

М. М. Чабан, Т. В. ГудзенкоОдеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, 65082, Україна,
e-mail: chaban.nik@onu.edu.ua**ВИЯВЛЕННЯ АНАМОКС БАКТЕРІЙ У СТИЧНИХ ВОДАХ ФАРМАЦЕВТИЧНОГО ВИРОБНИЦТВА**

Анамокс бактерії виявляються в системах очищення стічних вод, а також в інших екологічних нішах, де є анаеробні умови. **Мета.** Виявлення бактерій, відповідальних за АНАМОКС процес у зразках активного мулу та визначення їх таксономічної приналежності. **Методи.** Визначення концентрації амонію, нітриту та нітрату в отриманому зразку проводили з використанням хімічної реакції йонів на реактив Несслера, реактив Грісса та фенолсульфідокислоти [3]. Інтенсивність забарвлення визначали спектрофотометричним методом. Наявність АНАМОКС процесу визначали методом інкубації активного мулу з мінеральним живильним середовищем у анаеробних умовах. Наявність та родову приналежність анамокс бактерій визначали методом FISH з використанням специфічних мічених зондів: універсального *Tamra-Atx-0368*, а також *Fam-Atx-0820* і *Fam-Kst-1275*. **Результати.** В отриманій пробі визначена концентрація йонів амонію NH_4^+ 0,052 г/л і концентрація нітриту NO_2^- 0,024 г/л. Після інкубації активного мулу у живильному синтетичному середовищі, було встановлене зниження концентрації йонів амонію та нітриту у цьому середовищі. Проведення FISH реакції з використанням трьох мічених зондів: універсальний *Tamra-Atx-0368*, а також *Fam-Atx-0820* і *Fam-Kst-1275*, та подальша мікроскопія отриманого зразка дозволила встановити наявність колоній анамокс бактерій. **Висновки.** Зниження концентрації йонів амонію на 0,0395 г/л і йонів нітриту на 0,0179 г/л в синтетичному живильному середовищі в анаеробних умовах з виділенням газу свідчить про присутність мікроорганізмів відповідальних за АНАМОКС процес. Результати гібридизації свідчать про наявність в пробі мулу представників родів *Cap. Brocadia* і *Cap. Kueningenia*, яких на об'єм в 50 мкл було 8–10 одиниць мікроколоній та до 3–4 одиниць мікроколоній, представників *Kueningenia stuttgartiensis*.

Ключові слова: стічні води, анамокс бактерії, мул.

Прошло близько 20 років з моменту відкриття мікроорганізмів, які відповідають за АНАМОКС (ANAMMOX) *Anaerobic AMMonium OXidation* процес – анаеробне окиснення амонію з виділенням в навколишнє середовище газоподібного азоту (N_2) та нітрату [8]. З початку дослідження анаеробного окиснення амонію ці мікроорганізми виявляли в системах очищення стічних вод, а в подальшому почали знаходити їх в інших екологічних нішах, де є анаеробні умови [10, 6, 4]. На сьогоднішній день, завдяки молекулярно-ге-



нетичним дослідженням анамокс мікроорганізмів, вдалося виділити їх у п'ять родів, які були віднесені до нового створеного порядку *Candidatus Brocadiales* класу *Planctomycetia* [7, 12, 13]. Дослідження реакції анамокс бактерій до зміни різних фізичних факторів показало їх здатність адаптуватися до змін температури і рН [11, 2].

Метою роботи було проаналізувати зразок стічної води з фармацевтичного виробництва на наявність АНАМОКС процесу та можливу присутність анамокс бактерій, які відповідальні за цей процес.

Матеріали та методи

Матеріалом дослідження був зразок стічних вод і мул фармацевтичного виробництва. Проба зберігалася у при температурі + 3 °С, рН проби 7,6. Усі дослідження проводились у трьох повторях.

Хімічний аналіз концентрації йонів NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- у дослідній пробі. Для визначення концентрації йонів, які є ключовими для циклу Нітрогену (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-), пробу попередньо фільтрували за допомогою помпового насоса через фільтр з діаметром пор 0,3 мкм, розділяли пробу на три частини, в кожену частину вносили відповідний реактив до визначення конкретних йонів (реактив Несслера, реактив Грісса та фенолсульфідокислоту) [3]. Для визначення оптичної щільності використовували спектрофотометр Biorad Smart spec Plus з довжиною хвилі (λ) для реакції на амоній 425 нм та 530 нм для реакції на нітрит.

Для визначення наявності АНАМОКС процесу в отриманій пробі використовували живильне мінеральне середовище, де концентрація солі амонію і нітриту була на рівні отриманих даних хімічного аналізу дослідної проби. Склад живильного середовища (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,0514; NaNO_2 – 0,024; NaNO_3 – 0,010; KHCO_3 – 1,248; NaH_2PO_4 – 0,05; CaCl_2 – 0,3; MgSO_4 – 0,2; FeSO_4 – 0,006; EDTA – 0,006 [9]. Хімічну колбу 500 мл заповнювали 350 мл живильного мінерального середовища, і потім у неї завантажували 70 мл рідкого осаду мулу з проби та закривали пробкою з отвором для виведення газу. Далі отриману суспензію продували протягом 20 хвилин газом Ar / CO_2 (95% / 4,5%) для видалення розчиненого кисню та отримання анаеробних умов. Колбу поміщали в термостат при температурі 32 °С до появи в ній бульбашок газу [9, 1]. рН утримували на рівні 7,6, використовуючи 1М NaOH і 1% H_2SO_4 з підтриманням та відновленням анаеробних умов.

Для візуальної детекції наявності анамокс бактерій застосовували метод FISH мікроскопії з використанням специфічних мічених зондів [5] з деякими модифікаціями в методиці гібридизації мічених зондів (табл.). Зокрема, для збільшення якості гібридизації флуоресцентних зондів з клітинами-мішенями, використовували пробірки типу епендорф об'ємом 1,5 мл як мініатюрну закриту камеру з вологими умовами, необхідними для процесу гібридизації. Фіксацію клітин проводили в 2% параформальдегіді на льоду при + 3 °С протягом 2 годин. Промивання зразка здійснювали два рази відповідним буфером 15 хвилин при температурі 48 °С (табл.). Для проведення гібридизації використовували термостат для пробірок типу епендорф Віокот (Термо 48). Для аналізу результатів використовували флуоресцентний мікроскоп Zeiss з вико-



ристанням фотокамери Sony RX-100 IV для фіксації результатів.

Таблиця

Флуоресцентні зонди для FISH мікроскопії

Table

Fluorescent probe for FISH microscopy

Мічений зонд	Специфічність	Послідовність 5' – 3'	Formamid/ NaCl, mM
Tamra-Amx-0368	Усі анамокс бактерії	CCTTTCGGGCATTGCGAA	15/338
Fam-Amx-0820	<i>Can. Brocadia</i> і <i>Can. Kuenenia</i>	AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC	40/56
Fam-Kst-1275	<i>Kuenenia stuttgartiensis</i>	TCGGCTTTATAGGTTTCGCA	25/159

Результати досліджень та їх обговорення

В отриманій пробі з фармацевтичного виробництва концентрація йонів амонію NH_4^+ становила 0,052 г/л, а нітриту NO_2^- 0,024 г/л. У подальшому отримані значення концентрацій цих йонів були використані для приготування синтетичного живильного середовища для виявлення АНАМОКС процесу.

Використовували синтетичне живильне середовища з концентраціями солі амонію $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,052 г/л та нітриту (NaNO_2) 0,024 г/л, такими які були визначені у пробі. В процесі інкубації проби мулу в синтетичному середовищі на другу добу відзначалося виділення дрібних бульбашок газу біля часток мулу, а сам мул під дією бульбашок піднімався до поверхні рідини.

Після закінчення активного процесу виділення дрібних бульбашок газу (4–5 доба) живильне мінеральне середовище аналізували на залишкову концентрацію йонів амонію і нітриту. В результаті хімічного аналізу встановлено, що концентрація йонів амонію знизилася з $0,052 \pm 0,5$ г/л до $0,0125 \pm 0,7$ г/л, концентрація йонів нітриту – з $0,024 \pm 0,6$ г/л до $0,0061 \pm 0,75$ г/л. Зниження концентрації йонів амонію і нітриту в синтетичному живильному середовищі в анаеробних умовах з виділенням газу свідчить про присутність мікроорганізмів, відповідальних за АНАМОКС процес.

Для подальшого візуального дослідження бактерій, відповідальних за АНАМОКС процес, і підтвердження їх наявності проведена FISH реакція і мікроскопія отриманих зразків. Для аналізу використовували мул з основної ємності, для встановлення наявності бактерій, відповідальних за АНАМОКС процес. В реакції були використані три мічених зонди (табл.). Спочатку аналізували наявність всіх анамокс бактерій в пробі, використовуючи універсальний мічений зонд Tamra-Amx-0368. На рисунку 1 представлені результати гібридизації, де відмічено мікроколонії анамокс бактерій.

Для гібридизації використовували зразок об'ємом 50–60 мкл. Аналіз даного об'єму проби показав наявність незначної кількості мікроколоній анамокс бактерій. Загальна кількість мікроколоній на об'єм гібридизації складала 10–12 одиниць.



Далі пробу аналізували з використанням мічених зондів Fam-Amx-0820 і Fam-Kst-1275 (табл.). На рисунку 2 показано результати гібридизації з міченим зондом Amx-0820, а на рисунку 3 – з міченим зондом Kst-1275.

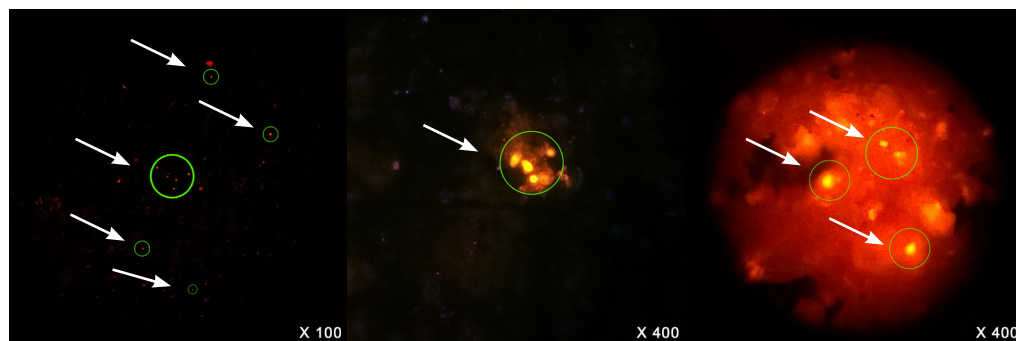


Рис. 1. Колонії анамокс мікроорганізмів при збільшенні в 100 і 400 разів: гібридизація зонду Amx-0368 з анамокс бактеріями

Fig. 1. Colonies of anammox microorganisms with increase of 100 and 400 times: hybridization of probe Amx-0368 with anammox bacteria

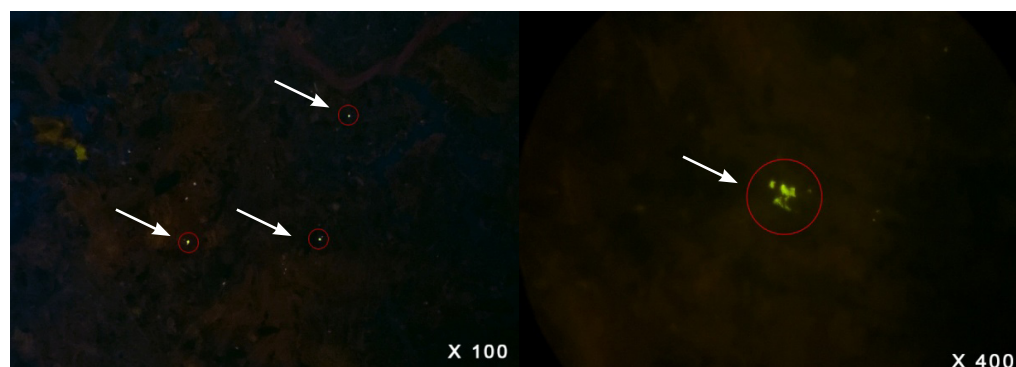


Рис. 2. Колонії анамокс бактерії при збільшенні в 100 і 400 разів: гібридизація зонду Amx-0820 з анамокс бактеріями

Fig. 2. Colonies of anammox bacteria with increase of 100 and 400 times: hybridization of probe Amx-0820 with anammox bacteria

Результати гібридизації, відображені на знімках, свідчать про наявність в пробі мулу та води представників родів *Can. Brocadia* і *Can. Kuenenia* (рис. 2) та представників *Kuenenia stuttgartiensis* (рис. 3). При візуальному дослідженні результатів гібридизації встановлено від 8 до 10 одиниць мікроколоній представників *Can. Brocadia* і *Can. Kuenenia*, та присутність їх у меншій кількості, від 3 до 4 одиниць мікроколоній, представників *Kuenenia stuttgartiensis* на об'єм зразку в 50 мкл.

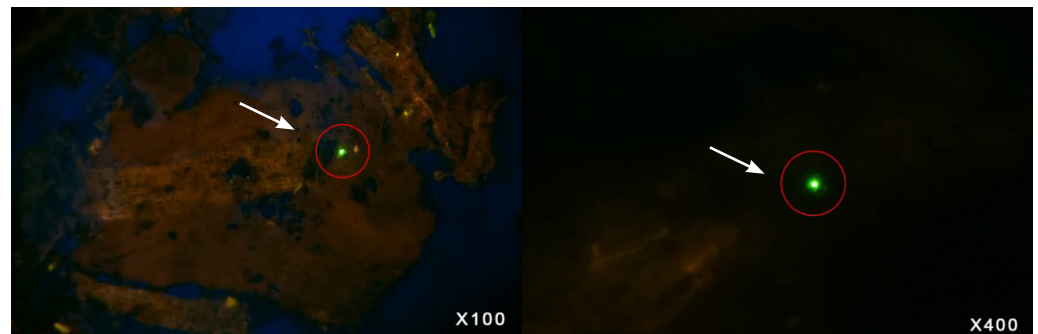


Рис. 3. Колонії анамокс бактерії при збільшенні в 100 і 400 разів: гібридизація зонду Kst-1275 з анамокс бактеріями

Fig. 3. Colonies of anammox bacteria with increase of 100 and 400 times: hybridization of probe Kst-1275 with anammox bacteria

У результаті досліджень було підтверджено наявність АНАМОКС процесу у мулі стічних вод фармацевтичного виробництва, та бактерій, які беруть у цьому участь. Також встановлено, що кількість мікроколоній представників *K. Stuttgartiensis* приблизно у два рази менша за кількість мікроколоній *Can. Brocadia* і *Can. Kuenenia* у проаналізованих полях зору. Представників родів *Can. Brocadia* і *Can. Kuenenia* на об'єм в 50 мкл було 8–10 одиниць мікроколоній. Представників *Kuenenia stuttgartiensis* в об'ємі 50 мкл було 3–4 одиниць мікроколоній. Що може свідчити про адаптації конкретних представників анамокс бактерій до певних умов у цих стічних водах.

Н. Н. Чабан, Т. В. Гудзенко

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, 65082, Украина,
e-mail: chaban.nik@onu.edu.ua

ОБНАРУЖЕНИЕ АНАМОКС БАКТЕРИЙ В СТОЧНЫХ ВОДАХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ

Реферат

Анаммокс бактерии обнаруживаются в системах очистки сточных вод, а также и в других экологических нишах, где есть анаэробные условия. **Цель.** В образцах активного ила установить присутствие бактерий, ответственных за АНАММОКС процесс, и их родовую принадлежность. **Методы.** Определение концентрации аммония, нитрита и нитрата в полученной пробе проводили с использованием химической реакции ионов на реактив Несслера, реактив Грисса и фенолсульфидокислоту [3]. Интенсивность окрашивания определяли спектрофотометрическим методом. Наличие АНАММОКС процесса определяли методом инкубации активного ила в питательной минеральной среде в анаэробных условиях. Наличие и родовую принадлежность анаммокс бактерий определяли методом FISH (fluorescence hybridization)



in situ) с использованием специфических меченых зондов: универсального Tamra-Amx-0368, а так же Fam-Amx-0820 и Fam-Kst-1275. **Результаты.** В полученной пробе определена концентрация ионов аммония NH_4^+ 0,052 г/л и концентрация нитрита NO_2^- 0,024 г/л. После инкубации активного ила в питательной минеральной среде, было установлено снижение концентрации ионов аммония и нитрита в этой среде. Проведение FISH реакции с использованием трёх меченых зондов: универсального Tamra-Amx-0368, а также Fam-Amx-0820 и Fam-Kst-1275 и последующая микроскопия полученного образца позволила установить наличие колоний анаммокс бактерий. **Выводы.** Снижение концентрации ионов аммония на 0,0395 г/л и ионов нитрита на 0,0179 г/л в синтетической питательной среде в анаэробных условиях с выделением газа свидетельствует о присутствии микроорганизмов ответственных за АНАММОКС процесс. Результаты гибридизации свидетельствуют о наличии в пробе ила представителей родов *Can.* *Brocadia* и *Can.* *Kuenenia*, которых на объём в 50 мкл было 8–10 единиц микроколоний и до 3–4 единиц микроколоний, представителей *Kuenenia stuttgartiensis*.

Ключевые слова: сточные воды, анаммокс бактерии, ил.

M. M. Chaban, T. V. Gudzenko

Odesa National I. I. Mechnykov University,
2, Dvorianska str., Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: chaban.nik@onu.edu.ua

ANAMMOX BACTERIA DETERMINATION IN THE PHARMACEUTICAL PRODUCTION WASTEWATER

Summary

Anammox bacteria are found in sewage treatment systems, as well as in the other ecological niches, where there are anaerobic conditions. The **aim** of the study was to establish the ANAMMOX bacteria (**A**naerobic **AM**monium **OX**idation) presence and their systematic affiliation in active sludge samples. **Methods.** The ammonium, nitrite and nitrate concentration determination in the samples was obtained using spectrophotometric reactions. The ANAMMOX process presence was determined by the active sludge incubation method with mineral nutrient medium under anaerobic conditions. The anammox bacteria presence and genus affiliation were determined by FISH (fluorescence hybridization *in situ*) technique using specific tagged primers: the universal Tamra-Amx-0368, and also Fam-Amx-0820 and Fam-Kst-1275. **Results.** For the anammox bacteria synthetic nutrient medium preparation there were determined the ammonium and nitrite ions concentration in the experimental test. The nutrient mineral medium was analyzed for the residual ammonium and nitrite ions concentration after cultivation. For further visual examination of the ANAMMOX bacteria, FISH reaction and the samples microscopy there were performed. Three tagged primers were used in the reaction: the universal Tamra-Amx-0368, and also Fam-Amx-0820 and Fam-Kst-1275. **Conclusions.** The decrease of the concentration of ammonium ions by 0,0395 g / l and ions nitrites at 0.0179 g / l in a synthetic nutrient medium in anaerobic conditions with gas release indicates the presence of microorganisms responsible for the ANAMMOX process. The hybridization results indicated *Can.*



Brocadia and Can. Kuenenia presence in the sludge and water sample, in the range of 8 to 10 microcolonial units per 50 µl, as well as Kuenenia stuttgartiensis, but in smaller number, 3 to 4, of microcolonial units.

Key words: wastewater, anammox bacteria, sludge.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гвоздяк П. І., Салура О. В. Простий метод виявлення та оцінки інтенсивності анаеробних процесів, що супроводжуються виділенням газів // Мікробіологія і біотехнологія. – 2009. – № 8. – С. 53–57.
2. Мальований А. М., Ятчишин Й. Й., Мальований М. С. Оцінка факторів, що впливають на специфічну активність процесу анамокс // Вісник Національного університету «Львівська політехніка». – 2010. – № 677. – С. 285–289.
3. Новиков Ю. В., Ласточкина К. О. Методы исследования качества воды водоёмов. – 2-е изд. – М.: Медицина, 1990. – 236 с.
4. Шандрович В. Т., Мальований М. С., Мальований А. М. Застосування АНАММОХ-процесу для очищення стічних вод від сполук азоту // Вісник Національного університету «Львівська політехніка». – 2014. – № 787. – С. 352–357.
5. Baeten J. E., Batstone D. J. Modelling anaerobic, aerobic and partial nitrification-anammox granular sludge reactors – A review. *Water Research*. 2018;(149):322–341.
6. Bagchi S. Metatranscriptomics reveals the molecular mechanism of large granule formation in granular anammox reactor. *Scientific Reports*. 2016;(6):28327, available at: <https://www.nature.com/articles/srep28327>
7. Chen H., Jin R. Summary of the preservation techniques and the evolution of the anammox bacteria characteristics during preservation. *Appl. Microbiol Biotechnol*. 2017;101(11):4349–4362.
8. Kartal B. Anammox Biochemistry: a Tale of Heme c Proteins – A review. *Cell Press*. 2016;(41):998–1011 Doi: 10.1016/j.tibs.2016.08.015
9. Kocamemi B. A., Dityapak D. Anammox start-up strategies: the use of local mixed activated sludge seed versus Anammoxseed. *Water Science & Technology*. 2018;78(9):1901–1915.
10. Sonthiphand P. Biogeography of anaerobic ammonia oxidizing (anammox) bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 2014;(5):399. Doi: 10.3389/fmicb.2014.00399
11. Zhang Z., Liu S. Hot topics and application trends of the anammox biotechnology: a review by bibliometric analysis. *SpringerPlus*. 2014;(3):220. Doi: 10.1186/2193-1801-3-220
12. Zhang L., Okabe S. Rapid cultivation of free-living planktonic anammox cells. *Water Research*. 2017;(127):204–210.
13. Zhu G., Wang S. Resuscitation of anammox bacteria after >10,000 years of dormancy. *ISME journal*. 2018. doi: 10.1038/s41396-018-0316-5



References

1. Gvozdyak PI, Sapura OV. Simple method of detection and intensity estimation of anaerobic processes accompanied by gas release. *Microbiology and Biotechnology*. 2009;4(8):53–57 (In Ukrainian).
2. Malevannyj AM, Yatchyshyn JJ, Malevannyj MS. Estimation of factors influencing the specific activity of the anammox process. *Bulletin of the National University "Lviv Polytechnic"*. 2010;(677): 285 – 289 (In Ukrainian).
3. Novikov YV, Lastochkina CO. *Methods of water quality study of reservoirs*. Moscow: Medicine. 1990. 236 (In Russian).
4. Shandrovich VT, Malevannyj MS, Malevannyj AM. Application of the ANAMMOX process for purifying sewage from nitrogen compounds. *Bulletin of the National University "Lviv Polytechnic"*. 2014;(787): 352 – 357 (In Ukrainian).
5. Baeten JE., Batstone DJ. Modelling anaerobic, aerobic and partial nitrification-anammox granular sludge reactors – A review. *Water Research*. 2018;(149):322–341.
6. Bagchi S. Metatranscriptomics reveals the molecular mechanism of large granule formation in granular anammox reactor. *Scientific Reports*. 2016;(6):28327, available at: <https://www.nature.com/articles/srep28327>
7. Chen H., Jin R. Summary of the preservation techniques and the evolution of the anammox bacteria characteristics during preservation. *Appl. Microbiol Biotechnol*. 2017;101(11):4349–4362.
8. Kartal B. Anammox Biochemistry: a Tale of Heme c Proteins – A review. *Cell Press*. 2016;(41):998–1011 Doi: 10.1016/j.tibs.2016.08.015
9. Kocamemi BA., Dityapak D. Anammox start-up strategies: the use of local mixed activated sludge seed versus Anammoxseed. *Water Science & Technology*. 2018;78(9):1901–1915.
10. Sonthiphand P. Biogeography of anaerobic ammonia oxidizing (anammox) bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 2014;(5):399. Doi: 10.3389/fmicb.2014.00399
11. Zhang Z., Liu S. Hot topics and application trends of the anammox biotechnology: a review by bibliometric analysis. *SpringerPlus*. 2014;(3):220. Doi: 10.1186/2193-1801-3-220
12. Zhang L., Okabe S. Rapid cultivation of free-living planktonic anammox cells. *Water Research*. 2017;(127):204–210.
13. Zhu G., Wang S. Resuscitation of anammox bacteria after >10,000 years of dormancy. *ISME journal*. 2018. doi: 10.1038/s41396-018-0316-5

Стаття надійшла до редакції 28.01.2019 р.

