

**ISOLATION AND SCREENING OF MICROORGANISMS –
DESTRUCTORS OF GLYCOL ETHERS**

*D. A. NARKEVICH, A. M. HLUSHEN, A. G. MASHACHKA, D. I. KELNIK,
I. I. ALIASHKEVICH, M. S. CHYRYKAVA*

*Institute of Microbiology, NAS of Belarus, Minsk, Belarus,
dasha.narkevich@mail.ru*

Bacterial strains that degrade glycol ethers were isolated and selected. The preferred source of carbon is 2-butoxyethanol. The largest number of microorganisms that showed the ability to utilize glycol ethers (0.5–3 %) was found on Bushnell Haas (BH) mineral medium containing iron, which is the active center of many metalloenzymes. The taxonomic affiliation of the most active strains was established.

Поступила в редакцию 14.06.2022

<https://doi.org/10.47612/2226-3136-2022-14-395-408>
УДК 574.635 + 628.355

**СТИМУЛЯЦИЯ ГРАНУЛИРОВАНИЯ АКТИВНОГО
ИЛА ОЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЙ МОЛОЧНОГО
ПРОИЗВОДСТВА В УСЛОВИЯХ АЭРАЦИИ**

О. В. НЕСТЕР, Р. М. МАРКЕВИЧ

*Белорусский государственный технологический университет,
Минск, Беларусь, nester80@yandex.by*

Изучена стимуляция гранулирования активного ила с помощью способных к агрегированию микроорганизмов, выделенных из активного ила очистных сооружений молочного производства. Инкубирование иловой смеси проводили в отъемно-доливном режиме при периодичности подпитки 10 сут в условиях аэрации. Показано, что добавление культуральной жидкости бактерий в количестве 10, 20 и 30 об. % от объема исходного активного ила способствует увеличению прироста активного ила и ухудшению его седиментационной способности. При инкубировании иловой смеси с добавлением культуральной жидкости выделенных бактерий в количестве 5 и 1 об. % от объема исходного ила формирование первых гранул зафиксировано через 14 сут, в то время как в контрольных пробах продолжительность гранулирования составляла около 10 недель. Количество и размер гранул различны: при использовании культуральной жидкости бактерий М14 и М4 гранулировалась практически вся иловая масса, диаметр гранул составлял 2,0–2,5 мм. В пробах

с добавлением культуральной жидкости бактерий М32 и М23 отмечено малое количество гранул, их размер колебался в пределах от 0,7 до 1,5 мм. Для всех выделенных бактерий, способных к агрегированию (21 изолят), определено содержание полисахаридов в культуральной жидкости. Однако нет четкой корреляции между содержанием полисахаридов, местом их локализации и образованием гранул. Полученные предложенным методом гранулы ила имеют стабильную структуру, сохранность целостности гранул проверена в течение года.

Введение. Крупномасштабный сброс сточных вод является неизбежным следствием деятельности человека. В настоящее время большое внимание уделяется разработке и развитию новых, а также усовершенствованию существующих методов очистки сточных вод.

Биологическая очистка происходит при непосредственном контакте сточных вод с активным илом, который представляет собой зооглейные скопления (хлопки) бактерий и простейших организмов. Преобладающие микроорганизмы биоценоза активного ила – гетеротрофные флокулообразующие бактерии. Их роль заключается в образовании внеклеточных полимеров, обуславливающих сорбцию органических и неорганических соединений, а также клеток, которые сами не способны к хлопьеобразованию, но участвуют в разложении загрязнений. Способность микроорганизмов к агрегированию имеет значение не только для процесса очистки, но и для последующего отделения активного ила от очищенной воды [1, 2].

В современных анаэробных биореакторах деструкция загрязнений с высокой скоростью происходит благодаря тому, что микроорганизмы, осуществляющие разные стадии, собраны в компактные гранулы, обладающие высокой прочностью и устойчивостью. Применение гранулированного активного ила в аэробной очистке сточных вод имеет ряд неоспоримых преимуществ: за счет хороших седиментационных свойств гранул ускоряется отделение активного ила от очищенной воды и его последующее обезвоживание; вследствие высокой концентрации биомассы гранулы выдерживают большие нагрузки по органическим загрязнениям на единицу объема, что позволяет сократить площадь очистных сооружений; при спонтанном

сбросе сточных вод с повышенными концентрациями токсичных веществ гранулы ила остаются активными, в то время как флокулированный ил может погибнуть; применение гранул ила обуславливает минимальный прирост избыточной биомассы; послойное расположение бактериальных клеток в составе гранулы обеспечивает протекание процессов, требующих разного уровня аэрации (нитрификации, денитрификации); гранулы активного ила обладают большей механической устойчивостью по сравнению с флокулированным активным илом. Благодаря своим уникальным свойствам гранулированный активный ил может использоваться с высокой эффективностью, меньшими капиталовложениями и эксплуатационными расходами, чем флокулированный [1, 3, 4].

Преимущества использования гранулированного активного ила очевидны, однако механизм формирования гранул до конца не изучен и требует дальнейших исследований.

Установлено, что на процесс формирования гранул активного ила в условиях аэрации оказывает влияние множество факторов. Для обеспечения стабильности гранул и предотвращения развития нитчатых форм бактерий периоды высокой нагрузки по субстрату необходимо чередовать с периодами голодания [5]. Высокие гидродинамические силы сдвига стимулируют бактерии к увеличению производства внеклеточных полимерных веществ с более высоким соотношением полисахарид : белок, что повышает гидрофобность клеток. В условиях удаления разрастающихся структур образуются более компактные и плотные аэробные гранулы [6]. Экспериментально установлено, что короткое время осаждения способствует развитию микробного сообщества более простого, чем в исходном иле, за счет вымывания нефлокулирующих штаммов и влияет на гранулирование ила [7]. М.-К. Н. Winkler и соавт. [8] отметили, что гранулированный активный ил может быть сформирован в широком диапазоне концентраций растворенного кислорода, однако содержание кислорода менее 2–5 мг/дм³ приводит к нестабильности гранул. Предполагается, что температура может влиять на производительность аэробного гранулирования, однако в диапазоне 25–38 °С влияние температуры не существенно [9]. Установ-

лено, что двухвалентные катионы, особенно Ca^{2+} и Mg^{2+} , повышают стабильность гранул за счет образования мостиков между молекулами внеклеточных полимерных соединений [10]. Культивирование аэробных гранул осуществляется в очень широком диапазоне нагрузки по органическим веществам (от 2,5 до 15 кг ХПК/м³·сут). J.-Н. Тау и соавт. [9] отмечают, что средний размер аэробных гранул увеличивается с повышением нагрузки.

Считается, что важную роль в обеспечении механической прочности аэробного гранулированного ила играют внеклеточные полимерные вещества: полисахариды, структурные белки, экзоферменты, нуклеиновые кислоты, в частности, внеклеточная ДНК может играть роль опоры для желеобразного матрикса биопленки. Одну из главных ролей в процессе агрегирования выполняют полисахариды, которые обеспечивают жесткость и стабильность конструкции сформированных агрегатов [11–13]. Применение агрегированных объектов, заключенных в единую полисахаридную пленку, при очистке сточных вод с переменным расходом и составом, содержащих токсичные компоненты, повышает устойчивость такого ила в 10–100 раз по сравнению со свободными клетками [11].

Цель исследования – стимуляция гранулирования активного ила в условиях аэрации с помощью флокулообразующих микроорганизмов, выделенных из активного ила очистных сооружений молочного производства.

Материалы и методы. Объектами исследования являлись активный ил очистных сооружений молочного производства и культуры бактерий, выделенные из активного ила данных очистных сооружений.

Выделение культур микроорганизмов. Для выделения микроорганизмов 2 мл отстоянного активного ила из возвратного канала гомогенизировали на встряхивателе типа Wortex на оборотах 2300 мин⁻¹ до достижения однородности смеси. Высев микроорганизмов проводили на плотные агаризованные среды (питательный агар и сусло-агар, агар М 17 (для молочнокислых бактерий) методом Коха на три чашки Петри. Инкубировали при 30 ± 1 °С в течение 3 сут. Расчистку культур проводили высевом на плотные среды методом Коха трехкратно. Чистоту культур

проверяли микроскопированием. Далее проверяли способность культур к агрегированию (образованию биопленок, хлопков, флокул, гранул) в аэробных условиях. Питательные среды (питательный бульон, сусло-бульон, бульон М 17) инокулировали культурами микроорганизмов и инкубировали в аэробных условиях на шейкере Environmental Shaker-Incubator ES-20 при рабочей частоте 140 мин^{-1} и температуре $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 3 сут.

Получение гранул. Для получения гранул активного ила готовили иловую смесь в конических колбах объемом 250 мл. 30 мл активного ила, отобранного из возвратного канала очистных сооружений молочного производства, смешивали с 70 мл модельных сточных вод и добавляли культуральную жидкость микроорганизмов в количестве 1, 5, 10, 20, 30 об. % от исходного объема ила.

Культуральную жидкость бактерий добавляли в виде суточной культуры, которую готовили в питательном бульоне и инкубировали при $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 18 ч. Модельные сточные воды готовили путем разбавления молочной сыворотки водопроводной водой до ХПК $2000 \pm 200 \text{ мг/дм}^3$.

Процесс гранулирования активного ила проводили на шейкере Environmental Shaker-Incubator ES-20 при рабочей частоте 140 мин^{-1} и температуре $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Значение pH в пределах 6,8–8,5. Выбран отъемно-доливной режим инкубирования, период подпитки – один раз в 7–10 суток, культуральную жидкость вносили при каждой подпитке, оставляли контрольные пробы без добавления культуральной жидкости.

Во время подпитки иловую смесь переносили в мерный цилиндр, отстаивали в течение 7 мин, отбирали надосадочную жидкость в количестве 70 мл, доводили объем смеси до рабочего объема (100 мл) свежей порцией модельных сточных вод молочного производства, переносили в коническую колбу объемом 250 мл, добавляли культуральную жидкость бактерий и ставили на инкубирование.

Полученные гранулы активного ила отбирали фильтрованием через тканевый фильтр с размером пор 1 мм. Гранулы хранили в физиологическом растворе в соотношении 1:3. Температура хранения $4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Определение количества полисахаридов. Наличие полисахаридов в культуральной жидкости микроорганизмов определяли микроскопированием. Культуры микроорганизмов проверяли на способность к образованию капсул и наличие полисахаридов в качестве запасных веществ у выделенных микроорганизмов при дифференциально-диагностическом окрашивании культур [14].

Окраску капсул проводили по методу Гинса – Бурри. На тщательно обезжиренное с помощью ацетона предметное стекло наносили каплю фуксина Пфейфера, в котором ресуспендировали исследуемые клетки. Рядом помещали каплю отстоявшейся туши; две капли перемешивали петлей, а затем ребром одного стекла проводили по поверхности другого; высушивали мазок на воздухе; микроскопировали с иммерсией. В результате наблюдали неокрашенные капсулы вокруг окрашенных в розовый цвет клеток (ореолы вокруг клеток).

Для выявления в клетках микроорганизмов резервных полисахаридов (гранулезы или гликогена) на предметном стекле готовили каплю клеточной суспензии, к которой добавляли каплю раствора Люголя и 0,1 н HCl; препарат накрывали покровным стеклом и микроскопировали. Гранулы гранулезы в присутствии йода окрашивались в синий цвет, а гликогена – в красновато-коричневый.

Количественное содержание полисахаридов в культуральных жидкостях микроорганизмов определяли методом экстракции. Культуру в стационарной фазе роста использовали для инокуляции питательного бульона в колбах Эрленмейера объемом 250 мл (общий объем среды 50 мл). Количество инокулята составляло 2 мл от общего объема среды. Посевы инкубировали на шейкере Environmental Shaker-Incubator ES-20 при рабочей частоте 180 мин⁻¹ при температуре 30 ± 1 °С в течение 48 ч.

Биомассу бактерий отделяли центрифугированием при 5000 об/мин в течение 25 мин. Супернатант сливали и охлаждали до 4 ± 1 °С для дальнейшего выделения полисахаридов. Осаждение полисахаридов из супернатанта проводили этиловым спиртом в соотношении 1:3 трехкратно при температуре 4 ± 1 °С. Осадок отделяли центрифугированием при 5000 об/мин в течение 25 мин [15, 16].

Осажденные полисахариды растворяли в дистиллированной воде и проводили диализ против дистиллированной воды в течение 2 сут [17].

Определение общего количества полисахаридов проводили фенол-серноокислым методом [18]. Метод основан на реакции взаимодействия фенолов с продуктами окисления моносахаров, образующихся после разрушения полимерных молекул полисахаридов концентрированной серной кислотой.

Результаты и обсуждение. В предыдущих исследованиях нами было установлено, что наиболее выраженной способностью к гранулированию характеризуется активный ил очистных сооружений молочного производства. При инкубировании иловой смеси в отъемно-доливном режиме на протяжении месяца сформировались гранулы диаметром 2–3 мм [19].

На основании этого для выделения микроорганизмов и оценки их способности к агрегации использовали активный ил очистных сооружений молочного производства. Для выделенных микроорганизмов фиксировалась способность агрегироваться в виде биопленок (рис. 1, *а*), хлопков (рис. 1, *б*) либо отсутствие способности к образованию агрегатов (рис. 1, *в*).

Из общего количества выделенных микроорганизмов (41 изолят) отобрали 21 культуру бактерий, способных к образованию агрегатов. Изучение влияния культуральной жидкости бактерий

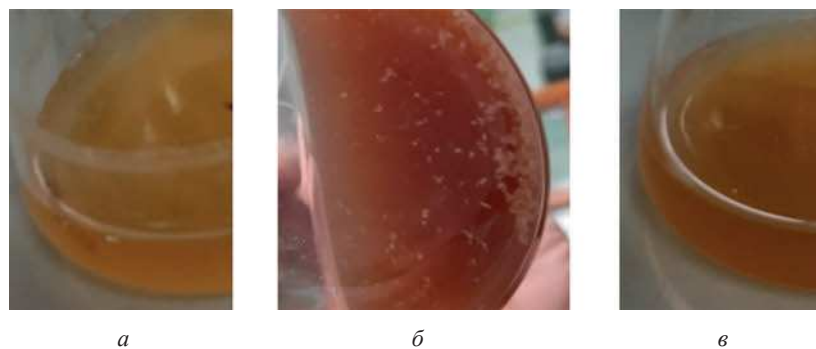


Рис. 1. Способность культур микроорганизмов к образованию агрегатов:
а – образование биопленки; *б* – образование хлопков; *в* – отсутствие агрегации

на стимуляцию процесса гранулирования активного ила в аэробных условиях проводили с использованием четырех изолятов, которые проявили наиболее выраженную способность к образованию агрегатов: М4 (плотные хлопья округлой формы), М14 (био пленка шириной кольца до 1 см), М23 и М32 (био пленка шириной кольца до 0,5 см).

Установлено, что при инкубировании иловых смесей, в которые внесена культуральная жидкость бактерий в количестве 10, 20 и 30 об. % от исходного объема активного ила, наблюдается существенный прирост биомассы (исходный объем активного ила возрастал в 2,0–2,5 раза), что не способствует гранулированию. Седиментационная способность такого ила резко ухудшалась, объем ила при второй подпитке (через 17 сут инкубирования) составлял 80 ± 2 мл. Пробы иловой смеси, в которые добавляли культуральную жидкость в дозах 10, 20 и 30 об. % от объема исходного ила, изъяли из эксперимента.

В дальнейших исследованиях участвовали пробы, в которых доза культуральной жидкости составляла 5 и 1 об. % от объема исходного активного ила. В ходе инкубирования данных иловых смесей при подпитке через каждые 10 сут отмечали существенное улучшение седиментационной способности, причем существенных отличий в динамике осаждения проб, в которые добавлена культуральная жидкость в количестве 1 об. % (рис. 2, 3) и 5 об. %, не выявлено.

Как видно из рис. 2, б, и 3, б, при второй подпитке уже к третьей минуте отстаивания объем активного ила резко уменьшается, приближаясь к конечному значению. Стоит отметить, что в контрольных пробах активный ил также хорошо уплотнялся. Однако в пробах с добавлением культуральных жидкостей бактерий М4, М14, М23 и М32 уже на 14-е сутки инкубирования отмечено образование первых гранул, в то время как в контрольных пробах гранулы не образовались. При второй подпитке полученные гранулы отбирали, а оставшийся ил подпитывали и продолжали инкубирование.

При третьей подпитке (рис. 2, в, и 3, в) активный ил оседал в течение 2 мин, что связано с наличием большого количества гранул. Контрольные пробы также показали улучшение седиментационных свойств, однако гранул к 27-м суткам так и не обнаружили.

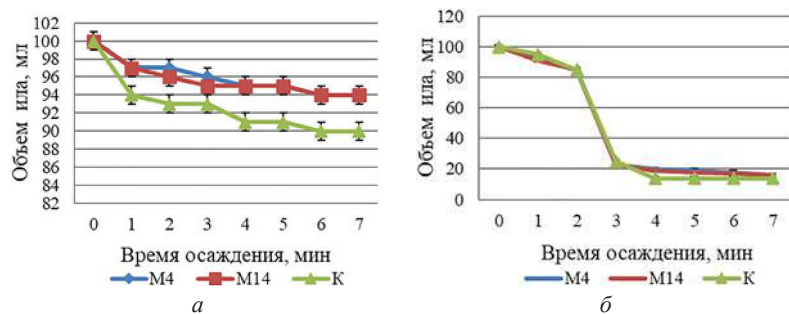


Рис. 2. Динамика осаждения во время подпиток активного ила, инкубируемого с добавлением 1 об. % культуральных жидкостей изолятов М4 и М14: а – первая подпитка (7 сут); б – вторая подпитка (17 сут); в – третья подпитка (27 сут)

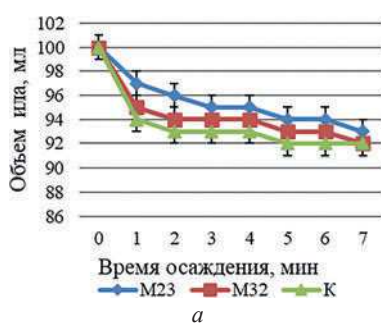
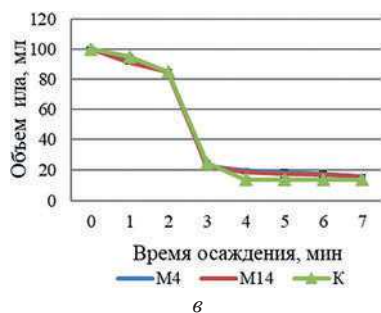
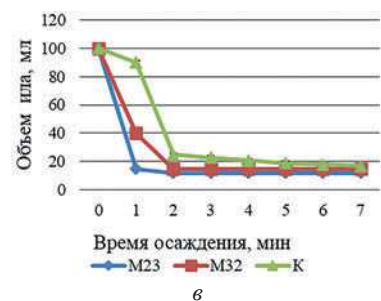


Рис. 3. Динамика осаждения во время подпиток активного ила, инкубируемого с добавлением 1 об. % культуральных жидкостей изолятов М23 и М32: а – первая подпитка (7 сут); б – вторая подпитка (17 сут); в – третья подпитка (27 сут)



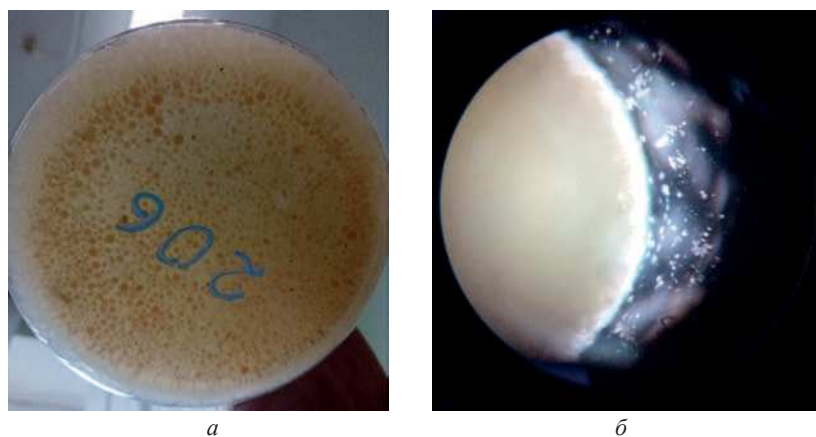


Рис. 4. Гранулы ила, полученные при инкубировании иловой смеси с добавлением культуральной жидкости М4:
a – гранулы ила в колбе; *б* – край гранулы ила при микроскопировании $\times 40$

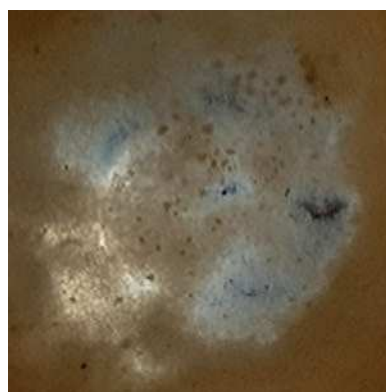


Рис. 5. Гранулы ила, полученные при инкубировании иловой смеси с добавлением культуральной жидкости М32

Стоит отметить, что в пробах с добавлением культуральной жидкости бактерий М4 и М14 в количестве 1 об. % от объема исходного ила гранулы образовывались крупные (диаметром 2,0–2,5 мм), имели правильную округлую форму (рис. 4).

В пробах же с добавлением культуральной жидкости бактерий М23 и М32 в количестве 1 и 5 об. % от объема исходного ила размер гранул колебался в пределах от 0,7 до 1,5 мм (рис. 5). Гранулированию подвергалось не более 10 % активного ила.

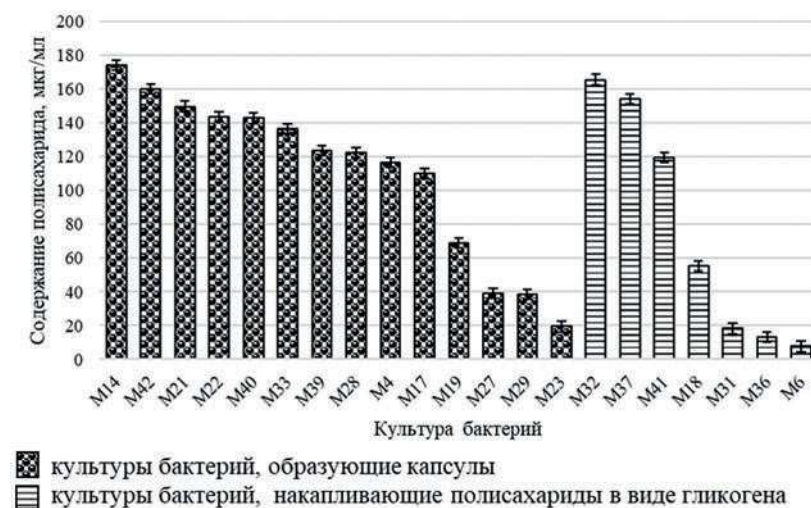


Рис. 6. Содержание полисахаридов в культуральной жидкости бактерий

Способность микроорганизмов к формированию различных агрегатов связывают с наличием полисахаридов [2, 6, 11–13]. Для выделенных культур определили количественное содержание полисахаридов (рис. 6) и проверили место их локализации (капсулы либо запасные вещества). Дифференциально-диагностическое окрашивание позволило установить, что полисахариды в клетках микроорганизмов находились в виде гликогена.

Среди отобранных бактерий, обнаруживших способность к агрегированию, отмечено высокое содержание полисахаридов в культуральной жидкости бактерий M14 (174,1 мкг/мл) и M32 (165,5 мкг/мл), причем в первом случае бактерии способны к образованию капсул, а во втором – запасают полисахариды в виде резервного вещества гликогена. Изоляты M4 и M23 капсулы образуют, но полисахаридов синтезируют меньше: 116,3 и 19,4 мкг/мл соответственно.

Заключение. Изучена стимуляция гранулирования активного ила при инкубировании в отъемно-доливном режиме в условиях аэрации с помощью способных к агрегированию микроорганизмов, выделенных из активного ила очистных сооружений молочного производства.

Показано, что добавление культуральной жидкости бактерий в количестве 10, 20 и 30 об. % от объема исходного активного ила нецелесообразно, так как способствует увеличению прироста активного ила и ухудшению его седиментационной способности.

При инкубировании иловой смеси с добавлением культуральной жидкости выделенных бактерий в количестве 5 и 1 об. % от объема исходного ила формирование первых гранул зафиксировано через 14 сут, в то время как в контрольных пробах (без добавления культуральной жидкости) продолжительность гранулирования составляла около 10 недель [20].

Количество и размер гранул различны: при использовании культуральной жидкости бактерий М14 и М4 гранулировалась практически вся иловая масса, диаметр гранул составлял 2,0–2,5 мм. В пробах с добавлением культуральной жидкости бактерий М32 и М23 отмечено малое количество гранул, их размер колебался от 0,7 до 1,5 мм.

Для всех выделенных бактерий, способных к агрегированию (21 изолят), определено содержание полисахаридов в культуральной жидкости. Однако нет четкой корреляции между содержанием полисахаридов, местом их локализации и образованием гранул.

Полученные предложенным методом гранулы ила имеют стабильную структуру, сохранность целостности гранул проверена в течение года [21].

Литература

1. Multistability and reversibility of aerobic granular sludge microbial communities up on changes from simple to complex synthetic waste water and back / A. Adler [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 1–20.
2. Жмур, Н. С. Технологические и биохимические процессы очистки сточных вод на сооружениях с аэротенками / Н. С. Жмур. – М. : АКВАРОС, 2003. – 512 с.
3. Bindhu, B. K. Aerobic granulation – an economically viable option for the treatment of wastewater / B. K. Bindhu, G. Madhu // *Int. J. Innov. Res. Sci. Eng. Technol.* – 2013. – Vol. 2. – P. 41–46.
4. Исследование грануляции активного ила при воздействии агентов стресса в отъемно-доливном процессе аэробной биологической очистки /

Н. С. Хохлачев [и др.] // Изв. Самар. науч. центра Рос. акад. наук. – 2012. – Т. 4, № 5 (3). – С. 853–856.

5. Stability of aerobic granules during long-term bioreactor operation / R. D. G. Franca [et al.] // *Biotechnol. Adv.* – 2018. – Vol. 36. – P. 228–246.

6. The effects of shear force on the formation, structure and metabolism of aerobic granules / J.-H. Tay [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2001. – Vol. 57. – P. 227–233.

7. Bindhu, B. K. Influence of three selection pressures on aerobic granulation in sequencing batch reactor / B. K. Bindhu // *Indian Journal of Chemical Technology.* – 2016. – Vol. 22, is. 5. – P. 241–247.

8. An integrative review of granular sludge for the biological removal of nutrients and recalcitrant organic matter from wastewater / M.-K. H. Winkler [et al.] // *Chem. Eng.* – 2018. – Vol. 336. – P. 489–502.

9. Aerobic granulation technology / J.-H. Tay [et al.] // *Handbook of Environmental Engineering.* – 2009. – Vol. 9. – P. 109–128.

10. Method for culturing aerobic granular sludge for treating biological nutrients in municipal sewage : CN 101759289A, Китай C02F 3/12 / Li Xiaoming, Liao Dexiang, Luo Weinan, Xia Jingfen, Yang Guojing, Yang Qi ; № 20100630. – Publ. date 30.06.2010. – Yang Guojing, 2010. – 8 p.

11. Сироткин, А. С. Агрегация микроорганизмов: флоккулы, биопленки, микробные гранулы / А. С. Сироткин, Г. И. Шагинурова, К. Г. Ипполитов. – Казань : Изд-во «Фэн» АН РТ, 2007. – 160 с.

12. Z-form extracellular DNA is a structural component of the bacterial biofilm matrix / J. R. Buzzo [et al.] // *Cell.* – 2021. – Vol. 184, № 23. – P. 5740–5758.

13. Impact of metal ions on structural EPS hydrogels from aerobic granular sludge / S. Felz [et al.] // *Article Biofilm.* – 2020. – Vol. 2. – P. 1–7.

14. Белясова, Н. А. Микробиология. Лабораторный практикум : учеб. пособие / Н. А. Белясова – Минск : БГТУ, 2007. – 160 с.

15. Osama, K. Chemical modification of polysaccharides by the use of intramolecular associations in polar organic solvents / K. Osama, M. Kazumi, F. Takayuki // *Polymer Bull.* – 2009. – Vol. 65, № 5. – P. 443–454.

16. Arifkhodzhaev, A. O. Polysaccharides of saponin-bearing plants VII. Study of polysaccharides of the roots of *Allochrysa paniculata* / A. O. Arifkhodzhaev // *Chemistry of Natural Compounds.* – 1995. – Vol. 31, № 4. – P. 445–456.

17. Методы химии углеводов : пер. с англ. / А. Томпсон [и др.] ; под ред. Н. К. Кочеткова. – М. : Мир, 1967. – 912 с.

18. Захарова, И. Я. Методы изучения микробных полисахаридов / И. Я. Захарова, Л. В. Косенко. – Киев : Наук. думка, 1982. – 192 с.

19. Нестер, О. В. Гранулирование в условиях аэрации активного ила, сформированного на очистных сооружениях города и молочного производства / О. В. Нестер, Р. М. Маркевич // *Материалы IV Междунар. науч.-практ. конф. «Биотехнология: взгляд в будущее – 2018».* – Ставрополь : Изд-во СтГМУ, 2018. – С. 191–194.

20. Нестер, О. В. Формирование гранул активного ила в аэробных условиях / О. В. Нестер, Р. М. Маркевич // *Труды БГТУ.* – Минск, 2016. – № 4 (186). – С. 220–224.