

В. В. Ильинский, Е. В. Макаревич, Е. В. Крамаренко, В. В. Индушко

Оценка влияния условий культивирования на способность микроорганизмов сточных вод к флокуляции

Сточные воды являются одним из существенных источников загрязнения водных экосистем Кольского Севера. Стоки, поступая в грунтовые, поверхностные воды, а также в прибрежную зону морских акваторий оказывают комплексное негативное влияние на биоценозы водных объектов. Учитывая, что в климатических условиях Крайнего Севера процессы самоочищения водоемов значительно замедляются, представляется актуальным исследование влияния внешних факторов на аборигенные микроорганизмы, участвующие в биологической трансформации большинства загрязняющих веществ. Наряду с окисляющей активностью, микроорганизмы способны накапливать в клетках поллютанты, а также образовывать флокулы, тем самым связывая растворенные загрязняющие вещества, которые могут быть сравнительно легко удалены из водной среды механическим путем. На основании полученных сведений о химическом составе некоторых городских и бытовых сточных вод были разработаны питательные среды, в которых культивировали микроорганизмы, выделенные из стоков. В качестве основных характеристик среды культивирования, влияющих на интенсивность и направленность метаболических процессов у микроорганизмов, были выбраны соотношения C/N, C/P и N/P. В ходе работ изучали интенсивность роста бактерий в экспериментальных питательных средах и определяли флокулирующую активность бактериальных суспензий. Скорости роста выделенных микроорганизмов (*Pseudomonas spp.* и культуры бактерий семейства *Enterobacteriaceae*) в среднем составили $70 \cdot 10^3$ и $117 \cdot 10^3$ кл/ч соответственно. Интенсивность роста каждой культуры на средах различного состава колебалась в пределах трех порядков и коррелировала с относительным содержанием фосфатов в среде. Флокулирующий потенциал не зависел от соотношений биогенных элементов C/N, C/P и N/P. Культуры проявляли способность осаждать взвешенные вещества на уровне 50 и более процентов после культивирования на питательных средах, близких по составу к условиям среды обитания.

Ключевые слова: сточные воды, гидрохимия, биогенные элементы, активный ил, питательные среды, биофлокулирующая активность.

Введение

К важнейшим факторам антропогенной нагрузки, способным отрицательно воздействовать на окружающую среду, относятся недостаточно очищенные промышленные и бытовые сточные воды. Эффективность очистки стоков напрямую зависит от интенсивности метаболических процессов микроорганизмов, приводящих к изъятию большинства присутствующих в воде загрязняющих веществ. В климатических условиях Крайнего Севера (при замедлении трансформации ксенобиотиков) проблема полноты очистки становится особенно актуальной. Несомненный практический интерес представляет способность микроорганизмов, наряду с биотрансформирующей активностью, аккумулировать некоторые поллютанты, например накапливать в клетке фосфаты в виде полифосфатных гранул. Последующее агрегирование клеток, сопровождающееся образованием флокул за счет синтеза микроорганизмами внеклеточных полимеров (биофлокулянтов), а также стабилизации структуры хлопьев электростатическими, гидрофобными и другими силами, приводит к уменьшению степени дисперсности частиц загрязняющих веществ и последующему извлечению их в процессе осаждения.

Целью нашего исследования являлась оценка влияния условий культивирования на биотехнологический потенциал микроорганизмов, выделенных из водных экосистем Крайнего Севера. На основании сведений о физико-химических условиях обитания исследуемых объектов разрабатывались питательные среды для их культивирования; оценивалась интенсивность роста на экспериментальных средах и способность к флокуляции бактериальных суспензий, полученных при различных химических условиях культивирования.

Материалы и методы

Выделение микроорганизмов, способных продуцировать биофлокулянты, проводили с использованием различного состава культуральных агаровых чашек для выращивания бактерий. В результате были изолированы чистые культуры бактерий, являющиеся частью бактериоценозов сточных вод и активного ила и обладающие первичными признаками биофлокулянт-продуцирующих микроорганизмов (наличием чехлов, капсул, слизи). Для определения первичных признаков использовали такие методы, как описание морфологических признаков выросших колоний (слизевобразование, вязкость), микроскопирование (окраска по Граму, Романовскому – Гимзе, Бурри – Гинсу и др.). Одна из чистых культур бактерий – *Pseudomonas spp.* –

была выделена из группы гетеротрофных нитрификаторов активного ила. Микроорганизм, выделенный из городских сточных вод, относился к семейству *Enterobacteriaceae* [1].

Для дальнейшего исследования интенсивности роста и флокулирующей активности культур были измерены основные параметры естественной среды их обитания (городских сточных вод и бытовых стоков до и после очистки). В качестве гидрохимических показателей были выбраны температура, pH, массовые концентрации нитрит-ионов, нитрат-ионов, фосфат-ионов и ионов аммония, а также растворенный кислород и биологическое потребление кислорода (БПК).

На основе результатов определения физико-химических характеристик среды были разработаны рецептуры искусственных питательных сред для культивирования микроорганизмов в условиях, приближенных к их естественным средам обитания. Экспериментальные питательные среды отличались исходными соотношениями биогенных элементов (C/N, C/P и N/P) как определяющими трофическую активность микроорганизмов. В качестве источников азота использовали сернокислый аммоний, нитрит и нитрат натрия, источником углерода служила глюкоза, для удовлетворения потребности микроорганизмов в витаминах и других факторах роста в состав питательных сред вносили дрожжевой экстракт. При проведении эксперимента устанавливали одинаковые для всех сред и культур условия культивирования.

Интенсивность роста бактерий оценивали на экспериментальных питательных средах и на среде, предложенной китайскими учеными для выделения биофлокулянт-продуцирующих бактерий и принятой за эталонную [2]. Питательные среды засеивали выделенными культурами потенциальных биофлокулянт-продуцирующих микроорганизмов *Pseudomonas spp.* и семейства *Enterobacteriaceae* для определения интенсивности роста и накопления бактериальной суспензии. По изменению количества клеток в единицу времени в каждой из ростовых сред судили об интенсивности роста выращиваемых культур.

Оценка флокулирующей способности полученных культуральных суспензий проводилась согласно модифицированному [2] методу Курана [3] с использованием каолиновой глины в качестве осаждаемого компонента среды. Каолиновая глина (средний диаметр частиц 4 мкм) суспендировалась в дистиллированной воде в концентрации 5,0 г/л при pH = 7,0. В пробирки добавлялись суспензия каолиновой глины (9 мл), раствор биофлокулянта (0,1 мл) и раствор 100 ммоль/л CaCl₂ (0,25 мл). Стандартный образец, в котором вместо биофлокулянта содержалась дистиллированная вода, также измерялся при тех же условиях. Объемы пробирок были доведены до 10 мл дистиллированной водой. После тщательного перемешивания с помощью магнитной мешалки пробирки отстаивались в течение пяти минут. Коэффициент светопоглощения верхней фазы измерялся с помощью спектрофотометра при длине волны 550 нм. Флокулирующую активность растворов рассчитывали по формуле $[(B - A)/B] \cdot 100 \%$, где *A* и *B* – плотности (при длине волны 550 нм) стандартного и исследуемого образцов соответственно [2].

Результаты и обсуждение

Физико-химические показатели среды обитания исследуемых микроорганизмов, определяющие характер протекающих во время очистки биохимических процессов, представлены в табл. 1.

Эффективность биологической очистки сточных вод во многом зависит от концентрации основных элементов питания: углерода, азота и фосфора. Обычно органические вещества сточных вод представлены углеводами, азотсодержащими соединениями (белками, аминокислотами), жирами, детергентами и небольшим количеством других веществ (полимерными и полициклическими соединениями).

Таблица 1. Гидрохимические параметры городских и бытовых стоков
Table 1. Hydrochemical parameters of urban and domestic sewage

Стоки	<i>T</i> , °C	pH	Растворенный кислород, мг/л	БПК, мг/л	Аммоний, мг/л	Нитриты, мг/л	Нитраты, мг/л	Фосфаты, мг/л
городские	10	5,0	5,55 ± 1,5	113,2 ± 12,2	22,7 ± 2,6	0,32 ± 0,02	1,56 ± 0,73	6,8 ± 2,41
бытовые до очистки	15	7,0	–	65,4 ± 2,2	67 ± 3,1	0,44 ± 0,1	3,02 ± 0,5	40 ± 5,6
бытовые после очистки	10	7,0	3,8 ± 1,1	19,6 ± 3,5	56 ± 3,4	0,3 ± 0,1	5,78 ± 1,2	96 ± 4,1

Исследуемые городские сточные воды характеризовались оптимальной концентрацией органического вещества (БПК = 113,2 мг/л), при которой возможны как процессы полного окисления органических соединений, так и процессы нитрификации. Бытовые стоки, поступающие на очистку, оценивались по величине БПК (65,4 мг/л) как высокоразбавленные сточные воды.

Биодеградация органических веществ сопровождается изменением концентрации минеральных форм азота (аммония, нитритов, нитратов) и фосфора. Азот и фосфор, как биогенные элементы, стимулируют развитие бактериоценоза активного ила, однако избыток фосфатов и окисленных форм азота может приводить к эвтрофированию водоемов [4].

Основной формой неорганического азота в исследуемых сточных водах был аммоний, что может свидетельствовать об интенсивно протекающих процессах аммонификации и слабой степени нитрификации на момент проведения анализа. Кроме того, были отмечены высокие концентрации фосфатов в бытовых стоках до и после очистки. Отмеченный уровень фосфатов после очистки (96 мг/л), в сотни раз превышающий ПДК для водоемов любого типа, может указывать на недостаточное развитие бактерий активного ила, способных аккумулировать фосфор.

Наряду с абсолютными значениями концентраций биогенных веществ, определяющее значение имеет их соотношение, влияющее на интенсивность и направление метаболических процессов у микроорганизмов. Так, было установлено, что оптимальные соотношения в морской среде C/N и C/P, необходимые для интенсификации процессов окисления нефтепродуктов углеводородокисляющими микроорганизмами, составляли 10/1 и 100/1 соответственно [5]; для почвенных микробиоценозов показано, что для иммобилизации азота соотношение C/N должно быть не менее 25/1, в противном случае будет происходить накопление аммония в почве [4]. Для обеспечения эффективной очистки сточных вод также должно выдерживаться соотношение C/N/P и соответствовать значениям 100/5/1 [6].

Соотношения C/N, C/P и N/P в питательных средах 1–4 были эквивалентны содержанию биогенов в эталоне, городских сточных водах и в бытовых стоках до и после очистки соответственно (табл. 2).

Таблица 2. Соотношение биогенных веществ питательных сред
 Table 2. Ratio of biogenic substances of nutrient media

Соотношение биогенов	Питательная среда			
	1	2	3	4
C/N/P	25/1/5	90/30/1	20/10/1	10/2/1
C/N	25/1	3/1	2,5/1	2,5/1
C/P	6/1	90/1	20/1	10/1
N/P	1/5	30/1	10/1	2/1

Результаты роста бактериальных культур на питательных средах колебались в широком диапазоне значений (рис. 1, 2).

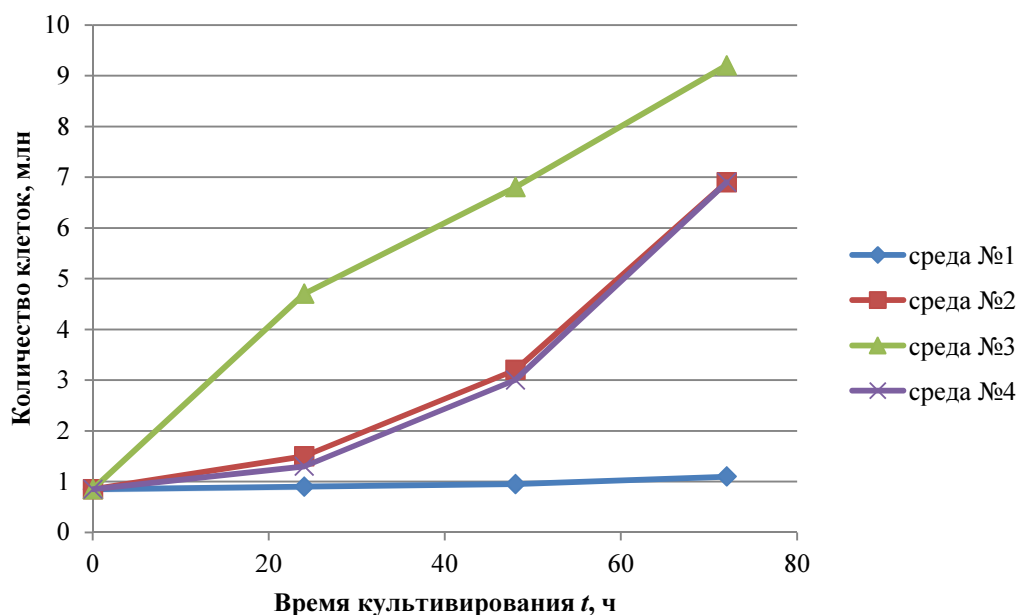


Рис. 1. Динамика роста культуры *Pseudomonas spp.* (культура 1)
 Fig. 1. The growth dynamics of *Pseudomonas spp.* (culture 1)

Численности бактерий в экспериментальных средах на конец срока культивирования различались в десять раз для культуры 1 и в два раза для культуры 2. Максимальная скорость роста культуры бактерий *Pseudomonas spp.* была отмечена в среде 3 ($115 \cdot 10^3$ кл/ч), минимальная – в среде 1 ($3 \cdot 10^3$ кл/ч). Интенсивность роста культуры бактерий семейства *Enterobacteriaceae* варьировала в пределах от $80 \cdot 10^3$ кл/ч на питательной среде 1 до $150 \cdot 10^3$ кл/ч на средах 2 и 3. Доля фосфора по отношению к другим биогенным элементам в среде 1 была максимальной по сравнению с другими питательными средами (табл. 2).

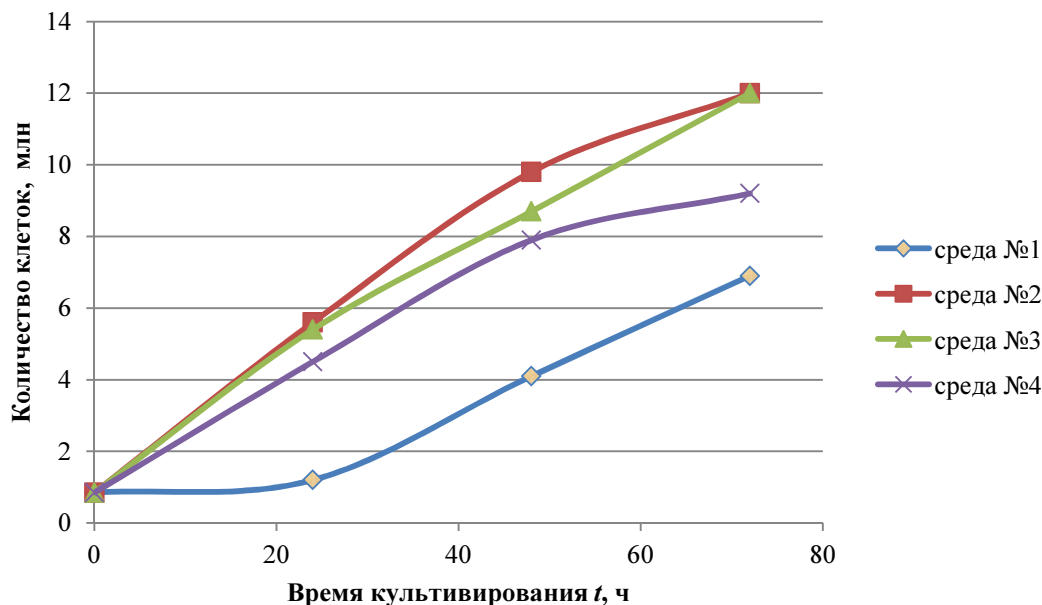


Рис. 2. Динамика роста культуры семейства *Enterobacteriaceae* (культура 2)
Fig. 2. The growth dynamics of culture bacteria of *Enterobacteriaceae* family (culture 2)

Из рис. 1 видно, что численность бактерий *Pseudomonas spp.* на среде 1 практически не изменялась. Можно предположить, что относительное содержание фосфора, превышающее долю азота в пять раз и составляющее 20 % от углерода, являлось фактором, лимитирующим рост культуры. Соотношение биогенов в среде 3 было оптимальным для роста обеих культур.

Для подтверждения предположения наличия связей между скоростью роста культур микроорганизмов и соотношением биогенных элементов в средах культивирования рассчитывали коэффициенты ранговой корреляции между данными явлениями (оценка связи представлена в табл. 3).

Таблица 3. Оценка влияния соотношения биогенных веществ питательных сред на скорость роста культур

Table 3. Assessment of the impact of the biogenes ratio of nutrient media on the rate of bacterial culture growth

Соотношение биогенов в питательной среде	Коэффициент ранговой корреляции для культур бактерий	
	<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
C/N	-0,4	-0,5
C/P	0,6	0,9
N/P	0,6	0,9

Значения коэффициентов корреляции свидетельствовали о существенном влиянии содержания в элективных средах биогенных элементов на интенсивность роста культур. При повышении доли углерода и азота скорость роста культур повышалась, а в случае преобладания фосфора – снижалась. В целом отклик культуры бактерий рода *Pseudomonas spp.* на повышение относительного содержания фосфора в среде был менее выражен, что может быть следствием аккумуляции фосфатов в клетках.

Изучение флокулирующей способности выделенных культур дает возможность составить представление о биотехнологическом потенциале исследуемых микроорганизмов при их использовании в процессе биологической очистки сточных вод.

Результаты изучения флокулирующей активности суспензий изучаемых культур представлены на рис. 3.

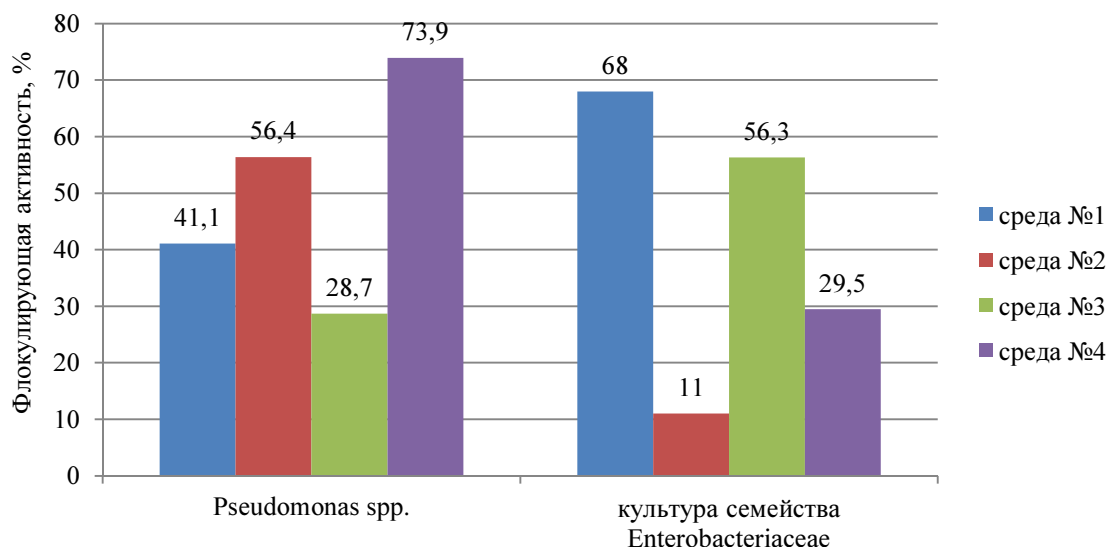


Рис. 3. Флокулирующая активность культур *Pseudomonas spp.* и семейства *Enterobacteriaceae*
Fig. 3. Flocculating activity of bacterial cultures of *Pseudomonas spp.* and *Enterobacteriaceae* family

В ходе исследования установлено, что бактериальные суспензии бактерий *Pseudomonas spp.*, полученные на питательных средах различного состава, были способны осаждать взвесь каолиновой глины в среднем на 50 %, а суспензии бактерий семейства *Enterobacteriaceae* – на 40 %.

Культура бактерий *Pseudomonas spp.* по результатам исследования обладала наибольшей флокулирующей активностью при культивировании ее на питательной среде, соответствующей по химическому составу бытовым сточным водам после очистки. Эталонная питательная среда и среда, соответствующая бытовым стокам до очистки, богатые органическими веществами и биогенными элементами, менее эффективны, чем среды, максимально приближенные к условиям, при которых выделяли данный микроорганизм. В отличие от бактериальной культуры рода *Pseudomonas*, бактерии семейства *Enterobacteriaceae* показали максимум флокулирующей способности после культивирования на богатых органическим веществом средах. Флокулирующая активность культуральной суспензии, выделенной из эталонной питательной среды, на 12 % превышает активность клеток микроорганизмов, культивируемых в среде с максимально приближенными условиями обитания для данного микроорганизма.

Суспензии обеих культур, полученные на средах, приближенных по химическому составу к водам, из которых выделили данные микроорганизмы, проявляли равную флокулирующую активность (56 %). Можно предположить, что условия постоянного обитания микроорганизмов, обладающих способностью к флокуляции, являются благоприятными для синтеза биофлокулянтов. Смещение концентраций органических веществ и биогенных элементов в ту или иную сторону может негативно воздействовать на способность биофлокулянт-продуцирующих микроорганизмов синтезировать внеклеточные полимеры.

Для изучения связей между содержанием биогенных элементов, предположительно способных оказывать влияние на синтез биофлокулянтов, и флокулирующей активностью бактериальных суспензий был проведен статистический анализ полученных данных с использованием коэффициентов корреляции. Корреляционный анализ не выявил значимой зависимости концентраций углерода, азота и фосфора в питательной среде (абсолютных и относительных) и флокулирующей способности культур бактерий рода *Pseudomonas* и семейства *Enterobacteriaceae*.

Заключение

В результате проведенных исследований были разработаны питательные среды, в которых культивировали микроорганизмы, выделенные из стоков. Среда культивирования значительно отличалась по соотношениям биогенов (C/N, C/P и N/P). Было отмечено, что скорости роста выделенных микроорганизмов (культуры *Pseudomonas spp.* и бактерий семейства *Enterobacteriaceae*) в значительной степени зависели от характеристик сред, определяющих интенсивность метаболических процессов. Скорости роста культур на средах различного состава колебались в пределах трех порядков и в наибольшей степени коррелировали с относительным содержанием фосфатов в среде. Установлено, что суспензии

бактерий *Pseudomonas spp.*, полученные на питательных средах различного состава, были способны осажать взвесь каолиновой глины в среднем на 50 %, а суспензии бактерий семейства *Enterobacteriaceae* – на 40 %. Оценка связей между содержанием биогенных элементов в среде культивирования и флокулирующей активностью бактериальных суспензий не подтвердила влияние концентраций биогенов на способность бактерий синтезировать биофлокулянты.

Библиографический список

1. Kurane R., Takeda K., Suzuki T. Screening and characteristics of microbial flocculants // *Agricultural and Biological Chemistry*. 1986. V. 50, N 9. P. 2301–2307.
2. Ильинский В. В., Крамаренко Е. В., Макаревич Е. В. Оценка функциональной активности активного ила локально-очистного сооружения, действующего в условиях Арктического региона // *Вестник МГТУ*. 2017. Т. 20, № 1/2. С. 157–164.
3. Characterization of a bioflocculant from a newly isolated *Vagococcus* sp. / Gao H. Y. [etc.] // *J. Zhejiang Univ. Sci.* 2006. V. 7, N 3. P. 186–192.
4. Емцев В. Т., Мишустин Е. Н. *Микробиология*. М. : Дрофа, 2005. 445 с.
5. Биоиндикация и реабилитация экосистем при нефтяных загрязнениях / Кураков А. В. [и др.]. М. : Графикон, 2006. 336 с.
6. Воронов Ю. В., Яковлев С. В. *Водоотведение и очистка сточных вод*. М. : АСВ, 2006. 704 с.

References

1. Kurane R., Takeda K., Suzuki T. Screening and characteristics of microbial flocculants // *Agricultural and Biological Chemistry*. 1986. V. 50, N 9. P. 2301–2307.
2. Ilinskiy V. V., Kramarenko E. V., Makarevich E. V. Otsenka funktsionalnoy aktivnosti aktivnogo ila lokalno-ochistnogo sooruzheniya, deystvuyuschego v usloviyah Arkticheskogo regiona [Evaluation of the functional activity of activated sludge from local waste water treatment plant in the Arctic region] // *Vestnik MGTU*. 2017. V. 20, N 1/2. P. 157–164.
3. Characterization of a bioflocculant from a newly isolated *Vagococcus* sp. / Gao H. Y. [etc.] // *J. Zhejiang Univ. Sci.* 2006. V. 7, N 3. P. 186–192.
4. Emtsev V. T., Mishustin E. N. *Mikrobiologiya* [Microbiology]. M. : Drofa, 2005. 445 p.
5. Bioindikatsiya i reabilitatsiya ekosistem pri neftyanyh zagryazneniyah [Bioindication and rehabilitation of ecosystems at oil pollution] / Kurakov A. V. [i dr.]. M. : Grafikon, 2006. 336 p.
6. Voronov Yu. V., Yakovlev S. V. *Vodootvedenie i oчитка stochnyh vod* [Wastewater disposal and wastewater treatment]. M. : ASV, 2006. 704 p.

Сведения об авторах

Ильинский Владимир Викторович – Ленинские горы, 1, стр. 12, г. Москва, Россия, 119991; Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, д-р биол. наук, профессор; e-mail: vladilinskiy@gmail.com

Ilinskiy V. V. – 1/12, Leninskie Gory, Moscow, Russia, 119991; M. V. Lomonosov Moscow State University, Dr of Biol. Sci., Professor; e-mail: vladilinskiy@gmail.com

Макаревич Елена Викторовна – ул. Спортивная, 13, г. Мурманск, Россия, 183010; Мурманский государственный технический университет, канд. биол. наук, доцент; e-mail: makarevichev@mstu.edu.ru

Makarevich E. V. – 13, Sportivnaya Str., Murmansk, Russia, 183010; Murmansk State Technical University, Cand. of Biol. Sci., Associate Professor; e-mail: makarevichev@mstu.edu.ru

Крамаренко Екатерина Вячеславовна – ул. Спортивная, 13, г. Мурманск, Россия, 183010; Мурманский государственный технический университет, аспирант; e-mail: kramarenkoev@mstu.edu.ru

Kramarenko E. V. – 13, Sportivnaya Str., Murmansk, Russia, 183010; Murmansk State Technical University, Ph.D. Student; e-mail: kramarenkoev@mstu.edu.ru

Индушко Валерия Викторовна – ул. Спортивная, 13, г. Мурманск, Россия, 183010; Мурманский государственный технический университет, магистр; e-mail: indushkovv@mstu.edu.ru

Indushko V. V. – 13, Sportivnaya Str., Murmansk, Russia, 183010; Murmansk State Technical University, Undergraduate Student; e-mail: indushkovv@mstu.edu.ru

V. V. Il'inskiy, E. V. Makarevich, E. V. Kramarenko, V. V. Indushko

Assessment of impact of culture conditions on capability of wastewater's microorganisms to flocculation

Wastewater is one of the significant sources of pollution of the aquatic ecosystems of the Kola North. Sewage coming to the ground waters, surface waters and near shore marine basin have a complex negative impact on the biocenosis of water objects. Considering the fact that basin self-purification process in climatic environment of the Far North is slow, it seems to be current problem to research influence of external factors on the native microorganisms involved in the biological transformation of most pollutants. Along with oxygenizing activity microorganisms are able to accumulate pollutant in the cells and to form floccules. As a result, microorganisms fix the dissolved contaminants that may be mechanically derived from water. Using the data on the chemical makeup of some urban and domestic sewage, nutrient media have been developed where microorganisms isolated from effluents have been cultivated. As major characteristics of the cultivation media affecting the intensity and direction of metabolic processes in microorganisms, the ratios C/N, C/P and N/P have been chosen. Intensity growth of bacteria in experimental nutrient media has been studied and the flocculating activity of bacterial suspensions has been determined. The rate of these microorganisms (*Pseudomonas spp.* and cultures of bacteria of *Enterobacteriaceae* family) average has been $70 \cdot 10^3$ and $117 \cdot 10^3$ cells/h respectively. The growth rate of each culture on different composition nutrient media has varied within three orders, and has correlated with the relative content of phosphates in the nutrient media. The flocculating potential does not depend on the ratio of biogenic elements C/N, C/P and N/P. Both cultures have shown the ability to precipitate suspended matter at the level of 50 % or more after cultivation on nutrient media similar in composition to habitat conditions.

Key words: wastewater, hydrochemistry, biogenic elements, activated sludge, breeding grounds, bioflocculating activity.