

Е. В. Стабникова, В. Н. Иванов, Н. Н. Грегирчак, А. Н. Дульгерв

Киев, технол. ин-т пищ. пром-сти;
Ин-т микробиологии и вирусологии АН Украины, Киев

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕЙСТОННЫХ ФОРМ БАЦИЛЛ ДЛЯ ОЧИСТКИ И ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЯ ВОДОЕМОВ*

*Показана возможность селекции нейстонных, т. е. концентрирующихся на поверхности раздела вода — атмосфера, бактериальных форм. Препарат на основе нейстонной формы *Bacillus megaterium* эффективнее при очистке поверхностных слоев воды от углеводородов нефти, чем препарат на основе планктонной формы той же культуры. Препарат на основе нейстонной формы аэробных спорообразующих бактерий эффективен при биологическом обезвреживании очищенных традиционными методами сточных вод.*

Применение нейстонных форм бактерий позволяет интенсифицировать микробиологические процессы в тонком (15—40 мкм) поверхностном слое водоемов.

Ключевые слова: нейстон, бактериальные препараты, очистка водоемов от нефтяных загрязнений, обеззараживание воды биологическими методами.

В природных водоемах на границе раздела вода—воздух наблюдается значительное концентрирование гидрофобных и поверхностно-активных веществ, а также бактерий. В этом поверхностном слое (пленке) формируется бактерионейстон, который активно участвует в деструкции органических загрязнений воды [3]. В поверхностной пленке наряду с бактерионейстоном существует патобактерионейстон, образующийся за счет концентрирования патогенных микроорганизмов, присутствующих в воде [10, 12]. Концентрация патогенных бактерий в поверхностной пленке может в 10—1000 раз превышать их содержание в нижележащих слоях воды [12].

Учитывая небольшую толщину поверхностной пленки (10—100 мкм), что обеспечивает небольшой расход микробных препаратов для стимуляции очистки водоемов, авторы высказали предположение о целесообразности разработки микробных препаратов на основе нейстонных форм бактерий, т. е. бактерий, способных концентрироваться в поверхностной пленке водоемов [9]. В настоящее время практически нет бактериальных препаратов, усиливающих процессы самоочищения водоемов на основе нейстонных форм микроорганизмов. Те нейстонные формы бактерий, которые являются антагонистами патогенной микрофлоры, вероятно, можно использовать для улучшения санитарно-гигиенических условий в природных водоемах, а также для локального обеззараживания сточных вод [9].

Нами показана возможность получения таких препаратов, в основе которого лежит адаптивная селекция нейстонных форм бактерии с повышенной гидрофобностью поверхности клеток [8].

Целью настоящей работы явилось исследование эффективности использования нейстонных форм бактериальных препаратов для очистки воды от углеводородов нефти, а также биологического обеззараживания очищенных традиционными методами сточных вод.

Материал и методы. Объектом исследования служили культуры *Bacillus megaterium* 1БД, *Pseudomonas putida* БС-2, *Alcaligenes paradoxus* БС-1 из коллекции микроорганизмов отдела технологии бисинтеза Института микробиологии и вирусологии АН Украины.

Бактерии выращивали в колбах на качалке (240 качаний в минуту) на среде следующего состава: KH_2PO_4 — 3 г/л, K_2HPO_4 — 7 г/л,

* Работа выполнена при поддержке Национального комитета по науке и технологиям (программа 2i12 «Захист ґрунтів від забруднення та розробка біотехнологічних основ їх оздоровлення», проекти 2.1.2.3, 2.1.2.8, 2Л.2.5 и программа 4.1.6 «Розробити наукові основи та створити нові біотехнологічні препарати та продукти», проект 4.1.6.28).

$MgSi_2$ — 0,1 г/л, NH_4NO_3 —1 г/л; источником углерода в среде был гексадекан — 0,5 об. %. При исследовании процесса очистки воды гексадекан заменяли сырой нефтью в количестве 0,1 об. % • Температура выращивания — 30 °С, рН — 7,0.

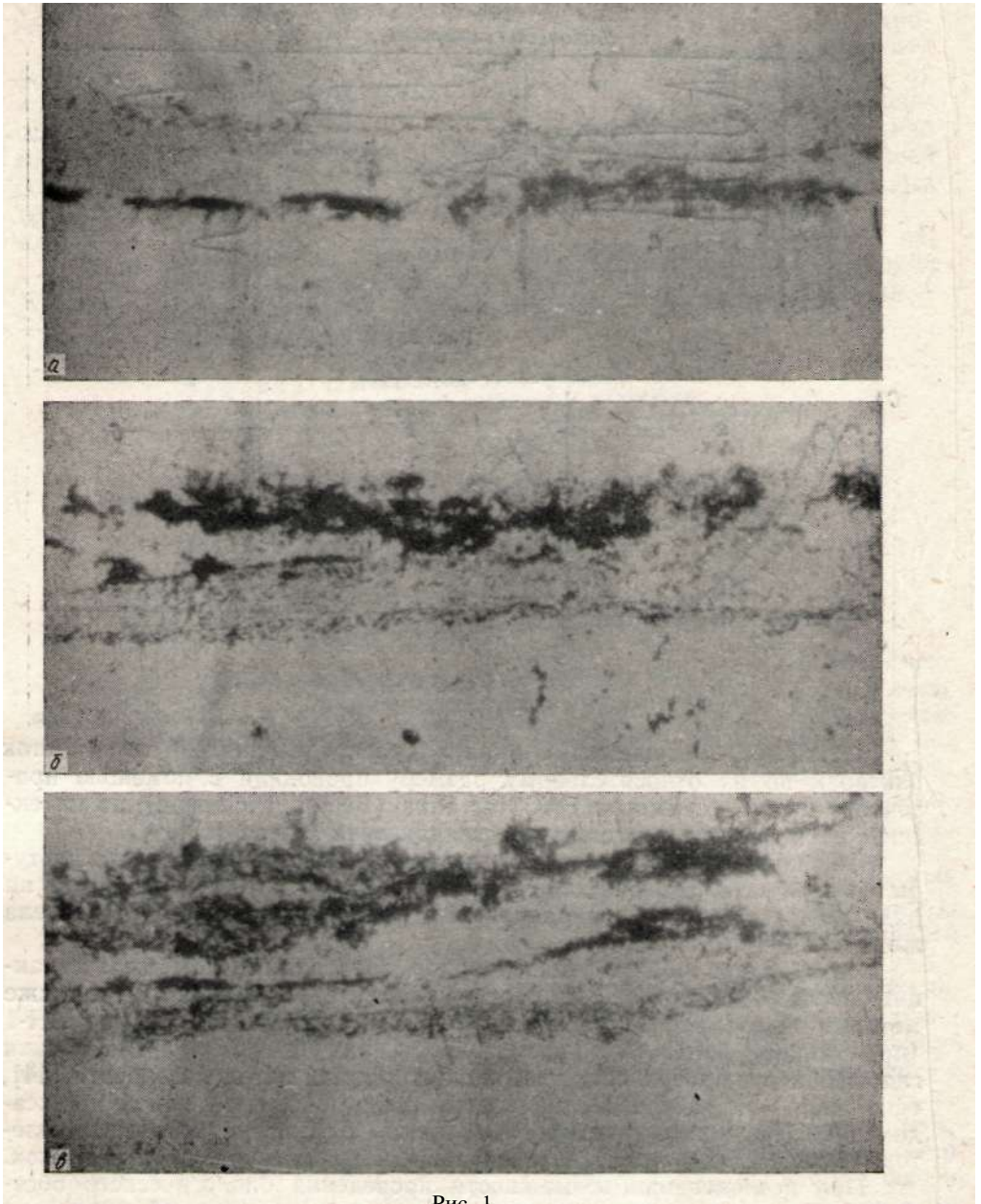


Рис. 1

После 18 ч роста клетки бацилл отделяли центрифугированием и вносили в количестве 1×10^5 клеток в цилиндр (диаметр 3,2 см) с 50 мл свежей питательной среды, в которую добавлено 4, 40 и 400 мкл гексадекана (содержание гексадекана 0,008, 0,08 и 0,8 об. %), что соответствовало расчетной толщине слоя гексадекана на поверхности среды соответственно 5, 50 и 500 мкм. Инкубацию бацилл проводили в стационарных условиях при температуре 30 °С в течение 24 ч. В цилиндре закрепляли предметные стекла. После выдерживания в течение 24 ч стекла промывали дистиллированной водой, высушивали и **окрашивали** препарат в течение 2 ч раствором эритрозина. Избыток красителя **смы-**

вали водой, а высушенные стекла обрабатывали в течение 10 мин фукусином Циля. Картину обрастания на стеклах наблюдали с помощью микроскопа «Люам-И2», фотографии были сделаны при фазовом контрасте, увеличение 70. По ширине полосы обрастания, образуемой на границе раздела жидкость — воздух, судили о толщине биопленки [4].

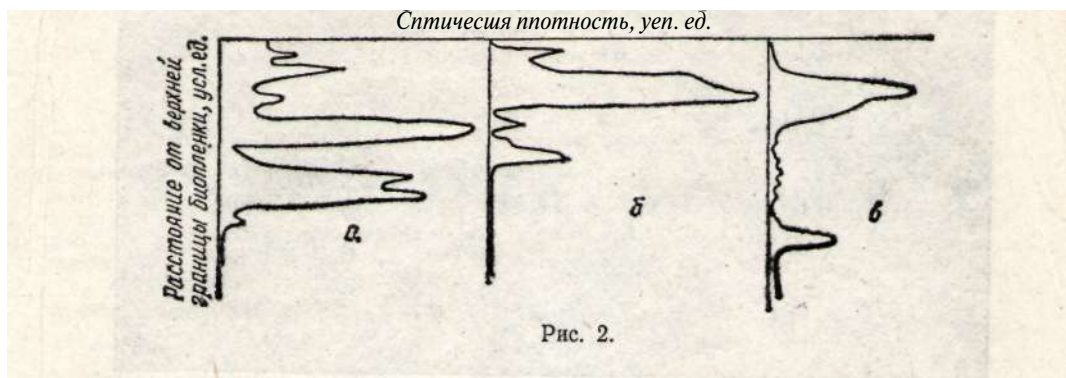


Рис. 2.

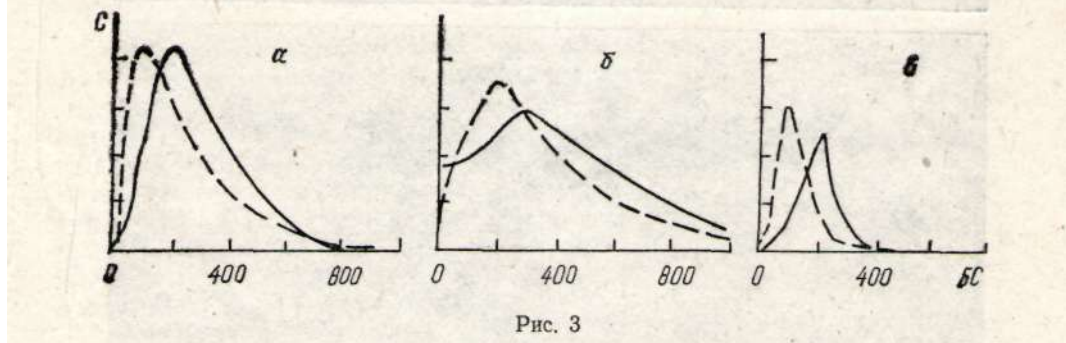


Рис. 3

Цитофлуориметрический анализ распределения 20 тыс. клеток бактерий по их относительному размеру проводили с помощью проточного цитофлуориметра FACStar Plus (Becton Dickinson) по интенсивности переднеуглового светорассеяния луча лазера [13].

Для получения биопрепарата на основе нейстонной формы культуры бацилл использовали описанный ранее метод [8], основанный на ряде пересевов клеток, находящихся в пленке на поверхности раздела жидкость • — газ.

Определение общих углеводов проводили путем их экстракции, последующего удаления растворителя и взвешивания [5], а также методом инфракрасной спектроскопии [2] с помощью прибора АН-1 (производство НПО «Химвтоматика», Санкт-Петербург). Для оценки гидрофобности поверхности клеток использовали метод Розенберга [14], основанный на распределении клеток суспензии между водой и гексадеканом. Показатель гидрофобности — это отношение количества клеток, перешедших в слой гексадекана, к исходному количеству клеток.

При исследовании возможности проведения биологического обеззараживания воды использовали биопрепарат, полученный на основе нейстонной формы бацилл, обладающих антибиотической активностью с широким спектром действия [6]. В качестве объекта обеззараживания были выбраны очищенные в аэротенках хозяйственно-бытовые сточные воды г. Рахова. Микробиологические исследования проводили общепринятыми методами [11]. Для обнаружения стафилококков образцы воды высевали на среду Чистовича, для обнаружения шигелл — на среду Эндо.

Результаты и их обсуждение. При изучении процесса очищения воды исследовали влияние концентрации гидрофобного компонента — гексадекана — в толщину и структуру биопленки, образовавшейся за 24 ч при внесении клеток *B. megaterium* ИБД в цилиндр с питательной

средой. Содержание гексадекана составляло соответственно 0,008, 0,08 и 0,8 об. % (рис. 1, а, б и в). Как видно из рисунка, биопленка состоит из трех слоев. Максимальная концентрация бактерий наблюдается в нижнем слое биопленки. В среднем слое клетки бактерий практически отсутствуют, и он является, по-видимому, слоем гексадекана. В верхнем слое присутствует небольшое количество бактерий.

Сканирование негативов фотографий биопленки с помощью микрофотометра МКФ-2 (СКВ биологического приборостроения, Пушкино) подтверждает результаты микроскопии (рис. 2). На рис. 2 (а — в) показаны примеры изменения оптической плотности по толщине биопленки для сред с начальным содержанием гексадекана соответственно 0,008, 0,08 и 0,8 об. %. По вертикали отложено расстояние от верхней границы биопленки, по горизонтали — оптическая плотность в условных единицах.

Толщина биопленки положительно коррелирует с расчетной начальной толщиной слоя гексадекана. Расчетная начальная толщина слоя гексадекана составляет 5, 50 и 500 мкм, а толщина биопленки — соответственно 16, 26 и 33 мкм.

Таблица 1. Показатель гидрофобности поверхности клеток бактерий нейстона и планктона

Микроорганизм	Показатель гидрофобности	
	нейстон	планктон
<i>B. megaterium</i> 1БД	0,35	0,12
<i>P. putida</i> БС-2	0,28	0,08
<i>A. paradoxus</i> БС-1	0,34	0,11

Цитофлуориметрический анализ распределения клеток *B. megaterium* по размерам в нейстонной пленке и планктоне для образца воды с содержанием гексадекана 0,008 об. % показал, что в поверхностном слое преобладают мелкие клетки, в то время как клетки бактерий, находящиеся в толще водной среды, характеризовались большими размерами (рис. 3, а). Аналогичные данные получены и для культур бактерий *Pseudomonas putida* БС-2 и *Alcaligenes paradoxus* БС-1 (рис. 3, б, в). Пунктиром показано распределение по размерам клеток нейстона, а сплошной линией — клеток планктона. Ось абсцисс — относительный размер клеток (переднеугловое светорассеяние луча лазера — БС), ось ординат — относительная частота встречаемости клеток данного размера (С).

При исследовании возрастной специфичности взаимодействия клеток бацилл с поверхностью раздела жидкость — газ нами были получены данные о повышенной способности к флотации наиболее мелких клеток бактериальной популяции, что положительно коррелировало с показателем гидрофобности поверхности клеток [7].

Сравнение показателей гидрофобности поверхности клеток нейстонной и планктонной форм указанных трех культур бактерий подтверждает тот факт, что в условиях естественной флотации лучшей флотационной способностью обладают клетки более мелких размеров с повышенной гидрофобностью поверхности (табл. 1).

Эффективность использования нейстонной формы *B. megaterium* для очистки воды от углеводородов нефти сравнивали с таковой процессов самоочистки загрязненной воды и очистки воды под влиянием суспензии клеток *B. megaterium*, не обладающих повышенными гидрофобными свойствами (табл. 2). Как видно из приведенных данных, при использовании нейстонной формы эффективность процесса очистки составила 89 %, тогда как в контроле и при использовании биопрепарата, не обладавшего повышенной гидрофобностью клеток, — 61 и 77 % соответственно.

Таблица 2. Использование биопрепарата на основе нейстонной формы для очистки воды от углеводов нефти (начальное общее содержание углеводов в воде — 780 мг/л)

Варианты опыта	Содержание углеводов нефти в воде (мг/л) в зависимости от времени (сут)				
	7	14	21	28	35
Контроль (вода без препарата)	640	490	420	350	310
Вода с суспензией исходной формы <i>B. megaterium</i>	530	400	310	240	182
Вода с нейстонной формой клеток <i>B. megaterium</i>	450	300	190	130	86

Таблица 3. Эффективность обеззараживания сточных вод очистных сооружений г. Рахова биопрепаратом на основе нейстонной формы бацилл *

Микроорганизмы	Контроль, без препарата		Концентрация препарата, 10^5 клеток на 1 мл					
			0,93		9,3		93	
	0 ч	24 ч	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч
Стафилококки	$0,9 \times 10^7$	$1,2 \times 10^6$	$4,8 \times 10^6$	н/о	$3,2 \times 10^4$	н/о	$0,4 \times 10^4$	н/о
Шигеллы	$0,9 \times 10^7$	$2,0 \times 10^3$	$3,1 \times 10^4$	н/о	$2,7 \times 10^4$	н/о	$2,1 \times 10^{-4}$	н/о
Общая обсемененность, клеток на 1 мл	—	$10,0 \times 10^6$	$12,5 \times 10^4$	$11,8 \times 10^3$	—	—	—	—

Примечание: н/о — микроорганизмы не обнаружены; * Препарат, представляющий собой набор штаммов аэробных спорообразующих бацилл, любезно предоставлен для наших исследований доктором медицинских наук С. Р. Резником (отдел антибиотиков Института микробиологии и вирусологии АН Украины, заведующий отделом — академик АН Украины В. В. Смирнов).

Полученный биопрепарат испытывали в реальных условиях для очистки водоема в пойме реки Сула. Загрязнение водоема произошло в результате аварийного разрушения трубопровода газового конденсата. Загрязнение ($0,07-0,10$ г углеводов/л) было локализовано на небольшом участке водоема (7×20 м), ограниченного высшей водной растительностью. Биопрепарат вносили из расчета 1×10^8 клеток на 1 мл поверхностной пленки толщиной 100 мкм. Через 10 сут очистки численность микроорганизмов снизилась до 1×10^6 кл/мл и оставалась неизменной на протяжении всего времени очистки. Внесение биопрепарата сопровождалось снижением концентрации углеводов в 3—4 раза за 90 дней.

Интересным направлением в экологической биотехнологии является микробное обеззараживание сточных вод и водоемов с помощью микробных препаратов [11].

Как показали результаты использования нейстонной формы бацилл, обладающих антибиотической активностью (табл. 3), выдержка обеззараживаемой воды с биопрепаратом в течение 48 ч снижала общую микробную обсемененность и позволила избавиться от присутствия в воде стафилококков и шигелл. Эффективность обеззараживания зависела от дозы вносимого биопрепарата.

Таким образом, нейстонные формы бактерий, обладающие антагонистическими свойствами по отношению к патогенной микрофлоре, могут, по-видимому, найти применение для обеззараживания сточных вод и для улучшения санитарно-гигиенического состояния водоемов.

ВИКОРИСТАННЯ НЕЙСТОННИХ ФОРМ БАЦИЛ ДЛЯ ОЧИСТКИ ТА ЗНЕЗАРАЖУВАННЯ ВОДОЙМИЩ

Резюме

Показана можливість селекції нейстонних, тобто які концентруються на поверхні розділу вода — атмосфера, бактеріальних форм. Препарат на основі нейстонної форми *B. megaterium* при очищці водоймищ від вуглеводнів нафти більш ефективний, ніж препарат на основі планктонної форми тієї ж культури. Препарат на основі нейстонної форми аеробних спороутворюючих бактерій ефективний при біологічному знезараженні очищених традиційними методами стічних вод.

Застосування нейстонних форм бактерій дозволяє інтенсифікувати мікробіологічні процеси в тонкому (15—40 мкм) поверхневому шарі водойм.

E. V. Stabnikova, V. N. Ivanov, N. N. Gregirchuk, A. N. Dulgerov
Technological Institute of Food Industry, Kiev; Institute of Microbiology
and Virology, Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

UTILIZATION OF NEUSTON FORMS OF BACILLI FOR TREATMENT AND DECONTAMINATION OF WATER BODIES

Summary

It is shown possible to select the bacterial strains which are neuston ones, i. e. concentrating on the water-atmosphere interface. The preparation based on the neuston form of *Bacillus megaterium* is more efficient for purification of water polluted with oil hydrocarbons than the preparation based on the planktonic form, of the same culture. Preparation based on the neuston form of the aerobic spore-forming bacteria is effective for biological decontamination of sewage treated using conventional methods.

Application of neuston bacterial forms permits intensifying the microbiological processes in the thin (15-40 μm) surface layer of water bodies.

Key words: neuston, bacterial preparations, purification of water polluted with oil, water decontamination using biological methods.

The author's address: *E. V. Stabnikova*,
Technological Institute of Food Industry, 68 Vladimirska St., Kiev, 252017, Ukraine

1. Гирич В. Н., Григорьева Л. В., Ерусалимская Л. Ф. и др. Санитарно-бактериологическое и вирусологическое исследование воды.— Киев : Здоров'я, 1981.— 176 с.
2. Методы исследования качества воды водоемов / Под ред. А. П. Шицковой.— М.: Медицина, 1990.— 400 с.
3. Романенко В. И., Пубинес М., Даукшта А. С. Развитие бактерий и их активность в поверхностной пленке воды в экспериментальных условиях // Микробиология.— 1978.— 47, № 1.— С. 149—157.
4. Романенко В. И. Микробиологические процессы продукции и деструкции органического вещества во внутренних водоемах.— Л. : Наука, 1986.— 229 с.
5. ГОСТ 26449.1—85. Гравиметрический метод определения нефтепродуктов.— Введ. 01.01.86.
6. Смирнов В. В., Резник С. Р., Василевская И. А. Споробразующие аэробные бактерии — продуценты биологически активных веществ.— Киев : Наук, думка, 1982.— 280 с.

7. Стабникова Е. В., Грегирчак Н. Н., Иванов В. Н. Возрастная способность взаимодействия клеток бацилл с поверхностью раздела жидкость — газ // Микробиология— 1992.—61, № 6.—С. 110—114.
8. Стабникова Е. В., Грегирчак Н. Н., Тараненко Т. О., Нудьга А. Ю. Автоселекция нейстонных форм бактерий // Микробиол. журн.—1991.— 53, № 5.— С. 33—37.
9. Стабникова Е. В., Гордиенко А. С, Ксенофонтов Б. С, и др. Взаимодействие клеток с поверхностью раздела жидкость — газ.— Киев : Наук, думка, 1992.— 196 с.
10. Цыбань А. В. Бактерионейстон — первое звено нейстонного комплекса организмов // Биологические проблемы океанографии южных морей.— Киев : Наук, думка, 1969,—С. 106—:108.
11. Vgaieг Н. Mikroorganismen reinigen das Abwasser // Wiss. schafths Magasin.— • 1984.—N 7.—S. 105—109.
12. Datka B. J., Kwan K. K- Health-indicator bacteria in water surface microlayer // Can. J. Microbiol—1978.—24, N 2.—P. 187—188.
13. Hutter K--J-, Eipel H. E. Microbial determinations by flow cytometry // J. Gen. Microbiol.—1979.—113, N 2.—P. 369—375.
14. Rosenberg M. Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity // FEMS Microbiol. Lett.—1984.—22, N 3.—P. 289—295.

Рецензент Л. И. Глоба
Член редколлегии П. И. Гвоздяк

Получено 04.06.92