

УДК 628.356+574.64

**А. В. Игнатенко**

Белорусский государственный технологический университет

**ОПТИКО-РЕДУКТАЗНЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ  
СОСТОЯНИЯ АКТИВНОГО ИЛА И АНАЛИЗ ВЛИЯЮЩИХ ФАКТОРОВ**

В работе рассмотрена проблема контроля биохимической активности микроорганизмов активного ила при очистке городских сточных вод, загрязненных ингибирующими и токсичными веществами. Анализ биохимического потребления кислорода (БПК) для оценки состояния ила является длительной и трудоемкой процедурой, результаты которой становятся известны по завершении процесса очистки сточных вод. Эффективной альтернативой методов БПК может быть оптико-редуктазная проба (ОРП), основанная на суммарной активности ферментов-дегидрогеназ клеток, чувствительных к присутствию ингибирующих и токсичных веществ в сточных водах. Метод ОРП устраняет субъективность контроля редуктазной активности ила и снижает длительность анализа до 10–15 мин. В работе на примере ОРП с метиленовым синим (МС) изучено влияние процессов седиментации частиц, сорбции красителя и светорассеивания среды на показания ОРП. Показано, что все воздействующие факторы, как и обесцвечивание красителя, снижают оптическую плотность среды, что ведет к завышению редуктазной активности клеток. Наибольшее влияние на скорость изменения оптической плотности в системе ил – краситель оказывают процессы седиментации крупных частиц и сорбции красителя. Для устранения их влияния на показания ОРП рекомендовано проводить измерение редуктазной активности клеток после завершения основных стадий осаждения частиц и процессов сорбции красителя в течение 10 мин. Остаточное влияние указанных факторов и светорассеивания на скорость обесцвечивания МС в анаэробных условиях становится незначительным и ими можно пренебречь.

**Ключевые слова:** активный ил, биохимическая активность, оптико-редуктазный метод, метиленовый синий, влияющие факторы, седиментация частиц, сорбция красителя, светорассеивание.

**Для цитирования:** Игнатенко А. В. Оптико-редуктазный метод оценки состояния активного ила и анализ влияющих факторов // Труды БГТУ. Сер. 2, Химические технологии, биотехнологии, геоэкология. 2023. № 1 (265). С. 71–79. DOI: 10.52065/2520-2669-2023-265-1-8.

**A. V. Ignatenko**

Belarusian State Technological University

**OPTICAL REDUCTASE METHOD FOR ESTIMATION AN ACTIVE SLUDGE  
CONDITION AND ANALYSES OF INFLUENCE FACTORS**

The paper considers the problem of controlling the biochemical activity of activated sludge microorganisms in the treatment of urban wastewater contaminated with inhibitory and toxic substances. The analysis of biochemical oxygen consumption (BOD) for estimation of sludge condition is a long and time-consuming procedure, the results of which become known upon completion of the wastewater treatment process. An effective alternative to BOD methods can be a reductase and optical reductase test (ORT) based on the total activity of enzymes-dehydrogenases of cells sensitive to the presence of inhibitory and toxic substances in wastewater. The ORT method eliminates the subjectivity of controlling the reductase activity of activated sludge and reduces the duration of the analysis to 10–15 minutes. The influence of particles sedimentation, dye sorption and the effects of light scattering on the readings of the ORT was studied using the ORT method with methylene blue (MB). It is shown that all the influencing factors, as well as the discoloration of the dye, lead to a decrease in the optical density of the medium and to an overestimation of cell reductase activity. The processes of sedimentation of large particles and sorption of the dye have the greatest influence on the rate of change in the optical density in the active sludge-dye system. To eliminate the influence of these factors and the light scattering of the medium on the ORT readings, it is recommended to measure the reductase activity of cells after the completion of the main stages of precipitation of large particles and dye sorption processes for 10 minutes. The residual effect of these factors on the rate of MB discoloration under anaerobic conditions becomes insignificant and they can be neglected.

**Keywords:** active sludge, biochemical activity, optical reductase test, methylene blue, influencing factors, sedimentation of particles, sorption of dye, light scattering.

**For citation:** Ignatenko A. V. Optical reductase method for estimation an active sludge condition and analyses of influence factors. *Proceedings of BSTU, issue 2, Chemical Engineering, Biotechnologies, Geoecology*, 2023, no. 1 (265), pp. 71–79. DOI: 10.52065/2520-2669-2023-265-1-8 (In Russian).

**Введение.** Быстрое и эффективное обнаружение ингибирующих и токсичных веществ в водных средах является одной из актуальных задач для охраны окружающей среды и работы очистных сооружений [1].

Присутствие ингибирующих и токсичных веществ в сточных водах приводит к инактивации активного ила, нарушению биотехнологических процессов водоочистки, ухудшению качества очищаемой воды и представляет угрозу безопасности окружающей среды и здоровью населения.

Активный ил (АИ) является хорошим биосорбентом, способным накапливать в больших количествах многие загрязняющие вещества. Он на 90–95% представлен клетками бактерий, которые выполняют основную работу по очистке сточных вод от загрязнителей.

Сложный химический состав смешанных сточных вод, содержащих легкоокисляемые биогенные вещества, биологически трудноокисляемые вещества (нефтепродукты, антибиотики, дезинфицирующие вещества и др.), неразлагающиеся синтетические органические соединения (ксенобиотики) и высокомолекулярные вещества (тяжелые металлы, полиароматические углеводороды и их галогенпроизводные и др.), а также недостаточная адаптация к ним микроорганизмов ведет к перегрузке ила балластными и токсичными веществами, не используемыми в метаболизме клеток. Это вызывает дезактивацию ила [2].

Контроль за активностью микроорганизмов АИ может проводиться по показателям БПК<sub>5</sub>, БПК<sub>20</sub>, но данные методы длительны и трудоемки, и результаты их становятся известны только после завершения очистки сточных вод [3].

Биотестирование на основе редуктазной пробы (РП) рассматривается как простой, быстрый и эффективный способ обнаружения опасных веществ в водных средах и контроля состояния АИ. Суммарная активность ферментов дегидрогеназ является показателем общей биоэнергетической активности ила и степени загрязненности сточных вод ингибирующими и токсичными веществами [4].

Биоэнергетика клеток на 95% связана с окислительно-восстановительными реакциями и работой дыхательной цепи переноса электронов, сопряженной с синтезом молекул аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ), являющихся универсальным молекулярным источником энергии в клетках.

Редуктазная проба основана на взаимодействии искусственных акцепторов электронов со свободными или связанными молекулами

NADH, FMN, NADFH, FAD и другими кофакторами дегидрогеназ клеток, что приводит к восстановлению окисленных форм редокс-красителей и изменению их цвета, наблюдаемого визуально.

Особенностью прокариотических микроорганизмов по сравнению с эукариотами является укороченная дыхательная цепь переноса электронов и ее расположение на бактоплазматической мембране клеток [5].

У бактерий первичными акцепторами протонов и электронов служат FAD- и FMN-зависимые дегидрогеназы, осуществляющие отрыв атомов водорода у субстратов. В случае FAD-дегидрогеназ процесс описывается как



Стандартный окислительно-восстановительный потенциал данной реакции характеризуется величиной  $E_{H(0)} = -0,29 \text{ В (pH 7)}$  [5].

Окисленная форма редокс-красителя (М) способна восстанавливаться до  $\text{MH}_2$  в присутствии  $\text{FADH}_2$ :



Одним из первых редокс-красителей, используемых для определения активности клеток АИ, был трифенилтетразолий хлористый (ТТХ) [6].

При восстановлении бесцветной окисленной формы ТТХ образуется формазан красного цвета, не растворимый в воде, но растворимый в этаноле, ацетоне, бензоле и других растворителях. По концентрации образующегося формазана, определяемого визуально или спектрофотометрически с помощью калибровочной зависимости, можно найти редуктазную активность клеток. Длительность анализа составляет 1,5–2,0 ч.

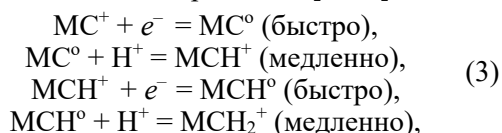
Недостатками метода являются субъективность визуального контроля, высокая трудоемкость анализа, а также необходимость построения калибровочной зависимости для количественного определения содержания формазана.

Применение других редокс-красителей позволило снизить трудоемкость и длительность анализа, а также использовать высокочувствительные электрохимические и оптические методы контроля редуктазной активности клеток.

Среди редокс-красителей выделяется метиленовый синий (МС). Он широко используется в биологии, медицине, фармакологии, нанотехнологиях для окрашивания и визуализации тканей, в качестве антисептика, препарата с фотодинамической, противовирусной активностью, а также в биоаналитике [7, 8].

В результате взаимодействия красителя с  $O_2$ , растворенным в воде, он находится в водной среде в форме катион-радикала  $MC^+$ , имеющего максимум полосы поглощения при 660 нм [9].

Восстановление  $MC^+$  зависит от pH среды. Вследствие последовательного переноса  $e^-$ ,  $H^+$  на  $MC^+$  он восстанавливается в бесцветную лейкоформу ( $MCH_2^+$ ) в соответствии с механизмом, предложенным А. Н. Терениным [9–12]:



где  $MC^0$  – незаряженная полувосстановленная форма;  $MCH^+$  – протонированная полувосстановленная форма;  $MCH^0$  – незаряженная восстановленная форма;  $MCH_2^+$  – заряженная восстановленная форма красителя.

Формы красителя  $MC^+$ ,  $MCH^+$  водорастворимы и окрашены в синий и зеленый цвет, тогда как лейкоформа  $MCH_2^+$  бесцветна. При взаимодействии с  $O_2$  она легко и обратимо окисляется в  $MC^+$ :



$MC^+$  не окрашивает живые клетки, но окрашивает неживые микроорганизмы. Живые клетки с редуцтанной активностью способны восстанавливать  $MC^+$  в лейкоформу. Это используется для оценки жизнеспособности клеток витальными красителями [7].

Механизм взаимодействия  $MC$  с дегидрогеназами клеток остается до конца не изученным. Длительное время считалось, что дегидрогеназы могут выбрасываться клетками в окружающую среду [13], как и гидролитические ферменты, однако оказалось, что часть из них прочно связана с мембранами клеток, а часть является внутриклеточными ферментами, попадающими в окружающую среду только при разрушении клеток. Неясно также, в какой форме  $MC$  проникает в клетки: как  $MC^+$  или  $MCH$ .

Несмотря на неясность механизма восстановления  $MC^+$  в лейкоформу живыми клетками, замечено, что восстановление красителя протекает тем быстрее, чем больше живых микроорганизмов в среде и выше их активность. Это нашло применение для экспресс-контроля высокой бактериальной обсемененности молока методом визуальной редуцтанной пробы (ВРП) [14], для оценки интегральной токсичности объектов окружающей среды [15]. В [16, 17] предложен метод MBRT и устройство для оценки скорости обесцвечивания  $MC$ , ростовой активности и гибели микроорганизмов.

Недостатками ВРП являются субъективность контроля конечной точки обесцвечивания красителя, а также высокая длительность анализа при концентрациях клеток менее  $10^5$  кл./мл.

Для ликвидации недостатков ВРП был предложен метод ОРП, основанный на измерении начальной скорости восстановления  $MC$ . Это позволяет устранить субъективность контроля результатов ВРП и сократить время анализа с 5 ч до 10 мин [18]. Показана также перспективность применения ОРП для оценки состояния активного ила и качества очистки сточных вод. Вместе с тем остались не изученными вопросы влияния седиментации ила, сорбции на нем  $MC$ , а также светорассеивания частиц на показания ОРП.

Для правильного применения метода ОРП при анализе состояния АИ необходимо оценить влияние указанных факторов на восстановление редукс-красителя  $MC$ .

**Основная часть.** Цель работы – оценка влияния воздействующих факторов среды на опико-редуктантный метод контроля редуцтанной активности микроорганизмов активного ила с красителем метиленовым синим.

В работе использовали избыточный активный ил Минской очистной станции-1, отобранный из илоприемника, метиленовый синий, ч.д.а. («Крезол», Россия).

О содержании микроорганизмов АИ судили по сухой биомассе клеток. Для ее определения ил центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 5 мин с помощью центрифуги Hettich модель ЕВА-2 (Hettich, Германия).

Осадок взвешивали, высушивали до постоянной массы при  $105^\circ C$  в термостате на протяжении 2 ч. Массу сырого и высушенного ила измеряли на цифровых весах Scout Pro (США) с погрешностью 0,01 г.

Измерение оптической плотности  $D$  образцов проводили с помощью спектрофотометра Specord M-40 (Германия).

За седиментацией частиц следили в кювете спектрофотометра методом фотоседиментации по изменению  $D$  светорассеивания ила на длинах волн 600–800 нм. Для устранения влияния накапливаемого осадка на показания спектрофотометра нижнюю часть рабочей и контрольной спектрофотометрических кювет заклеивали односантиметровой полоской непрозрачной ленты.

Скорость осаждения частиц определяли по седиментационной кривой путем численного дифференцирования:

$$V_{sed} = \frac{dD_{sed}}{dt} \quad (5)$$

с помощью программы Microsoft Excel.

Процессы сорбции  $MC$  изучали при температуре  $(20 \pm 1)^\circ C$ . Для этого в бюксы, содержащие по 10 мл растворов  $MC$  с  $C = 10^{-5} - 10^{-3}$  М, помещали по 0,1–0,5 г АИ, перемешивали на магнитной мешалке в течение 10, 30, 60 мин в аэробных

условиях. После завершения сорбции образцы центрифугировали при 10 000 об/мин на протяжении 5 мин, отбирали надосадочную жидкость и измеряли содержание в ней красителя на длине волны 660 нм ( $\epsilon = 37\,600 \text{ л}/(\text{моль} \cdot \text{см})$ ) [9]. Строили изотермы сорбции МС клетками активного ила в соответствии с уравнением мономолекулярной сорбции Ленгмюра [2]:

$$A = \frac{A_{\infty} \cdot K \cdot C}{K \cdot C + 1}, \quad (6)$$

где  $A = \Delta C \cdot V / m$  – величина удельной сорбции МС;  $\Delta C \cdot V$  – масса сорбированного красителя;  $m$  – масса сухого остатка АИ;  $A_{\infty}$  – максимальная величина удельной сорбции МС;  $K$  – константа связывания красителя активным илом;  $C$  – равновесная концентрация МС.

За восстановлением МС в методе ОРП следили по скорости ( $V$ ) изменения относительной оптической плотности красителя при температуре 20°C в анаэробных условиях:

$$V = \frac{d(D_t / D_0)}{dt}, \quad (7)$$

где  $D_0$ ,  $D_t$  – оптическая плотность окисленной формы МС соответственно в начальный и текущий момент времени в максимуме полосы поглощения красителя при 660 нм.

Полученные результаты обрабатывали статистически, используя программное обеспечение Microsoft Excel.

*1. Общая характеристика влияющих факторов на показания оптико-редуктазного метода.* Активный ил – водная среда с МС являются сложной гетерогенной системой, в которой восстановление красителя в методе ОРП протекает на фоне процессов седиментации частиц, сорбции на них МС, а также влияния на показания оптической плотности светорассеивания среды.

Измеряемая оптическая плотность  $D$  является результатом аддитивного действия влияющих факторов: сорбции красителя ( $D_s$ ), седиментации ( $D_{\text{sed}}$ ), светорассеивания ( $D_r$ ) частиц, поглощения света красителем ( $D_a$ ) – и может быть представлена в виде

$$D = D_s + D_{\text{sed}} + D_r + D_a. \quad (8)$$

Тогда скорость изменения оптической плотности среды в системе определяется величиной:

$$\frac{dD}{dt} = \frac{dD_s}{dt} + \frac{dD_{\text{sed}}}{dt} + \frac{dD_r}{dt} + \frac{dD_a}{dt}. \quad (9)$$

Основной процесс в методе ОРП связан с восстановлением МС активным илом, которое определяется членом  $dD_a / dt$ . Все остальные

факторы оказывают возмущающее воздействие и требуют устранения или учета их влияния на показания ОРП.

*2. Анализ восстановления метиленового синего в системе активный ил – среда.* На восстановление красителя МС в системе ил – среда оказывают влияние оба фактора системы. Активный ил может влиять на МС как косвенно за счет выброса редокс-веществ, изменения рН, окислительно-восстановительного потенциала среды, так и прямо за счет связывания и восстановления МС на поверхности клеток. Процессы окисления и восстановления МС могут протекать и в отсутствие ила, характеризуя свойства среды.

Для обратимых окислительно-восстановительных процессов с участием ионов  $H^+$  реакция вида



описывается уравнением Нернста [20]:

$$E_h = E_{h(o)} + \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \cdot \lg \frac{[\text{Ox}]^a}{[\text{Red}]^b} + \lg [H^+]^m. \quad (11)$$

Редокс-потенциал МС изменяется от +0,011 до +0,530 В при изменении рН среды от 7 до 0 [12].

Это позволяет определить соотношение окисленной и восстановленной форм красителя в зависимости от  $\Delta E_h$ , рН среды.

Для проверки влияния среды и АИ на показания ОРП ил с разным содержанием клеток центрифугировали 5 мин при 10 000 об/мин.

После этого аккуратно отбирали по 2,7 мл надосадочной жидкости, помещали в кювету спектрофотометра, добавляли по 0,3 мл МС и регистрировали кинетику восстановления МС в надосадочной жидкости в анаэробных условиях в течение 10 мин в отсутствие клеток ила (рис. 1, кривая 1).

К осадку ила после центрифугирования добавляли 2,7 мл 0,001%-ного раствора МС и измеряли скорость восстановления красителя клетками ила в анаэробных условиях. Полученные результаты приведены на рис. 1, кривые 2–4.

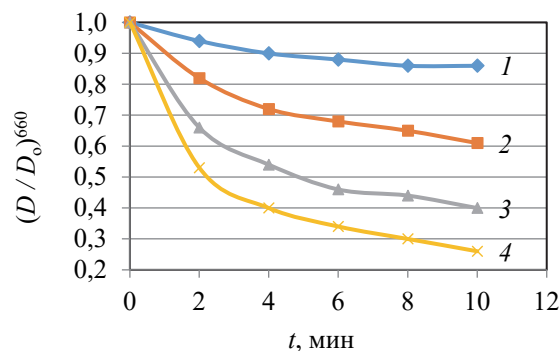


Рис. 1. Кинетика изменения  $(D / D_0)^{660}$  в водной суспензии АИ с МС: 1 – надосадочная жидкость; 2 – 0,2 г АИ; 3 – 0,4 г АИ; 4 – 0,5 г АИ

Из рис. 1 видно, что надосадочная жидкость способна восстанавливать МС, но изменение величины  $(D / D_0)^{660}$  почти на порядок ниже, чем при восстановлении красителя в присутствии АИ (0,5 г). Это свидетельствует о том, что в условиях высокой биомассы и активности клеток ОРП характеризует свойства ила и влияние среды на показания ОРП незначительно. При уменьшении биомассы ила с 0,5 до 0,2 г скорость восстановления МС линейно снижалась, что указывает на увеличение вклада среды на показания ОРП.

3. *Оценка влияния седиментации частиц на оптико-редуктазную пробу.* Для изучения влияния седиментации частиц на ОРП регистрировали изменение оптической плотности  $D^{660}$  в водной суспензии АИ в отсутствие МС. В этом случае  $D^{660}$  характеризует изменение светорассеивания среды в результате седиментации частиц АИ. Для этого к 2,5 мл водной среды pH 7 добавляли 0,5 мл АИ в отсутствие МС, перемешивали и записывали кинетику седиментации частиц в течение 10 мин. Полученные результаты приведены на рис. 2.

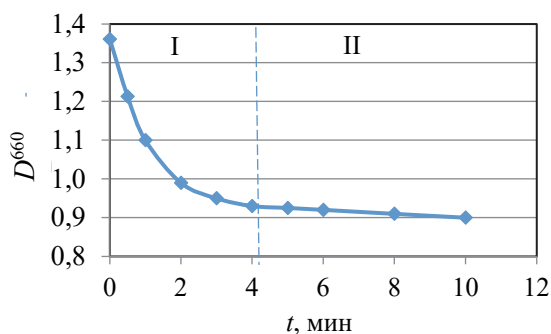


Рис. 2. Кинетика изменения  $D^{660}$  суспензии активного ила при его седиментации

Под действием силы гравитации и силы Архимеда дисперсные частицы АИ могут оседать, всплывать или плавать в дисперсной среде в зависимости от размеров, плотности частиц и водной среды [17]. Как видно из седиментационной кривой (рис. 2), наблюдаются две области изменения оптической плотности суспензии клеток: I – быстрая и II – медленная.

Область I быстрого изменения  $D^{660}$  связана с осаждением крупных частиц с размерами  $10^{-6}$ – $10^{-3}$  м и более, которые оказывают сильное влияние на оптическую плотность среды, маскируя все другие процессы. На I участке седиментационная зависимость может быть описана выражением

$$D_0 - D_t = (D_0 - D_r) \cdot \exp(-k_{1s} \cdot t). \quad (12)$$

Эта зависимость спрямляется в полулогарифмических координатах, что позволяет определить начальную константу скорости быстрой

стадии седиментации  $k_{1s}$ . Она составила величину  $k_{1s} = -0,230 \text{ мин}^{-1}$ .

Для устранения влияния быстрой стадии седиментации частиц АИ на  $D^{660}$  достаточно 3–5 мин. Процесс седиментации частиц при этом не заканчивается, а продолжается, и скорость седиментации частиц медленно снижается.

Медленная стадия II изменения  $D^{660}$  (рис. 2) связана с осаждением частиц с диаметром  $10^{-8}$ – $10^{-6}$  м. Они оказывают слабое влияние на изменение  $D^{660}$ . Во II области зависимость  $D^{660}$  от  $t$  носит линейный характер и описывается следующим выражением:

$$D_t = D_\infty + k_{2s} \cdot (t - t_\infty). \quad (13)$$

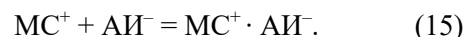
Используя два момента времени  $t_1$  и  $t_2$ , можно найти константу скорости седиментации  $k_{2s}$ :

$$k_{2s} = \frac{D_1 - D_2}{t_1 - t_2}. \quad (14)$$

Величина константы скорости седиментации частиц на II участке составила  $k_{2s} = -0,003 \text{ мин}^{-1}$ .

Для частиц с размерами менее  $5 \cdot 10^{-6}$  м возрастает влияние диффузии на процессы их движения и при размерах  $1 \cdot 10^{-6}$  м и менее устанавливается седиментационно-диффузионное равновесие в среде. При его достижении скорость осаждения частиц активного ила равна нулю и седиментация не оказывает влияния на изменение оптической плотности среды.

4. *Оценка влияния сорбции красителя на ОРП.* Молекула МС в окисленной форме несет положительный заряд и может химически необратимо связываться с отрицательно заряженными участками АИ за счет хемосорбции:



Для разъединения влияния процессов сорбции и восстановления красителя связывание МС проводили в аэробных условиях в открытых ячейках в течение 10, 30, 60 мин, в которых  $D^{660}$  красителя не изменяется, а восстановление МС осуществляли в анаэробных условиях, приводящих к обесцвечиванию красителя.

После этого образцы центрифугировали и определяли  $D^{660}$  в надосадочной жидкости. Величину сорбции красителя находили в соответствии с уравнением (6). Полученные результаты приведены на рис. 3.

Как видно из рис. 3, процесс сорбции метиленового синего на 95% завершается в течение 30 мин и на 75% – за 10 мин.

Начальная скорость сорбции красителя МС составила  $k_s = 0,250 \text{ мин}^{-1}$ .

5. *Оценка влияния светорассеивания частиц на ОРП.* Не осаждаемые растворы молекул и коллоидные суспензии с размерами частиц  $10^{-10}$ –

$10^{-8}$  м не оказывают влияния на изменение величины  $D^{660}$  через процессы седиментации частиц, но могут влиять на светорассеивание суспензии АИ, завышая измеряемый показатель  $D = D_a + D_r$ .

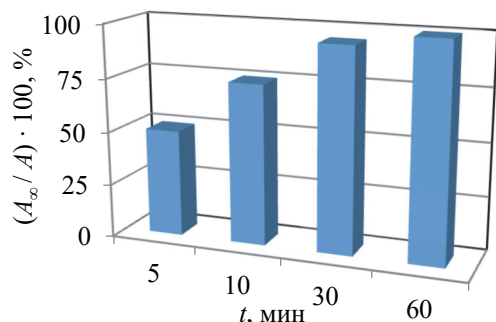


Рис. 3. Относительная сорбция МС активным илом в зависимости от времени связывания

Для учета влияния  $D_r$  на  $D_a$  использовали метод двух волн наблюдения в области 750–800 нм, в которой отсутствует поглощение МС, но отмечается светорассеивание частиц. Величина  $D_r$  связана с длиной волны ( $\lambda$ ) уравнением Геллера

$$D_r = \frac{\beta}{\lambda^n}, \quad (16)$$

где  $\beta$  и  $n$  – константы, причем в зависимости от формы и размеров частиц  $n$  может принимать значения от 0 до 4. Прологарифмировав выражение (16), получим

$$\lg D_r = \lg \beta - n \cdot \lg \lambda, \quad (17)$$

где  $\lg D_r$  – линейная функция от  $\lg \lambda$ . Экстраполировав ее к  $\lambda = 660$  нм, находим величину  $\lg D_r$  и значение  $D_r$ .

Истинную величину  $D_a^{660}$  определяли, вычитая из измеренной величины  $D^{660}$  значение  $D_r^{660}$ :

$$D_a^{660} = D^{660} - D_r^{660}. \quad (18)$$

Повторяя эту процедуру для нескольких промежуточных времени, нашли константу скорости изменения  $k_r = dD_r/dt = -0,005 \text{ мин}^{-1}$ .

Полученные результаты указывают на то, что в условиях незавершенности процессов седиментации частиц и сорбции красителя, вызывающих остаточные изменения светорассеивания среды, их влиянием на показания редуктазной активности клеток в системе АИ – МС через 10 мин отстаивания смеси и сорбции красителя можно пренебречь.

6. *Опτικο-редуктазный метод определения активности микроорганизмов АИ.* Для определения редуктазной активности ила в спектрофотометрические кюветы добавляли 2,5 мл буферного раствора рН 7, содержащего 0,001% МС, и

вносили 0,5 мл взвеси АИ 99%-ной влажности. Содержимое кюветы перемешивали и оставляли на 10 мин для завершения быстрой стадии седиментации частиц и сорбции красителя.

Далее кюветы закрывали крышками для обеспечения анаэробных условий измерений и регистрировали изменение оптической плотности суспензии  $D^{660}$  в течение 5–10 мин (рис. 4).

Как видно из рис. 4, изменение  $D^{660}$  суспензии клеток АИ с МС в аэробных (1) и анаэробных (2) условиях отличается.

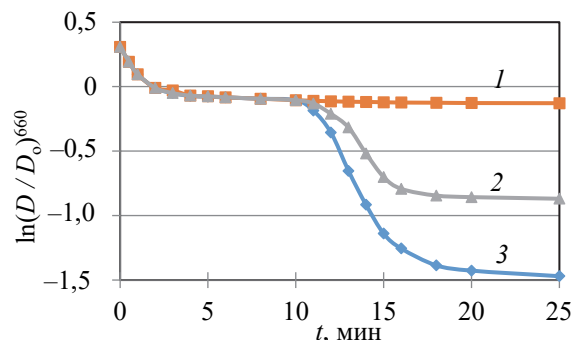


Рис. 4. Кинетика изменения оптической плотности в системе АИ – МС в полулогарифмических координатах  $\ln(D/D_0)^{660}$  от  $t$ :

1 – в присутствии  $O_2$ ; 2, 3 – в анаэробных условиях для малоактивного (2) и активного (3) ила

В условиях открытых ячеек и присутствия избытка  $O_2$  выражение (13) упрощается, так как величина  $dD_a/dt = 0$ . Процессы восстановления МС илом в аэробных условиях не наблюдаются (рис. 4, кривая 1), что указывает на то, что скорость окисления МС кислородом воздуха выше, чем скорость восстановления МС биомассой ила.

После закрытия кювет наблюдается короткий переходный период от аэробного к анаэробному режиму, в котором скорость восстановления МС увеличивается (рис. 4, кривая 2) до максимального значения.

На изменение  $(D/D_0)^{660}$  в системе основное влияние на начальных этапах оказывают седиментация частиц и сорбция красителя.

Оба воздействующих фактора обладают однонаправленным действием и снижают величину  $D^{660}$ , как и восстановление красителя МС.

По мере оседания крупных частиц АИ и сорбции красителя скорость изменения оптической плотности суспензии падает и через 10 мин достигает значений  $k_{sed} = -0,003 \text{ мин}^{-1}$ .

В анаэробном режиме обесцвечивание красителя носило экспоненциальный характер, что позволяет определить константу скорости восстановления МС в полулогарифмических координатах  $\ln(D/D_0)^{660}$  от  $t$ . Полученная величина для активного ила составила  $k_a = -0,261 \text{ мин}^{-1}$ , для менее активного ила  $k_{м.а} = -0,155 \text{ мин}^{-1}$ .

**Заключение.** Оценка состояния активного ила в процессе биологической очистки СВ является актуальной задачей экологической биотехнологии. Быстрое определение физиологической и биохимической активности ила позволяет оперативно управлять качеством очистки СВ, а также оценивать необходимость и длительность регенерации циркуляционного активного ила.

В работе предложен оптико-редуктазный метод контроля биохимической активности ила и изучено влияние на него таких физико-химических факторов, как седиментация, светорассеивание частиц, сорбция редокс-красителя метиленового синего.

В аэробных условиях стадии восстановления красителя не наблюдается. Это указывает на то, что скорость окисления МС кислородом превышает скорость его восстановления биомассой ила. В анаэробных условиях скорость восстановления МС зависит от активной биомассы ила.

Проведенный анализ влияния воздействующих факторов на изменение оптической плотности среды показал, что все они носят односторонний характер и снижают ее значение. Основной вклад в изменение  $D^{660}$  вносят быстрые стадии седиментации частиц и сорбции МС,

которые заканчиваются в течение 10 мин отстаивания ила. За это время процесс сорбции МС завершается на 75–80%.

После окончания быстрых стадий седиментации частиц и сорбции красителя скорость изменения оптической плотности суспензии, вызванной влиянием остаточного светорассеивания среды, была значительно ниже скорости обесцвечивания МС клетками АИ в анаэробных условиях. Это позволяет через 10 мин наблюдений пренебречь остаточным влиянием воздействующих факторов на регистрируемую величину  $D^{660}$  среды.

В анаэробных условиях в системе АИ – среда на восстановление красителя могут оказывать влияние как продукты жизнедеятельности клеток, так и сами микроорганизмы АИ, при этом определяющая роль принадлежит прямому восстановлению МС клетками АИ.

МС восстанавливается активным илом в зависимости от степени его загрязненности и активности. Полученные константы скорости обесцвечивания МС составили для активного ила  $k_a = (-0,261 \pm 0,017) \text{ мин}^{-1}$ , для менее активного ила  $k_{м. а} = (-0,155 \pm 0,014) \text{ мин}^{-1}$ . Это позволяет контролировать состояние активного ила по скорости обесцвечивания редокс-красителя в течение 10–15 мин.

### Список литературы

1. Кузнецов А. Е. Прикладная экобиотехнология: в 2 т. М.: БИНОМ: Лаборатория знаний, 2012. Т. 1. 629 с.; Т. 2. 485 с.
2. Игнатенко А. В. Анализ биологической очистки сточных вод и детоксикации активного ила очистных сооружений // Химическая безопасность. 2022. № 6 (1). С. 21–46. DOI: 10.25514/CHS.2022.1.21002.
3. Жмур Н. С. Технологические и биохимические процессы очистки сточных вод на сооружениях с аэротенками. М.: АКВАРОС, 2003. 512 с.
4. Lenhard G. Dehydrogenase activity as criterion on the determination of toxic effects on biological purification systems // Hydrobiologie. 1965. № 25 (1). P. 1–8.
5. Северин Е. С. Биохимия. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. 779 с.
6. Инструкция по лабораторному контролю очистных сооружений на животноводческих комплексах. Ч. 3: Анализ осадков и ила. Методические рекомендации по определению дегидрогеназной активности ила при технологическом контроле работы аэротенков. М.: Колос, 1984. 57 с.
7. Индикаторы: в 2 т. / под ред. Э. Бишопа. М.: Мир, 1976. Т. 2. 446 с.
8. Шелковский В. С. Использование окислительно-восстановительных и агрегационных свойств красителя метиленового синего в нанобиофизических исследованиях // Біофізичний Вісник. 2015. Вып. 33 (1). С. 5–29.
9. Теренин А. Н. Фотоника молекул красителей и родственных органических соединений. Л.: Наука, 1967. 616 с.
10. Ершова Ю. А., Хачатурян М. А., Слонская Т. К. Кинетическая модель ферментативного катализа окислительно-восстановительных реакций // Журнал физической химии. 2019. Т. 93, № 2. С. 195–198.
11. Влияние низкочастотных колебаний на процесс восстановления метиленового синего / А. Н. Морозов [и др.] // Вестник МГТУ им. Н. Э. Баумана. Сер. Естественные науки. 2022. № 1. С. 141–156.
12. Редокс-свойства метиленового голубого как перспективного фотометрического реагента для определения галогенных окислителей / Е. В. Наянова [и др.] // Аналитика и контроль. 2015. Т. 19, № 2. С. 154–160.
13. Теппер Е. З., Шильникова В. К., Переверзева Г. И. Практикум по микробиологии. М.: Колос, 1979. 216 с.

14. Оценка интегральной токсичности объектов окружающей среды методами биотестирования. Инструкция по применению / Н. В. Дудчик [и др.]. Минск: ГУ РНПЦ гигиены, 2012. 46 с.
15. Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа: ГОСТ 9225–84. М.: Стандартинформ, 2009. 15 с.
16. Quantification of metabolically active biomass using Methylene Blue dye Reduction Test (MBRT): Measurement of CFU in about 200 s. / P. Bapat [et al.] // *J. Microbiol. Methods*. 2006. Vol. 65, no. 1. P. 107–116.
17. Nandy S. K., Venkatesh K. V. Application of methylene blue dye reduction test (MBRT) to determine growth and death rates of microorganisms // *African. J. of Microbiol. Research*. 2010. Vol. 4, no. 1. P. 61–70.
18. Игнатенко А. В. Биотестирование токсичности водных сред методом редуктазной пробы // Труды БГТУ. Сер. 2, Химические технологии, биотехнологии, геоэкология. 2018. № 2 (211). С. 155–160.
19. Электрохимические методы анализа / А. Н. Козицина [и др.]. Екатеринбург: Урал. ун-т, 2017. 128 с.

### References

1. Kuznetsov A. E. *Prikladnaya ekobiotekhnologiya: v 2 t.* [Applied Environmental Biotechnology: in 2 vol.]. Moscow, BINOM, Laboratoriya znaniy Publ., 2012. Vol. 1. 629 p. Vol. 2. 485 p. (In Russian).
2. Ignatenko A. V. Analysis of waste waters toxicity and detoxication during their biological treatment. *Khimicheskaya bezopasnost'* [Chemical safety], 2022, no. 6 (1), pp. 21–46. DOI: 10.25514/CHS.2022.1.21002 (In Russian).
3. Zhmur N. S. *Tekhnologicheskiye i biokhimicheskiye protsessy ochistki stochnykh vod na sooruzheniyakh s aerotenkami* [Technological and biochemical processes of wastewater treatment in plants with aerotanks]. Moscow, AKVAROS Publ., 2003. 512 p. (In Russian).
4. Lenhard G. Dehydrogenase activity as criterion on the determination of toxic effects on biological purification systems. *Hydrobiologie*, 1965, no. 25 (1), pp. 1–8.
5. Severin E. S. *Biokhimiya* [Biochemistry]. Moscow, GEOTAR-MED Publ., 2004. 779 p. (In Russian).
6. *Instruktsiya po laboratornomu kontrolyu ochistnykh sooruzheniy na zhivotnovodcheskikh kompleksakh. Ch. 3: Analiz osadkov i ila. Metodicheskiye rekomendatsii po opredeleniyu degidrogenaznoy aktivnosti ila pri tekhnologicheskoy kontrole raboty aerotankov* [Instructions for laboratory control of sewage treatment plants at livestock complexes. Part 3: Analysis of sediments and sludge. Methodological recommendations for determining the dehydrogenation activity of sludge during the technological control of the operation of aerotanks]. Moscow, Kolos Publ., 1984. 57 p. (In Russian).
7. *Indikatoriy: v 2 t.* [Indicators: in 2 vol.]. Moscow, Mir Publ., 1976. Vol. 2. 446 p. (In Russian).
8. Shelkovskiy V. S. The use of redox and aggregation properties of the methyl-new blue dye in biophysical studies. *Biofizichnyy Visnik* [Biophysical Bulletin], 2015, issue 33 (1), pp. 5–29 (In Russian).
9. Terenin A. N. *Fotonika molekul krasiteley i rodstvennykh organicheskikh soedineniy* [Fotoniks of dye molecules and relative organic compounds]. Leningrad, Nauka Publ., 1967. 616 p. (In Russian).
10. Ershova Yu. A., Hachaturyan M. A., Slonskaya T. K. Kinetic model of enzymatic catalysis of redox reactions. *Zhurnal fizicheskoy khimii* [Journal of Physical Chemistry], 2019, vol. 93, no. 2, pp. 195–198 (In Russian).
11. Morozov A. N., Fadeev G. N., Bogatov N. A., Boldyrev V. S., Zadorozhnyy N. A. The influence of low-frequency oscillations on the methylene blue recovery process. *Vestnik MGTU im. N. E. Baumana*. [Bulletin of the Bauman Moscow State Technical University], Series Natural sciences, 2022, no. 1, pp. 141–156 (In Russian).
12. Nayanova E. V., Elipasheva G. M., Sergeev V. P., Sergeeva E. V. Redox properties of methylene blue as a promising photometric reagent for the determination of halogen oxidants. *Analitika i kontrol'* [Analytiks and control], 2015, vol. 19, no. 2, pp. 154–160 (In Russian).
13. Tepper E. Z., Shil'nikova V. K., Pereverzeva G. I. *Praktikum po mikrobiologii* [Microbiology manual]. Moscow, Kolos Publ., 1979. 216 p. (In Russian).
14. Dudchik N. V., Drozdova E. V., Treilib V. V., Budkina E. A., Buraya V. V., Kozlova T. O., Ushkova L. L. *Otsenka integral'noy toksichnosti ob'ektov okruzhayushchey sredy metodami biotestirovaniya. Instruktsiya po primeneniyu* [Assessment of integral toxicity of environmental objects by biotesting methods. Instructions for use]. Минск, ГУ РНПЦ гигиены Publ., 2012. 46 p. (In Russian).
15. GOST 9225–84. Milk and milk products. Methods of microbiological analyses. Moscow, Standartinform Publ., 2009. 15 p. (In Russian).
16. Bapat P., Nandy S. K., Wangikar P., Venkatesh K. V. Quantification of metabolically active biomass using Methylene Blue dye Reduction Test (MBRT): Measurement of CFU in about 200 s. *J. Microbiol. Methods*, 2006, vol. 65, no. 1, pp. 107–116.



17. Nandy S. K., Venkatesh K. V. Application of methylene blue dye reduction test (MBRT) to determine growth and death rates of microorganisms. *African. J. of Microbiol. Research*, 2010, vol. 4, no. 1, pp. 61–70.

18. Ignatenko A. V. Biotesting of water media toxicity by method of reductase probe. *Trudy BGTU* [Proceedings of BSTU], series 2, Chemical Technologies, Biotechnology, Geoecology, 2018, no. 2 (211), pp. 155–160 (In Russian).

19. Kozitsina A. N., Ivanova A. V., Glazyrina Yu. A., Gerasimova E. L., Svalova T. S., Malysheva N. N., Okhokhonin A. V. *Elektrokhimicheskiye metody analiza* [Electrochemical methods of analysis]. Ekaterinburg, Ural. universit Publ., 2017. 128 p. (In Russian).

#### **Информация об авторе**

**Игнатенко Аркадий Васильевич** – кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры биотехнологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: ignatenko\_av@tut.by

#### **Information about the author**

**Ignatenko Arkadiy Vasil'yevich** – PhD (Biology), Associate Professor, Assistant Professor, the Department of Biotechnology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ignatenko\_av@tut.by

*Поступила 26.10.2022*