяженность канализационной сети - 7,9 тыс. км
Протяженность тоннельных коллекторов - 221,22 км
Канализационные насосные станции - 109 шт.
Выгребные колодцы - 24,5 тыс. шт.
Заводы по сжиганию осадка - 3 шт.
Полигоны и иловые площадки для складирования осадка - 173 га

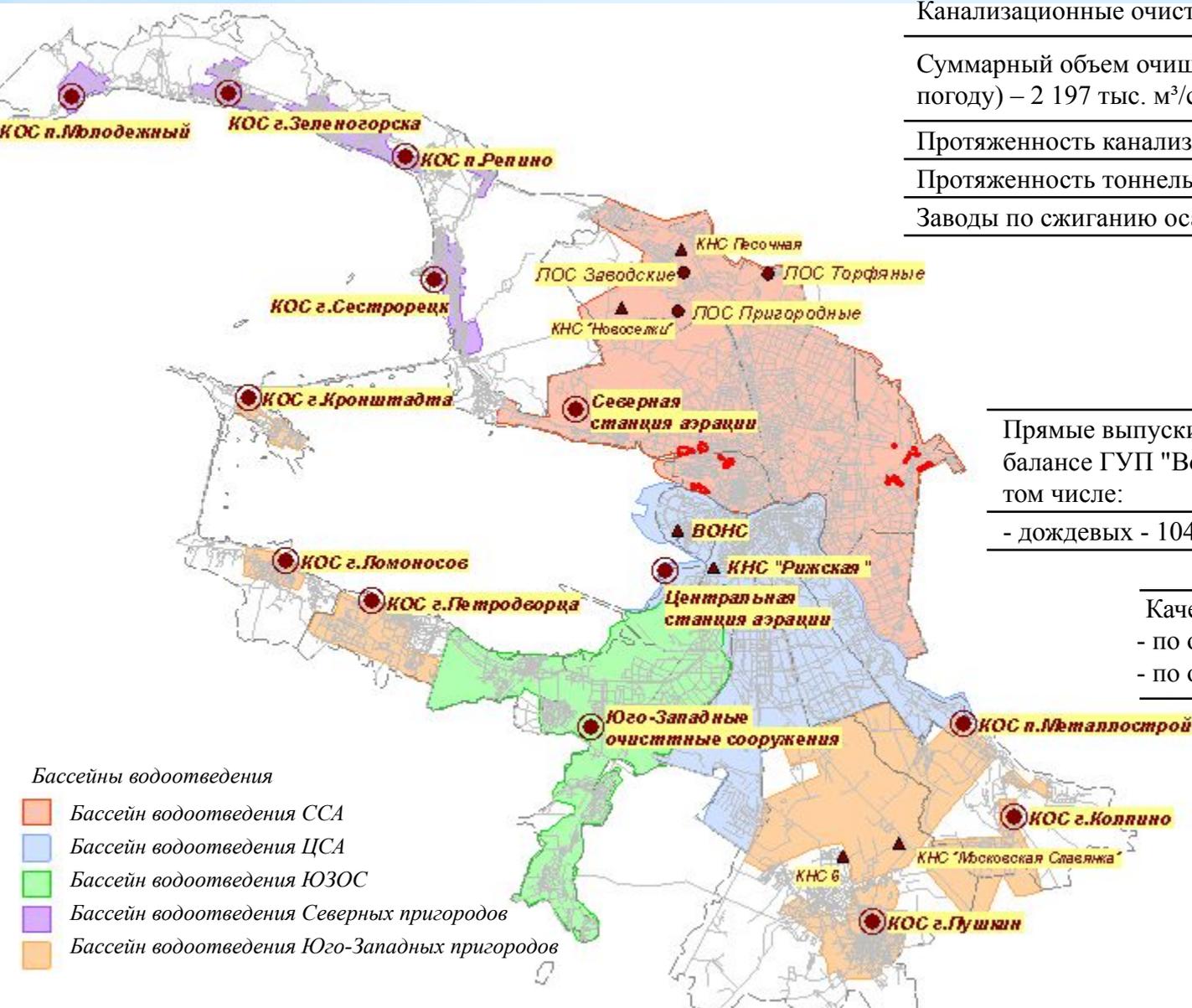
Прямые выпуски сточных вод без очистки на балансе ГУП "Водоканал Санкт-Петербурга", в том числе:

- общесплавные, хозяйственно-бытовые - 146 шт.
- дождевых - 1048 шт.
- прямых выпусков промывных вод водопроводных станций и станций доочистки - 13 шт.

Качество очистки сточных вод :

- по общему азоту - 10,6 мг/л
- по общему фосфору - 0,79 мг/л
- по взвешенным веществам - 10,3 мг/л

Основные показатели системы водоотведения Санкт-Петербурга на 01.01.2016



Канализационные очистные сооружения (КОС) - 18 шт.

Суммарный объем очищенных сточных вод (в сухую погоду) – 2 197 тыс. м³/сут.

Протяженность канализационной сети - 8,3 тыс. км

Протяженность тоннельных коллекторов - 276 км

Заводы по сжиганию осадка - 3 шт.

Прямые выпуски сточных вод без очистки на балансе ГУП "Водоканал Санкт-Петербурга», в том числе:

- дождевых - 1040 шт.

Качество очистки сточных вод :

- по общему азоту – 8 мг/л

- по общему фосфору – 0,5 мг/л

Бассейны водоотведения

- Бассейн водоотведения ССА
- Бассейн водоотведения ЦСА
- Бассейн водоотведения ЮЗОС
- Бассейн водоотведения Северных пригородов
- Бассейн водоотведения Юго-Западных пригородов

Сооружения

- Локальные очистные сооружения (ЛОС)
- Канализационные очистные сооружения (КОС) и станции аэрации
- Канализационные насосные станции (КНС)