

Дао Линь Тхи Тху, Нго Куен Куи, О. Н. Ильинская

ОСОБЕННОСТИ МИКРОФЛОРЫ В УСТАНОВКЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД НЕФТЕХИМИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

Ключевые слова: нефтехимические сточные воды, стирол, окись пропилена, биологическая предварительная обработка, суспендированная микрофлора, иммобилизованная микрофлора.

*В работе изучена особенность микрофлоры в установке предварительной очистки сточных вод производства стирола с окисью пропилена. Изучен состав микробного сообщества, участвующего в процессе биологической очистки сточных вод в биореакторе. Установлены величины нагрузки по органическим загрязнениям необработанной и обработанной сточных вод. Рассчитана эффективность работы биореактора. Определено, что значения ХПК поступающей на очистку сточной воды достигает 80000 мг/л за анализируемый период. Численность микроорганизмов в биореакторе установки предварительной биоочистки данных сточных вод составила от 0.74×10^5 до 0.23×10^6 и от 1.68×10^5 до 1.7×10^6 для суспендированной и иммобилизованной микрофлоры, соответственно. Установлено, что основной вклад в очистку вносят бактерии из родов *Pseudomonas* и *Lysinibacillus*.*

Keywords: petrochemical wastewater, styrene, propylene oxide, biological pre-treatment, suspended microflora, immobilized microflora.

*In this paper we studied the characteristics of microflora in the apparatus for pre-treatment of wastewater from styrene and propylene oxide production. The composition of microbial community that participated in the process of biological treatment of wastewater in the bioreactor was studied. The values of organic loading of influent and effluent wastewaters were established. The operating efficiency of the bioreactor was estimated. The COD values of the influent wastewater reached 80000 mg/l during the analyzed period. The amount of microorganisms in the bioreactor apparatus of the studied wastewater pretreatment ranged from 0.74×10^5 to 0.23×10^6 and from 1.68×10^5 to 1.7×10^6 for suspended and immobilized microflora, respectively. It was established that bacteria from the genera *Pseudomonas* and *Lysinibacillus* contributed mainly in the treatment process.*

Введение

Окись пропилена является крупнотоннажным сырьем для производства целого ряда важнейших продуктов нефтехимии, таких как полиуретаны, гликоли, косметические средства, медицинские препараты. На сегодняшний день ОАО «Нижнекамскнефтехим» (ОАО «НКНХ») (Татарстан) является одним из двух предприятий на территории СНГ, которые выпускают окись пропилена [1, 2]. Стирол используется для производства полистирольных пластмасс, бутадиен-стирольных каучуков, лакокрасочных материалов, клеев, пенополистирольных пластиков.

При совместном производстве стирола с окисью пропилена (СОП) образуется большое количество концентрированных сточных вод, содержащих исходные, промежуточные и побочные ароматические соединения, а также производные алифатических углеводородов, в том числе альдегиды, кетоны, спирты, и органические кислоты, которые образуются на всех стадиях процесса.

Основное количество работ по очистке широко распространенных муниципальных и промышленных сточных вод посвящено жидким отходам с невысоким содержанием загрязнений [3-5]. Среди них концентрированные стоки встречаются реже и связаны, как правило, с пищевой промышленностью. Сточные воды нефтехимических и нефтеперерабатывающих комплексов, кроме высокой концентрации органики, имеют в своем составе токсичные компоненты, что во многом затрудняет использование биологических методов очистки [6, 7]. Поэтому одно из научных направлений работ в этой области – это поиск альтернативных подходов, в первую

очередь физических и химических. Однако биологические методы отличаются рядом преимуществ, поэтому существенные усилия направлены в сторону совершенствования традиционных и вновь внедряемых биотехнологий, что и определило цель данной работы: охарактеризовать локальную биологическую предварительную очистку сточных вод производства стирола и окиси пропилена как пример предварительной обработки высококонцентрированных нефтехимических жидких отходов.

Идентификация микроорганизмов, населяющих природные или особенно искусственные экологические ниши, является одним из важнейших параметров для оценки состояния микробного сообщества и перспектив их научно обоснованного применения. В основе современной систематики прокариот лежит общепризнанный метод определения последовательности ДНК, кодирующей рибонуклеиновую кислоту в составе малой субъединицы рибосомы (16S рРНК). В связи с этим доминирующие штаммы из коллекции микроорганизмов, осуществляющих предварительную очистку химзагрязненных сточных вод, были идентифицированы с применением молекулярно-биологических методов [8, 9].

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служили сточные воды совместного производства СОП ОАО «НКНХ». Пробы отбирали при поступлении сточной воды в биореактор, в биореакторе и на выходе из него, доставляли на кафедру микробиологии Казанского федерального университета и хранили при 4°C. Анализ проводили в течение 24ч после доставки.

Для прямого микроскопического учета колоний и описания их морфологии пробы сточных вод предварительно гомогенизировали в стерильном физиологическом растворе (0.85 % NaCl). Учет проводили в разведениях от 10^{-3} до 10^{-6} по количеству колоний, выросших в чашках Петри при посеве исследуемых проб на агаризованные питательные среды (МПА, МПА+5 % NaCl, Кинга Б, Гаузе, Эшби, Сабуро и Чапека) и термостатировании при 28-30 °С в течение 4-5 суток [10].

Тип окраски по Граму и подвижность определяли для суточных культур. Выделенные микроорганизмы сообщества хранили традиционным способом под вазелиновым маслом при 4 °С [10].

Филогенетический анализ микроорганизмов, выделенных из сточной воды, проводили на основании нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S рНК, амплифицированных с использованием стандартных праймеров 16S-8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3') и 16S-1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT -3'). Праймеры были синтезированы и поставлены компанией Синтол (Россия, Москва) [8, 9].

Результаты и обсуждение

Эксперименты проводили после продолжительных выбросов на установку предочистки высоконагруженных по органике сточных вод производства СОП [11-15], при этом ХПК доходило до 80000 мг/л. За анализируемый период исследования значения ХПК снизились до 200 – 300 мг/л. Однако, даже при снижении сбросов микрофлора не восстанавливается по численности, вследствие чего имеет низкую активность очищения сточных вод.

Суспендированную и иммобилизованную микрофлору из биореактора установки предварительной биоочистки сточных вод производства СОП были анализированы. Результаты учета численности аэробных гетеротрофных микроорганизмов на МПА представлены в таблице 1.

Колонии, выросшие на агаровых средах, имеют очень маленькие размеры, что говорит о высокой степени угнетения. По данным литературы, вследствие химического стресса микробная клетка переходит в состояние микроклетки, то есть размер уменьшается и образуется соответственно микроколонию [2].

Таблица 1 – Численность микроорганизмов в биореакторе установки предварительной биоочистки сточных вод

Тип микрофлоры	Численность микроорганизмов, КОЕ/мл образца	
	24 ч культивирования	96 ч культивирования
Суспендированная микрофлора	0.74×10^5	0.23×10^6
Иммобилизованная микрофлора	1.68×10^5	1.7×10^6

Длительный химический стресс, переживаемый микрофлорой установки предварительной биоочистки сточных вод производства СОП, привел к замедлению роста и развитию клеток всех видов данного сообщества, что выражается в увеличении количества через 96 ч по сравнению с культивированием в течение 24 ч. Количество клеток находится в большем титре в реакторе, чем выявляется при культивировании на плотной питательной среде, но они только потенциально активны, так как не успевают развиваться и возобновлять свою численность из-за сильного угнетения.

Таблица 2 – Видовой состав микробного сообщества установки предочистки сточных вод

Тип микрофлоры	Доминирующие роды	Минорные роды
Суспендированная микрофлора	<i>Pseudomonas</i>	<i>Lysinibacillus</i>
Иммобилизованная микрофлора	<i>Pseudomonas</i>	<i>Lysinibacillus</i>

Положительную роль для возобновления микробной популяции будет играть наличие иммобилизующего материала. Клетка, иммобилизованная на носителе, проявляет большую устойчивость к действию различных токсичных соединений. Поверхность микробной клетки липофильна, поэтому понятно стремление бактерий осесть на носитель. За этот период исследования, что уже существует иммобилизующий материал, численность иммобилизованной микрофлоры на порядок выше, чем суспендированных микроорганизмов. До воздействия высоких концентраций токсических химических агентов в сообществе основное место занимали микроорганизмы из родов *Pseudomonas* и в меньшей степени *Lysinibacillus* [11].

Нами установлено, что наибольшую устойчивость к сбросам предприятия проявили микроорганизмы родов *Pseudomonas* и *Lysinibacillus*.

При наличии таких нагрузок на микрофлору установки БХО СОП просто необходимо наращивать специфическую биомассу в ферментерах или в колбах на качалке. Нам кажется неуместным использовать минеральную питательную среду, так как основной задачей в данном случае является ускорение скорости роста сообщества и, соответственно, наращивание наибольшей биомассы. Мы рекомендуем использовать богатые натуральные питательные среды, типа МПБ, но разбавлять их в 2 – 5 раз. Для развития в ферментерах специализированной микрофлоры следует добавлять в незначительных концентрациях характерные для данных стоков субстраты, промышленные гликоли, этанол, глицерин и др. Для предотвращения вымывания бактериальных клеток с иммобилизующего материала, надо дать возможность колонизировать его специфической микрофлорой в условиях пониженного ХПК, а в дальнейшем проводить мониторинг за прикрепленной частью сообщества, и, в случае не-

обходимости, пополнять ее из наращенной вне установки предочистки сточных вод биомассы.

Закключение

Обобщение результатов химико-токсикологического мониторинга в сопоставлении с параметрами биохимической активности микробного сообщества свидетельствуют о необходимости разделения компонентов сточных вод с точки зрения их биодоступности и токсичности.

Осознание необходимости понимания внутренней сути сложных биологических процессов, на которых базируются современные биотехнологии переработки и обезвреживания отходов нефтехимической и химической отраслей, нашло отражение в том профиле фундаментальных и прикладных исследований, которые ведутся в последнее время в лабораториях фирм соответствующего профиля совместно с целым рядом университетов Европы, США, Австралии, Южной Америки, Канады, Китая и других стран.

Кроме заботы о сохранении водных ресурсов эти изыскания отражают тренды современной биотехнологии, в том числе обращение к новым подходам в изучении формирования микробных сообществ и их функционирования в экстремальных условиях очистных сооружений. Речь идет об использовании больших возможностей, которые дают сочетание традиционных методов исследования в микробиологии, биохимии, экологии с самыми современными достижениями молекулярной биологии и геномики. Уже имеются серьезные итоги такого смещения концептуальных основ, например:

- выявление новых, неизвестных ранее представителей микробного мира, которые служат основой для совершенствования экологических биотехнологий;

- создание микроорганизмов с уникальными свойствами деструкторов труднодоступных загрязнений, продуцентов новых лекарственных средств,

ферментов-катализаторов специфических химических реакций и т.д.

Литература

1. А.В. Артёмов, А.В. Брыкин, М.Н. Иванов, О.В. Шеляков, В.А. Шумаев, *Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева*, **52**, 4, 4-14 (2008);
2. А.Н. Илялетдинов, Р.М. Алиева, *Микробиология и биотехнология очистки промышленных сточных вод*. Алма-Ата: Гылым, 1990, С.17-23;
3. I. Oller, S. Malato, J.A. Sánchez-Pérez, *Science of the Total Environment*, **409**, 4141-4166 (2011);
4. G. Tchobanoglous, F. L. Burton, H. D. Stensel, *Wastewater engineering: treatment and reuse*. McGraw-Hill Science Engineering, New York, USA, 2003, С. 16-29;
5. X. Zhao, Y. Wang, Z. Ye, G.L.B. Alistair, J. Ni, *Process Biochemistry*, **41**, 1475-1483 (2006);
6. С.П. Зубрилов, *Охрана окружающей среды при эксплуатации судов*. Судостроение, Санкт Петербург, 1989, С. 99-101;
7. S. Wasi, S. Tabrez, M. Ahmad, *Water, Air, & Soil Pollution*, **220**, 1-4, 89-99 (2011);
8. S.R. Maloy, *Experimental techniques in bacterial genetics*. Jones and Bartlett learning, Sudbury, USA, 1989;
9. W.G. Weisburg, S.M. Barns, D.A. Pelletier, D.J. Lane, *Journal of Bacteriology*, **173**, 2, 697-703 (1991);
10. Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева, *Практикум по микробиологии*. Колос, Москва, 1993, 175 с;
11. L. Dao, T. Grigoryeva, L. Alexander, R. Devjatijarov, O. Ilinskaya, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.07.012> (2014);
12. Дао Линь Тхи Тху, Т. В. Григорьева, Р. М. Девятяров, Нго Куен Куи, О. И. Якушева, В. Н. Никонорова, О. Н. Ильинская, *Вестник КТУ*, **16**, 7, 158-160 (2013);
13. Дао Линь Тхи Тху, Нго Куен Куи, О.Н. Ильинская, *Вестник КТУ*, **17**, 1, 178-180 (2014);
14. Дао Линь Тхи Тху, Т. В. Григорьева, Нго Куен Куи, О. И. Якушева, В. Н. Никонорова, О. Н. Ильинская, *Вестник КТУ*, **16**, 10, 182-185 (2013);
15. Линь Дао Тхи Тху, Т.В. Григорьева, О.И. Якушева, В.Н. Никонорова, О.Н. Ильинская, *Ученые Записки Казанского университета*, **155**, 2, 138-146 (2013).

© Дао Линь Тхи Тху – асп. каф. микробиологии К(П)ФУ, linhdao.kpfu@gmail.com; Нго Куен Куи – асп. каф. технологии синтетического каучука КНИТУ, quyenkazan@gmail.com; О. Н. Ильинская – д-р биол. наук, проф., зав. каф. микробиологии К(П)ФУ, ilinskaya_kfu@mail.ru.

© Dao Thi Thuy Linh – PhD student, Department of Microbiology, Kazan (Volga Region) Federal University, linhdao.kpfu@gmail.com; Ngo Quy Quyen – PhD student, Department of Technology of synthetic rubber KNRTU, quyenkazan@gmail.com; O. N. Ilinskaya – Doctor Sci., Professor, Head of the Department of Microbiology, Kazan (Volga Region) Federal University, ilinskaya_kfu@mail.ru.