

З. О. Садыкова, А. С. Сироткин, Е. В. Перушкина

ИНТЕНСИФИКАЦИЯ ПРОЦЕССА БИОКАТАЛИТИЧЕСКОГО ОКИСЛЕНИЯ СОЕДИНЕНИЙ СЕРЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АДАПТИРОВАННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Ключевые слова: биокаталитическая очистка, сероокисляющие микроорганизмы, сернисто-щелочные сточные воды.

Исследованы процессы очистки модельного раствора сернисто-щелочной сточной воды накопительной культурой сероокисляющих микроорганизмов, иммобилизованных на поверхности гетерогенных катализаторов. Обнаружено, что внесение суспензии адаптированных микроорганизмов в биокаталитическую систему в начале процесса позволяет сократить продолжительность очистки в два раза.

Keywords: biocatalytic treatment, sulfur-oxidizing microorganisms, sulfural calinous wastewater.

The processes of cleaning solution model sulfural calinous wastewater enrichment culture of sulfur-oxidizing microorganisms immobilized on the surface of heterogeneous catalysts. It was found that the introduction of a suspension of adapted microorganisms in a biocatalyst system to the beginning of the process allows to reduce the duration of treatment is two-fold.

Введение

Вопросы предотвращения загрязнений окружающей среды с каждым годом приобретают все большую актуальность. На предприятиях нефтеперерабатывающей и нефтехимической промышленности одна из основных экологических проблем связана с необходимостью обезвреживания или утилизации сернисто-щелочных стоков (СШС). Такие стоки являются химически загрязненными и при сравнительно небольших объемах имеют высокие концентрации биотоксикантов [1], что делает невозможным непосредственное применение микроорганизмов для очистки СШС.

В промышленности получил распространение способ окисления СШС в жидкой фазе кислородом воздуха под давлением. В случае применения катализаторов скорость окисления возрастает, однако окисление гидросульфидов и сульфидов протекает через ряд последовательных реакций, основным продуктом окисления является тиосульфат. В целях обеспечения более глубокой конверсии и повышения эффективности процесса интерес представляет разработка способа обработки СШС, предварительного подвергнутых каталитическому окислению, культурой сероокисляющих микроорганизмов, иммобилизованных на поверхности гетерогенного катализатора процесса сероокисления. Известно [2], что иммобилизованные клетки долговечнее и значительно стабильнее суспендированных клеток, что обуславливает экономичность, эффективность и конкурентоспособность технологий, использующих иммобилизованные клетки. Применение накопительной культуры сероокисляющих микроорганизмов обусловлено, с одной стороны, большей устойчивостью смешанной культуры в промышленных условиях в сравнении с чистой культурой. С другой стороны, применение сероокисляющих микроорганизмов позволяет обеспечить активную поверхность катализатора в отличие от быстрого биообрастания поверхности в случае применения активного ила. На основании

анализа литературных данных было предположено, что процесс биоокисления иммобилизованной биомассой может быть интенсифицирован вследствие увеличения скорости диффузии кислорода внутрь клеток микроорганизмов с поверхности катализатора [3].

Экспериментальная часть

Объектом исследований являлся модельный раствор (МР) сернисто-щелочного стока СШС ОАО «Сибур - Нефтехим» после каталитического окисления с учетом разбавления в 20 раз (табл. 1).

Таблица 1 – Состав сернисто-щелочных стоков

№ п/п	Компонент стока	СШС	
		Окисленные катализатором	МР (с учетом разбавления ~ в 20 раз)
1	Массовая доля сульфида натрия, г/дм ³	0,6	~0,03
2	Массовая доля сульфита натрия, г/дм ³	7,9	~0,4
3	Массовая доля сульфата натрия, г/дм ³	12,6	~0,2
4	Массовая доля тиосульфата натрия, г/дм ³	46	~3,7
5	рН	12,4	~7,7

Для биоокисления соединений серы в составе модельного раствора использовалась ассоциация иммобилизованных сероокисляющих микроорганизмов, выделенная из биопленки, полученной в процессе длительной биофильтрации сточных вод производства нитроцеллюлозы (ФКП «ГосНИИХП») в лабораторных условиях [4].

В качестве носителей клеток микроорганизмов использовались два гетерогенных катализатора: КС-20, содержащий 20% масс. фталоцианина кобальта в полиэтиленовой матрице, а также Ni+ПП с никелем, диспергированным в поверхность полипропилена. Каждый из

катализаторов был выполнен в виде кубиков с размером грани 2×2 мм. В качестве объекта сравнения использовался инертный носитель – полиэтиленовые гранулы КАЗПЭЛЕН марки 15313-003 по ГОСТ 16337-77. Гранулы имели цилиндрическую форму 3×2 мм с небольшим углублением посередине.

Иммобилизация клеток сероокисляющих микроорганизмов проводилась в селективной стерильной питательной среде Бейеринка. Из расчета на 200 см³ питательной среды вносилась бактериальная суспензия сероокисляющих микроорганизмов ($84 \cdot 10^3$ КОЕ) в количестве 40 см³ (20 % об.). Объем носителя составил 10 см³. Продолжительность иммобилизации составляла 26 сут. Эффективность иммобилизации оценивалась по количеству микробного белка, определенного методом Брэдфорд [5].

На следующем этапе были проанализированы результаты процесса очистки МР СЦС иммобилизованными культурами сероокисляющих микроорганизмов. Для экспериментальных исследований были созданы следующие опытные системы (ОС):

ОС1 – гетерогенный катализатор (КС-20);

ОС2 – гетерогенный катализатор КС-20 + культура сероокисляющих микроорганизмов (биокаталитическая система БКС-20);

ОС3 – гетерогенный катализатор (Ni+ПП);

ОС4 – гетерогенный катализатор Ni+ПП + культура сероокисляющих микроорганизмов (BNi+ПП);

ОС5 – полиэтиленовые гранулы (ПЭ) + культура сероокисляющих микроорганизмов (БПЭ);

ОС6 – контрольная - МР СЦС, для анализа окисления соединений серы кислородом воздуха.

В опытных системах с микроорганизмами (ОС2, ОС4, ОС5) после проведения иммобилизации клеток осуществлялась замена питательной среды культивирования на МР СЦС в объеме 100 см³ (табл. 1). В системах с катализаторами ОС1 и ОС3 объем вносимого катализатора составлял 10 см³. В контрольную систему ОС6 вносился МР СЦС в объеме 100 см³. Периодическое культивирование сероокисляющих микроорганизмов осуществлялось на перемешивающем устройстве $n = 120$ об/мин при температуре $26 \pm 29^\circ\text{C} \pm 1$ в течение 9 суток, после чего проводилось повторное культивирование в течение 4 суток с МР СЦС того же состава (табл.1) с внесением суспензии микроорганизмов в ОС2 и ОС5 в количестве 20% об. (системы ОС3 и ОС4 не анализировались).

Результаты и их обсуждение

В процессе иммобилизации клеток сероокисляющих микроорганизмов на поверхности носителей было установлено, что микробные клетки интенсивно прикрепляются к поверхности катализаторов и полиэтиленовых гранул, так как поверхность носителей близка по свойствам. Средняя концентрация белка микробной биомассы по результатам отбора проб из объема питательной среды в системах с носителями КС-20, никелевый

катализатор, полиэтилен составляла 28,9; 31,1; 33,2 мг/дм³, соответственно.

Тиосульфат натрия является основным субстратом для выделенной культуры микроорганизмов. Максимальная эффективность окисления по субстрату составила 95,9% для биокаталитической системы с клетками, иммобилизованными на поверхности катализатора КС-20. При этом отмечено, что биоокисление субстрата в системе с инертным носителем происходит интенсивнее (эффективность составила 74,0%), чем в системе с никелевым катализатором (34,7%).

Кинетика изменения концентрации тиосульфат-ионов в процессе очистки МР СЦС представлена на рис. 1.

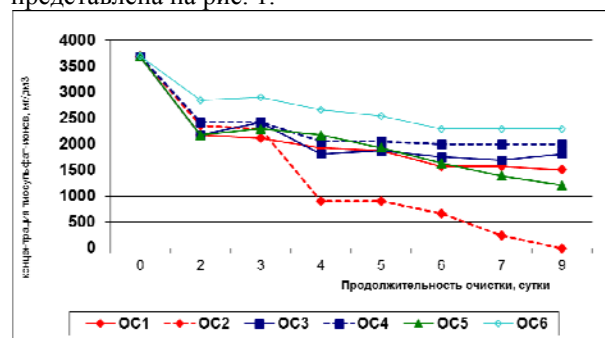


Рис. 1 – Изменение концентрации тиосульфат – ионов в процессе окисления МР СЦС

Эффективность химического окисления тиосульфатов в системах с гетерогенными катализаторами (ОС1, ОС3) приблизительно одинакова и составляет менее 60%, что связано с условиями проведения очистки. Следует отметить, что оптимальная температура каталитической реакции $60^\circ\text{C} - 90^\circ\text{C}$, перемешивание 1400 об/мин, подача кислорода 20 л/час, масса катализатора к объему реакционного раствора 5 г на 50 мл [6]. Создание таких условий в системах биологической очистки ограничивается, прежде всего, соблюдением температурного режима, оптимального для жизнедеятельности микроорганизмов ($23 \pm 33^\circ\text{C}$).

Отмечено, что в биокаталитической ОС4 эффективность окисления ниже, чем в системе с тем же катализатором ОС3, что, вероятно, связано с ингибированием ферментов прикрепленных клеток на поверхности катализатора никелем. При этом накопительная культура состоит преимущественно из сероокисляющих бактерий, которые являются медленно растущими, что приводит к незначительному уменьшению поверхности контакта фаз катализатора Ni+ПП и снижению его окислительной способности (менее 10%).

Далее отмечено, что микроорганизмы на поверхности инертного носителя в ОС5 проявляют значительную активность (рис. 1).

Наибольшее изменение концентрации тиосульфат-ионов на 9 сутки относительно их начального содержания составило 3690,5 мг/дм³ для ОС2.

Отмечено, что в первые трое суток каталитическая ОС1 (КС-20) и биокаталитическая система ОС2 (БКС-20) сопоставимы по снижению концентрации тиосульфат-ионов.

Конечным продуктом окисления серы является сульфат, результаты изменения концентрации сульфат-ионов в процессе окисления серосодержащих соединений МР СЦС представлены на рис. 2.

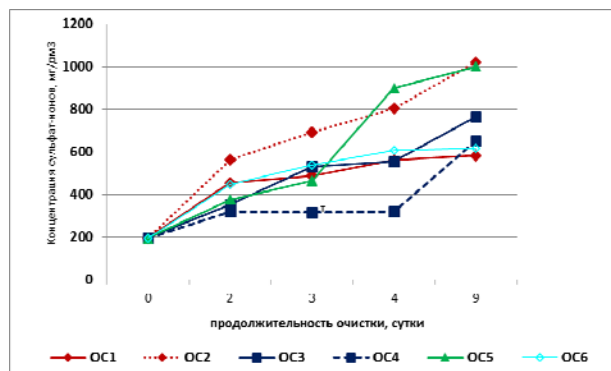


Рис. 2 – Изменение концентрации сульфат-ионов в процессе окисления МР СЦС

Показано, что эффективность химического окисления тиосульфат-ионов по результатам накопления продукта реакции в системах с гетерогенными катализаторами (ОС1, ОС3) составила ~70%, что сопоставимо с контрольной системой (ОС6).

В ОС4 эффективность окисления по накоплению продукта ниже, чем в системе с катализатором (ОС3), что подтверждает данные по окислению субстрата (рис. 1).

В общем, в системах с биопленкой (ОС2, ОС5) эффективность по продукту примерно на 10% выше, чем в контрольной системе, а также в каталитических системах.

В экспериментальных системах ОС2, ОС5 на внутренней поверхности колбы с накопительной культурой было отмечено вещество желтого цвета, нерастворимое в воде, предположительно, элементарная сера. Вероятно, невысокая эффективность окисления по накоплению продукта определяется особенностями биохимии превращений у сероокисляющих микроорганизмов. Серные бактерии, являющиеся ацидофильными, а также предпочитающими нейтральные значения pH, окисляют соединения серы различными путями. У некоторых ацидофильных видов (*Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidith. thiooxidans*) промежуточным продуктом окисления серы является тетратионат, тогда как у некоторых нейтрофилов (например, *Thiobacillus thioparus*) это может быть тиосульфат, который далее гидролизует до молекул S^0 и сульфита, также можно наблюдать быстрое внутриклеточное образование элементарной серы хемолитотрофами, использующими сероводород [7].

Таким образом, в результате проведенных исследований показано, что наиболее эффективной системой является биокаталитическая система с

использованием биопленки на поверхности полиэтиленовых гранул, включающих катализатор фталоцианина кобальта в количестве 20 % масс. (КС-20).

В биокаталитической системе с биопленкой на поверхности никелевого катализатора не было обнаружено положительного эффекта от их взаимодействия. Более того, показано, что в биокаталитической системе (ОС4) эффективность очистки по субстрату ниже, чем в случае с биопленкой на инертном носителе (ОС5), что указывает на токсическое воздействие катализатора на микроорганизмы.

Исходя из полученных данных, можно предположить, что взаимодействие биологической и каталитической составляющей обусловлено химической структурой катализатора. Некоторые тяжелые металлы (Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} и др.) могут действовать как сильные ферментные яды даже в незначительных концентрациях, как в виде солей, так и в форме органических соединений, связывая SH-группы и тем самым глубоко изменяя третичную и четвертичную структуру ферментных белков [8]. Однако, фталоцианиновая производная кобальта в катализаторе КС-20 показала себя как нетоксичная реакционно способная форма катализатора в отличие от никелевого катализатора.

Внесение суспензии микроорганизмов в биологическую и биокаталитическую системы при повторном культивировании биопленки было обусловлено необходимостью сокращения продолжительности очистки. Было предположено, что в среде не должно наблюдаться ингибирования суспендированных клеток, связанного с окислением неорганических сульфидов на поверхности катализатора, что позволит обеспечить взаимодействие биологической и каталитической составляющей с начала процесса.

Результаты изменения концентрации тиосульфат-ионов в процессе повторной очистки МР СЦС представлены на рис. 3.

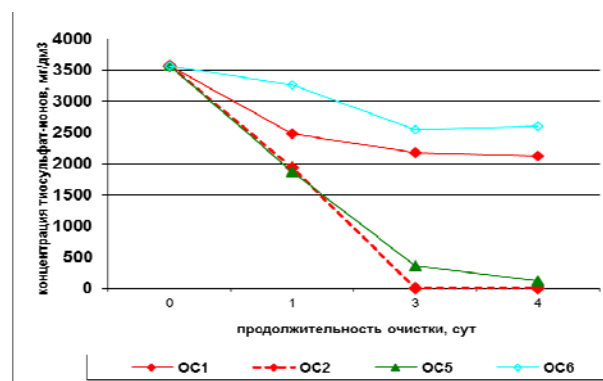


Рис. 3 – Изменение концентрации тиосульфат – ионов в процессе повторного окисления МР СЦС с внесением суспензии микроорганизмов

Исходя из полученных данных, на 3 сутки эксперимента наблюдается полное исчерпание основного субстрата для биокаталитической системы ОС2 (рис. 3). Накопительная культура

микроорганизмов, внесенная в ОС2 и ОС5 при повторном культивировании биопленки, представляет собой активную биомассу, адаптированную к составу стока. Следует отметить, что выделение накопительной культуры проводилось в питательной среде Бейеринка, дальнейшее культивирование (16 суток) – отъемно-доливным способом с внесением МР СЦС.

Согласно полученным результатам, эффективность очистки по продукту количественно сравнима с предыдущими данными очистки (рис.2), однако, позволяет сократить продолжительность процесса в два раза.

В табл. 2 представлен материальный баланс серы в МР СЦС в процессе его повторной очистки. Для составления баланса приняты следующие коэффициенты пересчета на элементарную серу: для тиосульфат-, полиитионат-иона – 0,57; для сульфат-иона – 0,33. Концентрация серы в сульфид-ионе в расчете принята пренебрежимо малой.

Таблица 2 – Материальный баланс серы

Начало эксп.	S/ S ₂ O ₃ ²⁻	S/ S ₄ O ₆ ²⁻	S/ SO ₄ ²⁻	Σ	Разница/ баланс
ОС1	2034,6	-	64,7	2099,3	-
ОС2	2034,6	-	64,7	2099,3	-
ОС5	2034,6	-	64,7	2099,3	-
ОС6	2034,6	-	64,7	2099,3	-
1 сутки эксперимента					
ОС1	1413,9	482,8	74,6	1971,3	128,0
ОС2	1103,5	655,2	106,3	1864,9	234,3
ОС5	1069,0	827,6	71,9	1968,6	130,7
ОС6	1862,2	310,4	95,7	2268,3	-168,9
3 сутки эксперимента					
ОС1	1241,5	517,3	168,9	1927,7	171,6
ОС2	-	275,9	409,2	685,1	1414,2
ОС5	206,9	310,4	310,9	828,1	1271,2
ОС6	1448,4	108,2	108,2	2073,9	25,4
4 сутки эксперимента					
ОС1	1241,5	655,2	201,9	2098,6	0,66
ОС2	-	482,8	442,2	924,9	1174,3
ОС5	68,9	379,3	343,9	792,2	1307,1
ОС6	1482,9	586,2	141,2	2210,3	-111,1

Погрешность/потери серы при проведении измерений принимаем не более ±150 мг. Таким образом, в ОС2 и ОС5 разница в балансе серы ~1000 мг, что может быть отнесено на образование элементарной серы микроорганизмами.

В процессе гидролиза клеток на поверхности носителей гидроокисью натрия (2Н NaOH) отмечен запах сероводорода. Можно

предположить, что произошла следующая реакция [9]:



Сульфид натрия Na₂S×9H₂O имеет запах сероводорода вследствие протекающей реакции замещения с участием диоксида углерода.

В ходе исследований отмечено максимальное накопление микроорганизмов на поверхности катализатора КС-20 по концентрации белка (350 мкг/см³), что говорит о высоком сродстве микроорганизмов к данному катализатору, обусловленном процессами превращения компонентов сточных вод химическим и биологическим путями. Накопление микроорганизмов в ОС2 более чем на 30 % было выше, чем для системы с биопленкой на инертном носителе ОС5. На поверхности никелевого катализатора микроорганизмы накапливаются на 48 % в меньшей степени в сравнении с ОС5 и почти на 75 % хуже, чем для ОС2.

Таким образом, внесение активной суспензионной культуры микроорганизмов обеспечивает высокий суммарный эффект взаимодействия биологической и каталитической составляющей с самого начала эксперимента, что позволяет сократить продолжительность процесса очистки.

Литература

1. Р.С. Соколов, *Химическая технология*. ВЛАДОС, Москва, 2000. 407 с.;
2. А.С. Сироткин, Г.И. Шагинурова, К.Г. Ипполитов, *Агрегация микроорганизмов: флоккулы, биопленки, микробные гранулы*. Казанский гос. технол. ун-т, Казань, 2006. 176 с.;
3. А.Ю. Кочетков, Н.А. Коваленко, Р.П. Кочеткова, И.А. Неверова, *Экология и промышленность России*, №12, 20-23 (2007);
4. А.С. Сироткин, И.У. Абитаева, Т.В. Лапшина, Т.В. Кирилина, Р.З. Агзамов. *Вестник Казанского технологического университета*, 6, 124-128 (2013);
5. Р. Досон, *Справочник биохимика*. Мир, Москва, 1991. 544 с.;
6. Р.М. Ахмадуллин, Буй Динь Нь, А.Г. Ахмадуллина, Я.Д. Самуилов. *Вестник Казанского технологического университета*, 15, 1, 50-54 (2012);
7. Е.В. Перушкина. Дисс. канд. техн. наук, Казанский гос. технологический университет, Казань, 2008, 120 с.
8. В.Т. Емцев, У.Н. Мишустин, *Микробиология: учебник для вузов*. Дрофа, Москва, 2005. 445 с.;
9. Н.Е. Кузьменко, В.В. Еремин, В.А. Попков. *Начала химии*. Экзамен, Москва, 2001. 720с.

© **З. О. Садыкова** – аспирант, кафедра промышленной биотехнологии КНИТУ, zilya-s85@mail.ru; **А. С. Сироткин** – д-р техн. наук, профессор, декан ФПТ, зав. кафедрой ПБТ КНИТУ, asirotkin@mail333.com; **Е. В. Перушкина** – канд. техн. наук, доцент кафедры промышленной биотехнологии КНИТУ, perushkina_elena@mail.ru.

© **Z. O. Sadykova** – graduate student, department of industrial biotechnology KNRTU, zilya-s85@mail.ru; **A. S. Sirotkin** – Doctor of technical sciences, professor, a head of the faculty of food technology and the chair of industrial biotechnology KNRTU, asirotkin@mail333.com; **E. V. Perushkina** – PhD in technical sciences, associate professor of the chair of industrial biotechnology KNRTU, perushkina_elena@mail.ru.