

DOI: 10.15593/2224-9400/2021.1.02

УДК 628.35, 579.63

Н.И. Кириллова¹, И.А. Дегтярева^{1, 2},
Т.В. Вдовина², А.С. Сироткин²

¹Татарский научно-исследовательский институт агрохимии
и почвоведения – обособленное структурное подразделение
ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

²Казанский национальный исследовательский
технологический университет, Казань, Россия

ИЗМЕНЕНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НИТРИФИЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ В ПРОЦЕССЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ

Приведены данные оценки изменения активности накопительных культур аммонийокисляющих (АОМ) и нитритокисляющих (НОМ) микроорганизмов, выделенных из активного ила городских очистных сооружений г. Зеленодольск Республики Татарстан. В процессе длительного хранения изучен метаболизм трех культур нитрифицирующих бактерий – НОМ К2, НОМ К1 и АОМ К2. Культура НОМ К2 обладает нитритокисляющей способностью. При культивировании в среде обнаружены продукты жизнедеятельности – нитраты, однако рассчитать метаболическую активность не представляется возможным из-за отсутствия снижения концентрации нитритов. У двух других культур после хранения методом субкультивирования (с регулярными пересевами) выявлена метаболическая активность. Так, у культуры НОМ К1 наблюдается уменьшение удельной скорости окисления субстрата в 2,8 раза относительно начального значения. При этом экономический коэффициент, отражающий количество образованного продукта из потребленного субстрата, возрастает в 1,4 раза. После хранения у НОМ К1 выявлен прирост биомассы на 14 сут периодического культивирования, который не отмечен у свежесыделенной культуры. Экономический коэффициент и удельная скорость окисления субстрата культурой АОМ К2 после длительного хранения выше, чем свежесыделенной культурой в среднем в 2,3 и 3,6 раза, соответственно, что позволяет рассматривать ее как культивируемую в лабораторных условиях и восприимчивую к субкультивированию. Итак, субкультивирование с регулярными пересевами на питательные среды является оптимальным методом хранения данных культур. Культуры АОМ К2 и НОМ К1 являются перспективными объектами для изучения процессов нитрификации и могут быть использованы в технологии биоаугментации в сооружения биологической очистки сточных вод.

Ключевые слова: очистка сточных вод, нитрификация, аммонийокисляющие бактерии, нитритокисляющие бактерии, метаболический коэффициент, удельная скорость окисления субстрата, субкультивирование.

N.I. Kirillova¹, I.A. Degtyareva^{1, 2},
T.V. Vdovina², A.S. Sirotkin²

¹Tatar Research Institute of Agrochemistry and Soil Science,
FRA Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences,
Kazan, Russian Federation

² Kazan National Research Technological University,
Kazan, Russian Federation

METABOLIC ACTIVITY CHANGE OF NITRIFYING BACTERIA DURING LONG-TERM STORAGE

The data of the assessment of changes in the activity of enrichment cultures of ammonia-oxidizing (AOM) and nitrite-oxidizing (NOM) microorganisms isolated from activated sludge of urban wastewater treatment plants in Zelenodolsk, Republic of Tatarstan. During long-term storage, the metabolism of three cultures of nitrifying bacteria HOM K2, HOM K1 and AOM K2 was studied. The NOM K2 culture has a nitrite oxidizing ability. During cultivation in the medium, waste products - nitrates were found; however, it is not possible to calculate the metabolic activity due to the absence of a decrease in the concentration of nitrites. Metabolic activity was revealed in two other cultures after storage by subculturing (with regular replantings). Thus, in the culture NOM K1, a decrease in the specific rate of substrate oxidation by 2,8 times relative to the initial value is observed. In this case, the economic coefficient, reflecting the amount of the product formed from the consumed substrate, increases 1,4 times. After storage, NOM K1 showed an increase in biomass on 14 days of periodic cultivation, which was not observed in a freshly isolated culture. The economic coefficient and specific rate of substrate oxidation by the AOM K2 culture after long-term storage are higher than that of the freshly isolated culture by an average of 2,3 and 3,6 times, respectively, which allows us to consider it as cultivated in laboratory conditions and susceptible to subculturing. Subculturing with regular subcultures on growing medium is the optimal method for storing these cultures. Cultures AOM K2 and NOM K1 are promising objects for studying nitrification processes and can be used in bioaugmentation technology in biological wastewater treatment plants.

Keywords: nitrification, wastewater treatment, ammonia-oxidizing bacteria, nitrite-oxidizing bacteria, metabolic quotient, specific substrate oxidation rate, subcultivation.

Основной задачей хранения культур микроорганизмов является поддержание их жизнеспособности, сохранение стабильности таксономически важных признаков и свойств. Проблема хранения микроорганизмов сводится к созданию условий, при которых происходит торможение процессов обмена веществ [1, 2]. При длительном хранении изменяются физиолого-биохимические свойства микроорганизмов, снижаются антибиотическая или ферментативная активности. В процессе хранения так же, как при культивировании бактерий в различных условиях, может происходить диссоциация, а именно

расщепление однородной популяции бактерий на варианты, различающиеся генетическими, физиолого-биохимическими и морфологическими свойствами [3–5].

Непременным условием является правильное поддержание микроорганизмов с целью сохранения не только жизнеспособности клеток, но и их таксономически важных свойств. Пока не существует общего метода, применяемого для хранения многочисленных и разнообразных групп микроорганизмов. В связи с этим в ведомственных коллекциях Российской Федерации микроорганизмы хранят, используя различные методы, чтобы исключить возможность потери, каждый штамм сохраняют несколькими способами [6–8].

Процесс нитрификации является главным в системе очистки городских стоков от соединений аммония, и от интенсивности этого процесса зависит качество очистки в целом. Поэтому главной задачей в технологии водоочистки является разработка способов интенсификации этого процесса. Благодаря способности утилизировать достаточно большое количество неорганических солей аммония, ассоциации нитрифицирующих микроорганизмов представляют интерес в технологии очистки сточных вод от соединений азота [9].

Для хранения этих бактерий используют разные методы: хранение под минеральным маслом, высушивание, лиофилизация. Благодаря воспроизводимости и простоте использования, в лабораторных условиях чаще всего используют метод субкультивирования для длительного хранения чистых культур *Nitrosomonas* и *Nitrobacter*. Культуры нитрифицирующих бактерий хранят на жидкой питательной среде Виноградского. Пересевы проводят большим количеством посевного материала и в многократных повторностях не реже чем один раз в 1–3 месяца. При пересевах часть культуры пропадает, однако активность оставшихся не уступает накопительным. Соблюдая регламенты пересевов, можно сохранить культуры в течение длительного времени [10–13].

Цель работы – оценка изменения активности культур нитрифицирующих бактерий после длительного хранения.

Объектами исследований служили накопительные культуры аммонийоксиляющих (АОМ) и нитритоксиляющих (НОМ) микроорганизмов, выделенные из активного ила городских очистных сооружений г. Зеленодольск Республики Татарстан (РТ).

Экспериментальные исследования. Экспериментальные исследования включали в себя выделение и периодическое культивирование

накопительных культур исследуемых бактерий до и после хранения, последующее определение их метаболической активности на основании изменения концентрации субстрата, продуктов метаболизма и числа колониеобразующих единиц (КОЕ), а именно определение экономического коэффициента и удельной скорости окисления субстрата.

Из активного ила очистных сооружений г. Зеленодольск РТ выделили четыре накопительные культуры нитрифицирующих микроорганизмов – две аммонийокисляющих (АОМ К1 и АОМ К2) и две нитритокисляющих (НОМ К1 и НОМ К2). Периодическое культивирование проводили в колбах Эрленмейера объемом 750 мл. В жидкую питательную среду С.Н. Виноградского [14] (для I и II фаз) объемом 150 мл инокулировали суспензии аммонийокисляющих и нитритокисляющих бактерий в количестве 20 мл (табл. 1). Инокулят готовили путем смыва колоний с чашек Петри 20 мл стерильного физиологического раствора.

Таблица 1

Состав питательных сред С.Н. Виноградского

Компонент	Масса, г	
	I фаза	II фаза
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,0	–
NaNO_2	–	1,0
K_2HPO_4	1,0	0,5
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	0,5
NaCl	2,0	0,5
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,05	0,4
Na_2CO_3	–	1,0
CaCO_3	5,0	–
Вода водопроводная (мл)	1000	1000

Инкубация проходила в течение 14 сут при 25 °С и постоянном перемешивании со скоростью 120 об./мин. Отбор проб для оценки метаболической активности (определение концентрации ионов аммония, нитрит- и нитрат-ионов) [15–17] осуществляли на 0, 5, 8, 10, 12 и 14 сут, а оценку количества биомассы – на 0 и 14 сут периодического культивирования. Метаболический коэффициент и удельную скорость окисления субстрата определяли по методике расчета процесса нитрификации [18, 19]. Выделенные культуры хранили, пересевая на питательные среды С.Н. Виноградского один раз в 2–2,5 месяца. Оценку метаболи-

ческой активности микроорганизмов после длительного хранения проводили повторно через 24 месяца после выделения культур. Культуры после хранения инокулировали в жидкие питательные среды С.Н. Виноградского и проводили культивирование в описанных выше условиях.

Результаты исследований. Расчеты метаболической активности выделенных культур нитрифицирующих бактерий представлены в табл. 2.

Таблица 2

Метаболическая активность культур аммонийокисляющих и нитритокисляющих микроорганизмов

Культура	Биомасса*, КОЕ/мл		Экономический коэффициент (образование продукта) $Y_{P/S}$, %		Удельная скорость окисления субстрата, мгN/(дм ³ ·сут·КОЕ)	
	до хранения	после хранения	до хранения	после хранения	до хранения	после хранения
АОМ К1	–	Культура утеряна	9,4	Культура утеряна	$9,45 \cdot 10^{-10}$	Культура утеряна
АОМ К2	$1,7 \cdot 10^7$	–	7,1	16,3	$6,3 \cdot 10^{-10}$	$2,27 \cdot 10^{-9}$
НОМ К1	–	$1,8 \cdot 10^8$	69,6	97,0	$4,14 \cdot 10^{-10}$	$1,50 \cdot 10^{-10}$
НОМ К2	–	–	–	–	–	–

* За 14 сут периодического культивирования.

Особенности длительного хранения заключаются в том, что культуры при пересевах теряются. Среди четырех изучаемых культур не удалось сохранить АОМ К1. Это характеризует ее как особо требовательную к условиям культивирования.

Рассчитать метаболическую активность культуры НОМ К2 не представляется возможным в связи с отсутствием снижения концентрации нитритов. Однако в среде обнаружены продукты жизнедеятельности нитритокисляющих бактерий – нитраты. Полученные результаты свидетельствуют о нитритокисляющей способности НОМ К2, но, вероятно, из-за особенностей культивирования и требовательности к условиям культивирования, культура не активна. Следовательно, после хранения методом субкультивирования (с регулярными пересевами) выявлена метаболическая активность только у двух культур – АОМ К2 и НОМ К1.

Удельная скорость окисления субстрата культурой АОМ К2 после длительного хранения выше, чем у свежевыделенной культуры

в 3,6 раза, а экономический коэффициент, отражающий количество образованного продукта из потребленного субстрата, увеличился в 2,3 раза. По-видимому, это связано с повышением чистоты данной культуры в процессе пересевов. Это позволяет рассматривать культуру как культивируемую в лабораторных условиях и восприимчивую к субкультивированию.

После длительного хранения культуры НОМ К1 наблюдается уменьшение удельной скорости окисления субстрата в среднем в 2,8 раза относительно начального значения. При этом экономический коэффициент возрастает в 1,4 раза, что может свидетельствовать об увеличении чистоты культуры НОМ К1 в процессе многократных пересевов. Кроме того, после хранения у нее выявлен прирост биомассы на 14 сут периодического культивирования, что не отмечено у свежесделанной культуры.

Таким образом, при изучении ассоциаций нитрифицирующих микроорганизмов активного ила водоочистных сооружений крупного города отмечено присутствие эффективных штаммов, ведущих процесс очистки сточных вод от соединений азота. Регулярные пересевы на питательные среды являются оптимальным методом хранения данных микроорганизмов. Культуры АОМ К2 и НОМ К1 перспективны для изучения процессов нитрификации и в дальнейшем могут быть использованы в технологии биоаугментации в сооружения биологической очистки сточных вод.

Список литературы

1. Похиленко В.Д., Баранов А.М., Детушев К.В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития // Изв. вузов. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2009. – № 4 (12). – С. 99–121.
2. Семенова Е.Н., Сироткин А.С. Процессы биотрансформации азота в технологиях очистки сточных вод // Вестник Казанского технологического университета. – 2008. – № 1. – С. 42–52.
3. Руководство к практическим занятиям по микробиологии: учеб. пособие / под ред. Н.С. Егорова. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Изд-во МГУ, 2010. – 224 с.
4. Рубан Е.Л. Физиология и биохимия нитрифицирующих микроорганизмов. – М.: Изд-во АН СССР, 1961. – 176 с.
5. Research on the cultivation of nitrifying bacteria and possibility of the biomass storage / M. Domanska, K. Hamal, M. Fraszczak, J. Lomotowski // Architecture, Civil Engineering, Environment. – 2016. – Vol. 9, № 1. – P. 113–118.

6. Интенсификация процессов нитрификации в биофильтрах с использованием технологии биоаугментации / Т.В. Вдовина, А.С. Дмитриев, А.А. Хасанова, Н.И. Кириллова, Й.В. Кобелева, А.С. Сироткин // Актуальная биотехнология. – 2019. – № 3 (30). – С. 550–551.

7. Вдовина Т.В., Шагеева А.Ф., Сироткин А.С. Интенсификация процесса нитрификации в биофильтрах с интродукцией микробных накопительных культур // Материалы международного конгресса. Биотехнология: состояние и перспективы развития. – М., 2019. – С. 590–592.

8. Abeliovich A. Nitrifying bacteria in wastewater treatment reservoirs // Applied and Environmental Microbiology. – 1987. – № 53 (4). – P. 754–760.

9. Николаев Ю.А., Грачев В.А., Михайлова Ю.В. Использование технологии биоаугментации для улучшения качества очистки сточных вод // Водоочистка. – 2016. – № 5–6. – С. 13–22.

10. Nitrosomonas preservation and reactivation for aquaria: Patent 5314542 USA / Edward J.C., Ronald D.J. – 1994. – Appl. № 103453.

11. Jiang Q.Q., Bakken L.R. Comparison of Nitrospira strains isolated from terrestrial environments // FEMS Microbiology Ecology. – 1999. – Vol. 8, № 30. – P. 171–186.

12. Stanley W.W. Taxonomic Considerations of the Family *Nitrobacteraceae* Buchanan // International journal of systematic bacteriology. – 1991. – Vol. 21, № 3. – P. 254–270.

13. The draft genome sequence of *Nitrospira lenta* strain BS10, a nitrite oxidizing bacterium isolated from activated sludge / D. Sakoula, B. Nowka, E. Spieck, H. Daims, S. Lücker // Standards in Genomic Sciences. – 2018. – Vol. 13. – P. 23–27.

14. Колешко О.И. Экология микроорганизмов почвы. Лабораторный практикум. – Минск: Высшая школа, 1981. – 175 с.

15. ПНД Ф 14.1:2.3.1–95. Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений массовой концентрации ионов аммония в природных и сточных водах фотометрическим методом с реактивом Несслера / ФБУ Федер. центр анализа и оценки техногенного воздействия. – М., 2017. – 22 с.

16. ПНД Ф 14.1:2.3–95. Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений массовой концентрации нитрит-ионов в природных и сточных водах фотометрическим методом с реактивом Грисса / ФБУ Федер. центр анализа и оценки техногенного воздействия. – М., 2011. – 16 с.

17. ПНД Ф 14.1:2.4.4–95. Количественный химический анализ вод. Методика измерений массовой концентрации нитрат-ионов в питьевых, поверхностных и сточных водах фотометрическим методом с салициловой кислотой / ФБУ Федер. центр анализа и оценки техногенного воздействия. – М., 2011. – 18 с.

18. Эпов А.Н., Данилович Д.А., Канунникова М.А. Анализ методик расчета процесса нитри-денитрификации, применяемых в мировой практике, и их развития (1-я часть) // Водоочистка. Водоподготовка. Водоснабжение. – 2018. – № 3. – С. 22–35.

15. Stephen T., Wang X.-H., Tay J.H. Bioaugmentation and enhanced formation of microbial granules used in aerobic wastewater treatment // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2006. – Vol. 70, № 3. – P. 374–381.

References

1. Pokhilenko V.D., Baranov A.M., Detushev K.V. Metody dlitel'nogo khraneniia kollektсионnykh kul'tur mikroorganizmov i tendentsii razvitiia [Methods of long-term storage of collection cultures of microorganisms and development trends]. *Izvestiya VUZov. Volga region. Medical sciences*, 2009, no. 4 (12), pp. 99–121.

2. Semenova E.N., Sirotkin A.S. Protsessy biotransformatsii azota v tekhnologiiakh ochistki stochnykh vod [Processes of nitrogen biotransformation in wastewater treatment technologies]. *Bulletin of Kazan Technological University*, 2008, no. 1, pp. 42–52.

3. Rukovodstvo k prakticheskim zaniatiiam po mikrobiologii [Guide to practical training in microbiology]. 3rd ed. Ed. N.S. Egorova. Moscow, Publishing house of Moscow State University, 2010, 224 p.

4. Ruban E.L. Fiziologiya i biokhimiia nitrifitsiruiushchikh mikroorganizmov [Physiology and biochemistry of nitrifying microorganisms]. Moscow, Publishing house of the USSR Academy of Sciences, 1961, 176 p.

5. Domanska M., Hamal K., Fraszczak M., Lomotowski J. Research on the cultivation of nitrifying bacteria and possibility of the biomass storage. *Architecture, Civil Engineering, Environment*, 2016, vol. 9, no. 1, pp. 113–118.

6. Vdovina T.V., Dmitriev A.S., Khasanova A.A., Kirillova N.I., Kobeleva J.V., Sirotkin A.S. Intensifikatsiia protsessov nitrifikatsii v biofil'trakh s ispol'zovaniem tekhnologii bioaugmentatsii [Intensification of nitrification processes in biofilters using bioaugmentation technology]. *Actual biotechnology*, 2019, no. 3 (30), pp. 550–551.

7. Vdovina T.V., Shageeva A.F., Sirotkin A.S. Intensifikatsiia protsessa nitrifikatsii v biofil'trakh s introduktsiei mikrobnnykh nakopitel'nykh kul'tur [Intensification of the nitrification process in biofilters with the introduction of microbial enrichment cultures]. *Materials of the international congress. Biotechnology: current state and development prospects*, Moscow, 2019, pp. 590–592.

8. Abeliovich A. Nitrifying bacteria in wastewater treatment reservoirs. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, no. 53 (4), pp. 754–760.

9. Nikolaev Yu.A., Grachev V.A., Mikhailova Yu.V. Ispol'zovanie tekhnologii bioaugmentatsii dlia uluchsheniia kachestva ochistki stochnykh vod [Use of bioaugmentation technology to improve the quality of waste water treatment]. *Water purification*, 2016, no. 5–6, pp. 13–22.

10. Edward J.C., Ronald D.J. Nitrosomonas preservation and reactivation for aquaria. Patent USA № 5314542. 1994. Appl. № 103453.

11. Jiang Q.Q., Bakken L.R. Comparison of Nitrospira strains isolated from terrestrial environments. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, vol. 8, no. 30, pp. 171–186.

12. Stanley W.W. Taxonomic Considerations of the Family *Nitrobacteraceae* Buchanan. *International journal of systematic bacteriology*, 1991, vol. 21, no. 3, pp. 254–270.

13. Sakoula D., Nowka B., Spieck E., Daims H., Lücker S. The draft genome sequence of *Nitrospira lenta* strain BS10, a nitrite oxidizing bacterium isolated from activated sludge. *Standards in Genomic Sciences*, 2018, vol. 13, pp. 23–27.

14. Koleshko O.I. *Ekologiya mikroorganizmov pochvy. Laboratornyi praktikum* [Ecology of soil microorganisms. Laboratory workshop]. Minsk, Higher School, 1981, 175 p.

15. FER 14.1:2.3.1–95. Quantitative chemical analysis of waters. Technique for measuring the mass concentration of ammonium ions in natural and waste waters by the photometric method with Nessler's reagent: approved. FBI Federal Center for Analysis and Assessment of Technogenic Impact. – M., 05.26.2017. – 22 p.

16. FER 14.1:2.3–95. Quantitative chemical analysis of waters. Methods for measuring the mass concentration of nitrite ions in natural and waste waters by the photometric method with the Griss reagent: approved. FBI Federal Center for Analysis and Assessment of Technogenic Impact. – M., 03.15.2011. – 16 p.

17. FER 14.1:2.4.4–95. Quantitative chemical analysis of waters. Methods for measuring the mass concentration of nitrate – ions in drinking, surface and waste waters by the photometric method with salicylic acid: approved. FBI Federal Center for Analysis and Assessment of Technogenic Impact. – M., 03.23.2011. – 18 p.

18. Epov A.N., Danilovich D.A., Kanunnikova M.A. Analiz metodik rascheta protsessa nitri-denitrifikatsii, primeniaemykh v mirovoi praktike, i ikh razvitiia [Analysis of methods for calculating the nitri-denitrification process used in world practice and their development]. *Vodoochistka. Vodopodgotovka. Vodonabzhenie*, 2018, no. 3, pp. 22–35.

19. Stephen T., Wang X.-H., Tay J.H. Bioaugmentation and enhanced formation of microbial granules used in aerobic wastewater treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, vol. 70, no. 3, pp. 374–381.

Получено 04.12.2020

Об авторах

Кириллова Надежда Игоревна (Казань, Россия) – младший научный сотрудник, Татарский НИИАХП – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН (420059, г. Казань, ул. Оренбургский тракт, 20а; e-mail: Nadyakirillova13@gmail.com).

Дегтярева Ирина Александровна (Казань, Россия) – доктор биологических наук, доцент, главный научный сотрудник, Татарский НИИАХП – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН (420059, г. Казань, ул. Оренбургский тракт, 20а; e-mail: pease-1963@mail.ru).

Вдовина Татьяна Владимировна (Казань, Россия) – кандидат технических наук, доцент кафедры промышленной биотехнологии, Казанский национальный исследовательский технологический университет (420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, 68; e-mail: tvkirilina@gmail.com).

Сироткин Александр Семенович (Казань, Россия) – доктор технических наук, профессор кафедры промышленной биотехнологии, Казанский национальный исследовательский технологический университет (420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, 68; e-mail: asirotkin66@gmail.com).

About the authors

Nadezhda I. Kirillova (Kazan, Russian Federation) – Junior Researcher, FRC KazSC of RAS (20a, Orenburg tract, Kazan, 420059; e-mail: Nadyakirillova13@gmail.com).

Irina A. Degtyareva (Kazan, Russian Federation) – Doctor of Biological Sciences, Associate Professor, Chief Researcher Officer, FRC KazSC of RAS (20a, Orenburg tract, Kazan, 420059; e-mail: peace-1963@mail.ru).

Tatyana V. Vdovina (Kazan, Russian Federation) – Ph.D. in Technical Sciences, Associate Professor of the Department of Industrial Biotechnology, Kazan National Research Technological University (68, Karl Marx str., Kazan, 420015; e-mail: tvkirilina@gmail.com).

Alexandr S. Sirotkin (Kazan, Russian Federation) – Doctor of Technical Sciences, Professor of the Department of Industrial Biotechnology, Kazan National Research Technological University (68, Karl Marx str., Kazan, 420015; e-mail: asirotkin66@gmail.com).