

УДК 628.355.5

А. А. Масехнович, И. А. Гребенчикова, Р. М. Маркевич, М. В. Рымовская
Белорусский государственный технологический университет

ХАРАКТЕРИСТИКА НИТЧАТЫХ ФОРМ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ БИОЦЕНОЗОВ АКТИВНОГО ИЛА ОЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЙ

В настоящее время известно более тридцати разных видов бактерий, в той или иной степени вызывающих вспухание активного ила, однако большинство из них не имеют названий, а обла­дают номером, так как их характеристики еще не полностью изучены. Целью работы являлось изучение морфологических и физиолого-биохимических особенностей нитчатых форм микроорганизмов, выделенных из биоценоза активного ила очистных сооружений.

Получены чистые культуры двадцати восьми изолятов нитчатых форм микроорганизмов, вы­деленных из биоценозов городских очистных сооружений. Определены их морфологические и ряд физиолого-биохимических характеристик. Установлено, что большинство исследованных бакте­рий имеют палочковидную форму, грамположительны, способны образовывать эндоспоры, фор­мируют нитчатые структуры диаметром 1,2–2,3 мкм, заключенные в чехлы.

Выявлен спектр утилизируемых бактериями соединений углерода и азота. Определено, что предпочтительным субстратом для исследованных нитчатых микроорганизмов является углерод аминокислот, источниками азота выступают мочевины и аминокислоты. У большинства выделен­ных бактерий обнаружена каталазная активность, что свидетельствует об их устойчивости к не­благоприятным факторам среды, в том числе присутствию в среде токсикантов. Ряд микроорга­низмов демонстрировали оксидазную активность, являющуюся показателем высокой скорости окисления ими различных субстратов. Для хранения исследуемых нитчатых форм бактерий реко­мендуется использовать среду R2A.

Полученные данные послужат основой для идентификации нитчатых форм бактерий и выяв­ления их значимости в развитии нитчатого вспухания активного ила в биореакторах городских очистных сооружений.

Ключевые слова: сточные воды, активный ил, биоценоз, нитчатые формы микроорганизмов, изоляты бактерий, морфологические и биохимические характеристики.

Для цитирования: Масехнович А. А., Гребенчикова И. А., Маркевич Р. М., Рымовская М. В. Характеристика нитчатых форм микроорганизмов, выделенных из биоценозов активного ила очистных сооружений // Труды БГТУ. Сер. 2, Химические технологии, биотехнологии, геоэкология. 2024. № 2 (283). С. 167–175.

DOI: 10.52065/2520-2669-2024-283-19.

A. A. Masekhnovich, I. A. Grebenchikova, R. M. Markevich, M. V. Rymovskaya
Belarusian State Technological University

CHARACTERISTICS OF FILAMENTOUS FORMS OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM THE BIOCENOSIS OF ACTIVATED SLUDGE FROM WASTEWATER TREATMENT PLANTS

Currently, more than thirty different types of bacteria are known to cause bulking of activated sludge to one degree or another, but most of them do not have names, but have a number, since their charac­teristics have not yet been fully studied. The aim of the work was to study the morphological and physio­logical-biochemical features of filamentous forms of microorganisms isolated from the biocenosis of activated sludge from wastewater treatment plants.

Pure cultures of twenty-eight isolates of filamentous forms of microorganisms isolated from bioce­noses of urban wastewater treatment plants were obtained. Their morphological and a number of physio­logical and biochemical characteristics have been determined. It was found that most of the studied bacteria have a rod-shaped shape, are gram-positive, are capable of forming endospores, form filamen­tous structures with a diameter of 1.2–2.3 μm enclosed in cases.

The spectrum of carbon and nitrogen compounds utilized by bacteria has been revealed. It was de­termined that the preferred substrate for the studied filamentous microorganisms is the carbon of amino acids, the sources of nitrogen are urea and amino acids. Catalase activity was found in most of the isolated bacteria, which indicates their resistance to adverse environmental factors, including the presence of toxicants

in the environment. A number of microorganisms demonstrated oxidase activity, which is an indicator of the high rate of oxidation of various substrates by them. It is recommended to use R2A medium to store the studied filamentous forms of bacteria.

The data obtained will serve as a basis for the identification of filamentous forms of bacteria and to identify their significance in the development of filamentous bulking of activated sludge in bioreactors of urban wastewater treatment plants.

Keywords: wastewater, activated sludge, biocenosis, filamentous forms of microorganisms, bacterial isolates, morphological and biochemical characteristics.

For citation: Masekhnovich A. A., Grebenchikova I. A., Markevich R. M., Rymovskaya M. V. Characteristics of filamentous forms of microorganisms isolated from the biocenosis of activated sludge from wastewater treatment plants. *Proceedings of BSTU, issue 2, Chemical Engineering, Biotechnologies, Geoecology*, 2024, no. 2 (283), pp. 167–175 (In Russian).

DOI: 10.52065/2520-2669-2024-283-19.

Введение. Активный ил (АИ) представляет собой сложную экосистему, в состав которой входят организмы разных систематических групп. На каждом очистном сооружении формируется свой, особенный биоценоз, специфичность которого определяется составом и свойствами очищаемых сточных вод, а также условиями жизнеобеспечения, обусловленными конструкцией и технологическими режимами эксплуатации сооружений биологической очистки. В нормально функционирующем иле численность нитчатых бактерий невелика, однако в определенных условиях может достигать критических значений, вызывая нитчатое вспухание [1].

Известно более тридцати разных видов, преимущественно бактерий, в той или иной степени вызывающих вспухание активного ила. Большинство из них не имеют названий, а обладают номером, так как их характеристики еще не полностью изучены. Из этих тридцати видов около десяти часто вызывают эксплуатационные проблемы на очистных сооружениях, в то время как другие двадцать редко наблюдаются в активном иле [2]. Наиболее часто причиной вспухания являются бактерии *Sphaerotilus natans*, *Microthrix parvicella*, *Halicomenobacter hydrossis*, Тип 021N.

Для правильной диагностики причин вспухания ила необходимо определить систематическую принадлежность вызвавших его микроорганизмов. Поэтому выделение нитчатых форм бактерий и изучение их свойств представляется важной эколого-технической задачей.

Целью работы являлось изучение характеристик нитчатых форм микроорганизмов, выделенных из биоценоза активного ила очистных сооружений. Для достижения поставленной цели были получены чистые культуры нитчатых форм микроорганизмов, исследованы морфологические и физиолого-биохимические особенности выделенных изолятов, установлены условия их хранения.

Основная часть. Объектами исследования служили нитчатые формы микроорганизмов

биоценозов Минской очистной станции (МОС) производства Минскочиствод УП «Минскводоканал».

Своеобразие биоценозов активного ила очистных сооружений, в составе которых функционирует множество организмов, сходных по типу питания, условиям культивирования и т. д., не позволяет создать селективные условия для выделения нитчатых бактерий. В связи с этим для получения чистых культур нитчатых бактерий в данной работе руководствовались специальными методиками.

По той же причине для выделения нитчатых форм бактерий использовали различные по составу плотные питательные среды: R2A [3], TYG (tryptone yeast extract glucose) [4], SCY (sucrose casitone yeast extract) [5], I [5], *Sphaerotilus* [6], *Sphaerotilus modified* [6], *Sphaerotilus-Leptothrix* [7], *Halicomenobacter medium* (DSMZ medium 134), а также полусинтетическую среду (CCB), разработанную на основе среднегодового состава сточных вод, поступающих на МОС.

Изолированные колонии микроорганизмов получали, производя посев неразведенных иловых суспензий методом Коха на три чашки Петри, а также методом истощающего штриха [8]. Для повышения эффективности отделения нитей бактерий от клеток других микроорганизмов использовали также метод предварительного изолирования нитчатых структур с помощью микрокапилляра или микробиологической петли [9]. Предметное стекло с каплей иловой суспензии, не накрытой покровным стеклом, помещали на предметный столик микроскопа и устанавливали наличие нитчатых структур при увеличении $\times 100$. При их обнаружении микрокапилляром либо микробиологической петлей извлекали часть жидкости с нитчатыми формами микроорганизмов, переносили в каплю стерильной дистиллированной воды, размещенную на том же предметном стекле, ресуспендировали и снова отбирали микрообъем, содержащий нити бактерий. Манипуляции проводили до тех пор, пока количество

посторонних микроорганизмов в капле с нитчатыми формами бактерий не снижалось до минимума. Далее каплю переносили в жидкую питательную среду или производили посев методом истощающего штриха на твердую. Культивировали при температуре 20–25°C.

Затем чашки с полученными на твердых средах посевами микроорганизмов устанавливали на предметный столик микроскопа и при увеличении ($\times 100$) просматривали отдельные изолированные колонии. Выбирали колонии, структура которых была схожа с нитчатой. Не снимая чашки с предметного столика, под микроскопом тонкой бактериологической петлей отбирали небольшое количество биомассы из отдельно расположенной колонии, стараясь не зацепить колонии других микроорганизмов. Полученный образец вносили в жидкие питательные среды или осуществляли посев методом истощающего штриха на плотные. Пересевы производили не менее трех раз, при этом каждый раз путем микроскопирования проверяли наличие нитчатых структур.

В результате проделанной работы были получены чистые культуры нитчатых форм микроорганизмов двадцати восьми различных изолятов, которым присвоены условные обозначения M0, M2, M3, M4, M5, M7, M9, M10, M11, M13, M17, M21, M22, M23, M24, M25, M26, M27, M28, M31, M41, M42, M43, M46, M47, M48, M50, M71.

Микрофотографии бактериальных изолятов с наиболее развитой нитчатой структурой представлены на рисунке.

С целью идентификации микроорганизмов изучали их морфологические и культуральные характеристики, способность утилизировать различные источники углерода и азота, а также выявляли их оксидазную и каталазную активности [10].

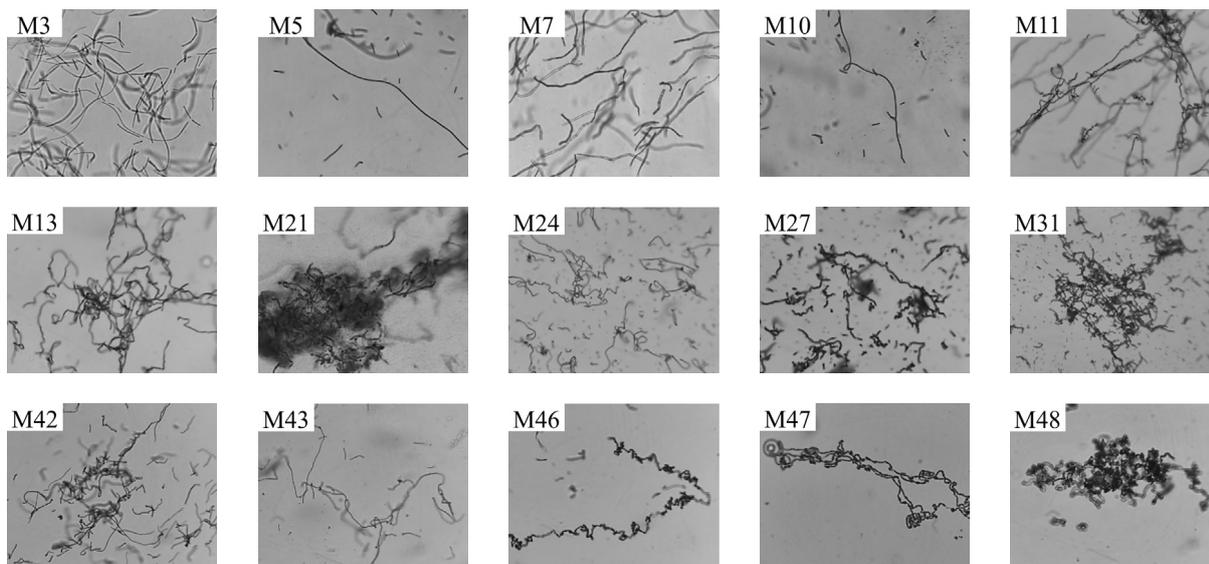
Морфологические признаки микроорганизмов изучали с использованием светового биологического микроскопа BYLAN [9].

Окрашивание по Граму, определение эндоспор, капсул и чехлов производили по стандартным методикам [11]. Препараты просматривали при увеличении $\times 400$, $\times 1000$. Грам-принадлежность бактерий дополнительно устанавливали экспресс-тестом по Крегенсену [12].

Измерение размеров нитчатых микроорганизмов выполняли с помощью окуляр-микрометра по масштабной линейке объект-микрометра [9].

Для определения способности бактерий утилизировать различные источники углерода применяли метод реплик [13]. В чашку-матрицу рассеивали пятнами исследуемые микроорганизмы, инкубировали в течение 2 сут при температуре 25°C. Матрицу реплицировали на синтетическую питательную среду, где в качестве единственного источника углерода присутствовали фруктоза, сахароза, ксилоза, арабиноза, галактоза, мальтоза, лактоза, цитрат натрия, ацетат натрия и глюкоза. Концентрация источников углерода в средах составляла 100 мг/дм³. Контролем служила среда ССВ. По причине возможной ауксотрофности изучаемых бактерий одновременно проводили идентичный эксперимент, однако в среды добавляли дрожжевой экстракт как источник факторов роста до конечной концентрации 0,0015%.

Кроме того, проверяли способность бактерий утилизировать углерод аминокислот, входящих в состав дрожжевого экстракта (ДЭ). В последнем случае другие источники углерода в среду не вносили, концентрация ДЭ в среде составляла 0,15%.



Микрофотографии нитчатых форм бактерий, выделенных из биоценозов активного ила Минской очистной станции производства Минсочиствод УП «Минскводоканал»

Для изучения способности нитчатых бактерий утилизировать различные источники азота на среды, содержащие KNO_3 , $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, NH_4Cl , высевали бактерии методом реплик. В качестве контроля использовали среду ССВ с добавлением ДЭ до конечной концентрации в среде 0,0015%. Инкубировали в течение 2 сут при температуре 30°C. По наличию и интенсивности роста определяли способность микроорганизмов утилизировать различные источники азота.

Каталазную активность определяли согласно стандартным методикам [14]. Для этого культуру снимали с поверхности агаризованной среды неметаллическим инструментом и ресуспендировали в капле 3%-ной перекиси водорода на предметном стекле. При наличии каталазы происходило разложение перекиси водорода с выделением пузырьков кислорода.

Устанавливали оксидазную активность с помощью тест-полосок Microbiologia Bactident Oxidasa (Германия). Положительной реакцией считалось окрашивание колоний в фиолетово-синий цвет в течение 10–30 с после нанесения образца на тест-полоску.

Морфологические характеристики выделенных изолятов представлены в табл. 1.

При изучении морфологических особенностей двадцати восьми выделенных изолятов было установлено, что:

- большинство выделенных микроорганизмов относятся к грамположительным; девять выделенных изолятов являются грамвариабельными (M0, M7, M27, M41, M42, M43, M46, M47, M71), три – грамотрицательными (M23, M24, M50);

- из двадцати восьми изолятов только M7 формирует капсулы;

- чехлы способны образовывать большинство выделенных изолятов, за исключением M11, M13, M21, M28, M43, M48, M50, M71;

- все выделенные нитчатые бактерии, кроме M0, способны образовывать эндоспоры;

- большинство клеток выделенных изолятов имеют палочковидную форму, за исключением M23, M25, у которых сферическая форма клеток;

- средний диаметр бактериальных нитей составляет 1,2–2,3 мкм.

Результаты эксперимента по установлению способности бактерий утилизировать различные источники углерода в средах без добавления ДЭ и в средах с добавлением ДЭ в качестве источников факторов роста приведены в табл. 2.

Таблица 1

Морфологические характеристики изолятов нитчатых бактерий, выделенных из биоценозов активного ила очистных сооружений

Изолят	Грам-принадлежность		Наличие капсул	Наличие чехлов	Наличие эндоспор	Форма клеток	Средний размер клеток, мкм	Средний диаметр нитей, мкм
	Окрашивание	Экспресс-тест						
M0	–	+	–	+	–	п	2,9×1,2	1,3
M2	+	+	–	+	+	п	3,2×1,0	1,2
M3	+	+	–	+	+	п	4,2×1,5	1,7
M4	+	+	–	+	+	п	3,0×1,3	1,6
M5	+	+	–	+	+	п	3,4×1,2	1,7
M7	+/-	+	+	+	+	п	3,3×1,3	1,7
M9	+	+	–	+	+	п	3,3×1,4	1,5
M10	+	+	–	+	+	п	2,9×1,3	1,5
M11	+	+	–	–	+	п	2,6×1,0	1,3
M13	+	+	–	–	+	п	3,3×1,3	1,3
M17	+	+	–	+	+	п	2,3×0,9	1,6
M21	+	+	–	–	+	п	2,7×1,0	1,8
M22	+	+	–	+	+	п	2,5×1,1	1,8
M23	+	–	–	+	+	сф	1,3×1,3	1,8
M24	+	–	–	+	+	п	3,4×1,2	1,5
M25	+	+	–	+	+	сф	1,2×1,0	2,0
M26	+	+	–	+	+	п	2,0×1,0	1,8
M27	+/-	+	–	+	+	п	3,0×1,9	2,3
M28	+	+	–	–	+	п	1,9×1,0	1,7
M31	+	+	–	+	+	п	3,0×1,4	1,6
M41	+/-	+	–	+	+	п	4,9×1,5	1,5
M42	+/-	+	–	+	+	п	3,3×1,1	1,2
M43	+/-	+	–	–	+	п	3,4×1,2	1,4
M46	+/-	+	–	+	+	п	3,1×1,2	1,2
M47	+/-	+	–	+	+	п	2,8×1,1	1,2
M48	+	+	–	–	+	п	3,1×1,2	1,4
M50	+/-	–	–	–	+	п	2,8×1,1	1,2
M71	+/-	+	–	–	+	п	3,0×1,1	1,5

Примечание. п – палочковидная форма клеток; сф – сферическая форма клеток.

Таблица 2

Способность нитчатых бактерий утилизировать различные источники углерода

Изолят	Присутствие ДЭ как источника факторов роста (0,0015%)	Наличие роста бактерий на средах, содержащих в качестве источника углерода											контроль	ДЭ 0,15%
		цитрат натрия	ацетат натрия	арабинозу	галактозу	кепозу	лактозу	мальтозу	сахарозу	фруктозу	глюкозу			
M0	без ДЭ	++	++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++	+++
	с ДЭ	+++	++	+++	++	++	++	++	++	++	+++	+++		
M2	без ДЭ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	с ДЭ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
M3	без ДЭ	++	+	+	++	-	+	+	-	+	+	+++	+++	
	с ДЭ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
M4	без ДЭ	++	++	+++	++	++	++	++	++	++	+	+++	+++	
	с ДЭ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
M5	без ДЭ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	
	с ДЭ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
M7	без ДЭ	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	с ДЭ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
M9	без ДЭ	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	
	с ДЭ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
M10	без ДЭ	++	+++	++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	
	с ДЭ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
M11	без ДЭ	++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	с ДЭ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
M13	без ДЭ	+++	++	++	+++	-	+++	-	+	+++	++	+++	+++	
	с ДЭ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
M17	без ДЭ	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	с ДЭ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
M21	без ДЭ	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+++	++	
	с ДЭ	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-			
M22	без ДЭ	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	++	+	
	с ДЭ	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+			
M23	без ДЭ	++	+++	+	++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	
	с ДЭ	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++			
M24	без ДЭ	+	-	+	+	+	+	+	+	+++	+	+++	+++	
	с ДЭ	++	++	+	+++	++	++	+	+	+++	+++			
M25	без ДЭ	++	++	++	++	+++	++	++	+++	++	+++	+++	+++	
	с ДЭ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++			
M26	без ДЭ	+++	++	+	+	+	+	+	+	++	+	+++	+++	
	с ДЭ	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++			
M27	без ДЭ	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	
	с ДЭ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
M28	без ДЭ	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	++	+++	+++	+++	
	с ДЭ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
M31	без ДЭ	+++	++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+++	+++	+++	
	с ДЭ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
M41	без ДЭ	+	+++	+	+	++	+	+	+++	+	-	+++	+++	
	с ДЭ	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	++	-	+			
M42	без ДЭ	+	+++	-	-	+++	-	+	+++	++	+++	+++	+++	
	с ДЭ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
M43	без ДЭ	+	+++	+	+	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	
	с ДЭ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
M46	без ДЭ	+	+++	+	+	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	
	с ДЭ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
M47	без ДЭ	+	-	+	+	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	
	с ДЭ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
M48	без ДЭ	+	+++	+	+	++	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	
	с ДЭ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
M50	без ДЭ	+	+++	+	+	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	
	с ДЭ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
M71	без ДЭ	+	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	-	+++	+++	
	с ДЭ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			

Примечание. «-» – рост бактерий не наблюдался; «+» – слабый рост; «++» – средний рост; «+++» – сильный бактериальный рост.

Установлено, что значительное количество изолятов демонстрируют более интенсивный рост на средах с добавлением ДЭ, что говорит об их способности утилизировать аминокислоты в качестве источника углерода наряду с углеводами и органическими кислотами.

Почти все выделенные изоляты бактерий усваивают углерод в составе большинства исследованных соединений примерно в равной степени, однако есть исключения.

Бактерии изолятов М3 практически не утилизуют другие источники углерода, кроме аминокислот в составе ДЭ.

Представители изолятов М4 и М5 слабо утилизуют глюкозу в сравнении с другими источниками углерода, а М13 не потребляют ксилозу, мальтозу, слабо утилизуют сахарозу; бактерии изолята М17 слабо утилизуют углерод в составе солей уксусной кислоты; бактерии изолятов М21, М22 отличаются слабым ростом или его отсутствием на всех средах, кроме контрольной, содержащей глюкозу и ДЭ в высокой концентрации; представители изолята М24 слабо утилизуют практически все источники углерода, кроме фруктозы; бактерии изолята М23 слабо ути-

лизуют арабинозу; М28 – сахарозу; М24 – практически все источники углерода, кроме фруктозы.

Бактерии изолятов М41, М42, М43, М46, М47, М48, М71 обладают сходными свойствами и плохо потребляют (либо не усваивают) цитрат, арабинозу, галактозу, лактозу, мальтозу, предпочитая углерод аминокислот.

Показано, что, несмотря на различные предпочтения, подавляющее большинство исследованных бактерий наиболее успешно потребляют аминокислоты, но значительно различаются по отношению к другим источникам углерода.

Результаты эксперимента по исследованию способности нитчатых бактерий утилизировать различные источники азота сведены в табл. 3.

Показано, что наиболее успешно утилизируется азот в составе мочевины и дрожжевого экстракта. 14 изолятов не утилизуют либо слабо усваивают азот в составе солей аммония и нитратов (М3–М7, М21, М28, М31), однако лучше развиваются при внесении в среды ДЭ в качестве источника факторов роста, а наиболее эффективно – на контрольной среде с высокой концентрацией ДЭ, что позволяет сделать вывод об утилизации ими азота в составе органических соединений.

Таблица 3

Способность нитчатых бактерий утилизировать различные источники азота

Изолят	Наличие роста бактерий на средах, содержащих в качестве источника азота						Контроль
	NH ₄ Cl	KNO ₃	(NH ₂) ₂ CO	NH ₄ Cl	KNO ₃	(NH ₂) ₂ CO	
	без добавления ДЭ			с добавлением ДЭ (0,0015%)			
М0	+++	++	++	++	++	++	+++
М2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
М3	+	+	+++	+	+	+++	+++
М4	+	+	+++	+	+	+++	+++
М5	+	++	+++	++	+	+++	+++
М7	+	+	+++	–	+++	+++	+++
М9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
М10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
М11	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
М13	+	+++	+++	+	+++	+++	+++
М17	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
М21	–	–	+	+	++	+	+++
М22	–	–	+	+	+	++	+++
М23	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
М24	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
М25	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
М26	+	++	+++	+	+++	+++	+++
М27	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
М28	–	–	+++	++	+	+++	+++
М31	–	–	+	++	++	+++	+++
М41	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
М42	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
М43	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
М46	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
М47	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
М48	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
М50	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
М71	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Примечание. «–» – отсутствие роста; «+» – слабый рост; «++» – средний рост; «+++» – сильный рост.

Способность микроорганизмов деградировать органические соединения сточных вод определяется наличием и активностью ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции в клетке. Среди них важную роль играют оксидазы и каталазы.

По результатам эксперимента оксидазная активность выявлена лишь у пяти изолятов: М7, М13, М17, М24, М31. Большинство изолятов показывают каталазную активность, кроме М3, М21, М22.

Для установления наиболее приемлемого способа хранения полученных изолятов нитчатых бактерий применяли субкультивирование (метод пересеваемых культур) и хранение под слоем минерального масла [15].

Для субкультивирования была выбрана плотная среда R2A, рекомендуемая для нитчатых форм микроорганизмов, согласно [16]. Кроме того, показано, что изоляты, полученные на различных по составу средах, успешно растут в том числе и на натуральной, но малопитательной среде R2A. Чашки с посевами хранили в бытовом холодильнике при температуре 5–8°C для снижения эффективности метаболизма микроорганизмов.

В ходе работы подтверждена пригодность среды R2A для хранения исследуемых нитчатых форм бактерий методом субкультивирования. Установлено, что для успешной сохранности культур пересевы необходимо осуществлять не реже одного раза в месяц.

Для хранения под слоем минерального масла столбики с полужидкими средами R2A и ССВ засеивали культурами и после ее нарастания заливали слоем стерильного вазелинового масла высотой примерно 2 см. Покрытые маслом культуры хранили в вертикальном положении в бытовом холодильнике. Для проверки сохранности культур периодически (раз в квартал) определяли их жизнеспособность путем посева на плотные среды того же состава. Показано, что под слоем минерального масла выделенные нитчатые формы микроорганизмов успешно выживают в течение не менее чем 12 месяцев.

Заключение. Получены чистые культуры двадцати восьми изолятов нитчатых форм микроорганизмов, выделенных из биоценозов Минской очистной станции производства Минского очистного УП «Минскводоканал», определены их

морфологические и физиолого-биохимические характеристики.

Установлено, что большинство исследованных бактерий имеют палочковидную форму, за исключением М23, М25, у которых сферическая форма клеток; относятся к грамположительным или грам-вариабельным и только три изолята – к грамотрицательным; способны образовывать эндоспоры, кроме изолята М0. Выделенные микроорганизмы формируют нитчатые структуры диаметром 1,2–2,3 мкм, зачастую заключенные в чехлы, за исключением М11, М13, М21, М28, М43, М48, М50, М71, и иногда в капсулы (М7).

Определен спектр утилизируемых бактериями соединений углерода и азота. Установлено, что предпочтительным субстратом для подавляющего большинства исследованных нитчатых форм является углерод аминокислот, по отношению же к другим источникам углерода наблюдаются значительные различия.

Наиболее успешно микроорганизмы утилизируют азот в составе мочевины и аминокислот, хуже – в составе солей аммония и нитратов. Для четырех изолятов отмечена способность усваивать азот только в составе органических соединений.

Широкий круг утилизируемых бактериями соединений, характерных для городских сточных вод, позволяет исследованным нитчатым формам успешно развиваться в биореакторах очистных сооружений.

Наличие у большинства выделенных бактерий каталазной активности свидетельствует об их устойчивости к неблагоприятным факторам среды, в том числе присутствию в среде токсикантов. Оксидазная активность, обнаруженная у ряда микроорганизмов, является показателем высокой скорости окисления ими различных субстратов.

Была подтверждена пригодность среды R2A для краткосрочного (субкультивирование) и долгосрочного (под слоем минерального масла) хранения исследуемых нитчатых форм бактерий.

Полученные данные послужат основой для дальнейшей идентификации нитчатых форм бактерий, выявления их роли в развитии нитчатого вспухания активного ила и установления способов подавления развития данных микроорганизмов в биореакторах городских очистных сооружений.

Список литературы

1. Маркевич Р. М., Гребенчикова И. А., Рымовская М. В. Биотехнологическая переработка промышленных отходов. Минск: БГТУ, 2018. 300 с.
2. Использование микроскопирования для оценки экологически значимых характеристик различных микробиоценозов / В. А. Юрченко [и др.] // Вестник ХНАДУ. 2008. № 43. С. 92–97.
3. Reasoner D. J., Geldreich E. E. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water // Applied and Environmental Microbiology. 1985. Vol. 49, no. 1. P. 1–7. DOI: 10.1128/aem.49.1.1-7.1985.

4. *Nocardia pinensis* sp. nov., an actinomycete found in activated sludge foams in Australia / L. L. Blackall [et al.] // *The Journal of General Microbiology*. 1989. Vol. 135, no. 6. P. 1547–1558. DOI: 10.1099/00221287-135-6-1547.
5. Eikelboom D. H. Filamentous organisms observed in activated sludge // *Water Research*. 1975. Vol. 9, no. 4. P. 365–388. DOI: 10.1016/0043-1354(75)90182-7.
6. Stokes J. L. Studies on the filamentous sheathed iron bacterium *Sphaerotilus natans* // *Journal of Bacteriology*. 1954. Vol. 67, no. 3. P. 278–291. DOI: 10.1128/jb.67.3.278-291.1954.
7. Siering P. L., Ghiorse W. C. Phylogeny of the Sphaerotilus-Leptothrix group inferred from morphological comparisons, genomic fingerprinting, and 16S ribosomal DNA sequence analyses // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1996. Vol. 46, no. 1. P. 173–182. DOI: 10.1099/00207713-46-1-173.
8. Кузнецова Е. А. Микробиология. Орел: ОрелГТУ, 2005. 188 с.
9. Белясова Н. А. Микробиология. Лабораторный практикум. Минск: БГТУ, 2007. 160 с.
10. Чубенко Г. И. Методы идентификации бактерий. Благовещенск: ФГБОУ ВО Амурская ГМА, 2018. 44 с.
11. Лабораторный практикум по микробиологии / Е. Р. Грицкевич [и др.]. Минск: ИВЦ Минфина, 2017. 113 с.
12. Микробиология. Рабочая тетрадь для лабораторно-практических занятий / И. Б. Ившина [и др.]. Пермь: ПГНИУ, 2022. 100 с.
13. Концевая И. И. Микробиология: культивирование и рост бактерий. Чернигов: Изд-во «Десна Полиграф», 2017. 44 с.
14. Красникова Л. В., Гунькова П. И. Общая и пищевая микробиология. СПб.: Университет ИТМО, 2016. 134 с.
15. Белясова Н. А. Микробиология. Минск: БГТУ, 2005. 292 с.
16. Kämpfer P. Detection and cultivation of filamentous bacteria from activated sludge // *FEMS Microbiology Ecology*. 1997. Vol. 23, no. 3. P. 169–181. DOI: 10.1111/j.1574-6941.1997.tb00400.x.

References

1. Markevich R. M., Grebenchikova I. A., Rymovskaya M. V. *Biotekhnologicheskaya pererabotka promyshlennykh otkhodov* [Biotechnological processing of industrial waste]. Minsk, BGTU Publ., 2018. 300 p. (In Russian).
2. Yurchenko V. A., Dyagovets Ya. S., Khromenkova E. S., Ostapova A. S. Using microscopy to assess the ecologically significant characteristics of various microbiocenoses. *Vestnik KhNADU* [Bulletin of the Kharkiv National Automobile and Road University], 2008, no. 43, pp. 92–97 (In Russian).
3. Reasoner D. J., Geldreich E. E. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, vol. 49, no. 1, pp. 1–7. DOI: 10.1128/aem.49.1.1-7.1985.
4. Blackall L. L., Parlett J. H., Hayward A. C., Minnikin D. E., Greenfield P. F., Harbers A. E. *Nocardia pinensis* sp. nov., an actinomycete found in activated sludge foams in Australia. *The Journal of General Microbiology*, 1989, vol. 135, no. 6, pp. 1547–1558. DOI: 10.1099/00221287-135-6-1547.
5. Eikelboom D. H. Filamentous organisms observed in activated sludge. *Water Research*, 1975, vol. 9, no. 4, pp. 365–388. DOI: 10.1016/0043-1354(75)90182-7.
6. Stokes J. L. Studies on the filamentous sheathed iron bacterium *Sphaerotilus natans*. *Journal of Bacteriology*, 1954, vol. 67, no. 3, pp. 278–291. DOI: 10.1128/jb.67.3.278-291.1954.
7. Siering P. L., Ghiorse W. C. Phylogeny of the Sphaerotilus-Leptothrix group inferred from morphological comparisons, genomic fingerprinting, and 16S ribosomal DNA sequence analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1996, vol. 46, no. 1, pp. 173–182. DOI: 10.1099/00207713-46-1-173.
8. Kuznetsova E. A. *Mikrobiologiya* [Microbiology]. Orel, OrelGTU Publ., 2005. 188 p. (In Russian).
9. Belyasova N. A. *Mikrobiologiya. Laboratornyy praktikum* [Microbiology. Laboratory workshop]. Minsk, BGTU Publ., 2007. 160 p. (In Russian).
10. Chubenko G. I. *Metody identifikatsii bakteriy* [Methods of identification of bacteria]. Blagoveshchensk, FGBOU VO Amurskaya GMA Publ., 2018. 44 p. (In Russian).
11. Gritskevich E. R., Ikonnikova N. V., Buchenkov I. E., Ryshkel' O. S., Shutova A. G. *Laboratornyy praktikum po mikrobiologii* [Laboratory workshop on microbiology]. Minsk, IVTs Minfina Publ., 2017. 113 p. (In Russian).
12. Ivshina I. B., Kamenskikh T. N., Tyumina E. A., El'kin A. A. *Mikrobiologiya. Rabochaya tetrad' dlya laboratorno-prakticheskikh zanyatiy* [Microbiology. Workbook for laboratory and practical training]. Perm, PGNIU Publ., 2022. 100 p. (In Russian).

13. Kontsevaya I. I. *Mikrobiologiya: kul'tivirovaniye i rost bakteriy* [Microbiology: cultivation and growth of bacteria]. Chernigov, Izdatel'stvo "Desna Poligraf" Publ., 2017. 44 p. (In Russian).
14. Krasnikova L. V., Gun'kova P. I. *Obshchaya i pishchevaya mikrobiologiya* [General and Food Microbiology]. St. Petersburg, Universitet ITMO Publ., 2016. 134 p. (In Russian).
15. Belyasova N. A. *Mikrobiologiya* [Microbiology]. Minsk, BGTU Publ., 2005. 292 p. (In Russian).
16. Kämpfer P. Detection and cultivation of filamentous bacteria from activated sludge. *FEMS Microbiology Ecology*, 1997, vol. 23, no. 3, pp. 169–181. DOI: 10.1111/j.1574-6941.1997.tb00400.x.

Информация об авторах

Масехнович Александра Андреевна – аспирант кафедры биотехнологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: al.masekhnovich@mail.ru

Гребенчикова Ирина Александровна – кандидат технических наук, доцент, доцент кафедры биотехнологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: greb_irina_al@mail.ru

Маркевич Раиса Михайловна – кандидат химических наук, доцент, доцент кафедры биотехнологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: marami-bstu@yandex.ru

Рымовская Мария Васильевна – кандидат технических наук, доцент кафедры биотехнологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: rymovskaya_mv@mail.ru

Information about the authors

Masekhnovich Aleksandra Andreevna – PhD student, the Department of Biotechnology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: al.masekhnovich@mail.ru

Grebchikova Irina Aleksandrovna – PhD (Engineering), Associate Professor, Assistant Professor, the Department of Biotechnology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: greb_irina_al@mail.ru

Markevich Raisa Mikhaylovna – PhD (Chemistry), Associate Professor, Assistant Professor, the Department of Biotechnology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: marami-bstu@yandex.ru

Rymovskaya Mariya Vasil'yevna – PhD (Engineering), Assistant Professor, the Department of Biotechnology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: rymovskaya_mv@mail.ru

Поступила 13.06.2024