

УДК 628.355.5

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

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НИТЧАТЫХ ФОРМ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ БИОЦЕНОЗОВ ОЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЙ

Несмотря на большое разнообразие методов борьбы с нитчатым вспуханием активного ила, в настоящее время накоплено недостаточно данных для решения этой проблемы. Поэтому поиск способов эффективного подавления развития нитчатых форм микроорганизмов является важнейшей эколого-технологической задачей.

Установлено влияние условий культивирования на морфологические характеристики нитчатых бактерий, выделенных из биоценозов городских очистных сооружений.

Показано, что при недостаточной аэрации либо в ее отсутствие для большинства изолятов характерно интенсивное образование большого количества длинных нитей, в то время как в аэробных условиях происходит деградация нитчатых структур. Культивирование в бедной питательными веществами среде способствует формированию более длинных нитей независимо от условий аэрации. Продолжительное культивирование без внесения свежей питательной среды приводит к распаду нитей на отдельные клетки на 5–10 сутки от начала эксперимента в аэробных и на 20–25 сутки в микроаэробных и анаэробных условиях. Массовое развитие бактерий ряда изолятов может наблюдаться при высокой нагрузке по органическим веществам в условиях интенсивной аэрации, а также в микроаэробных условиях.

Наиболее значимые изменения значений pH культуральной жидкости в сравнении с исходными отмечены в условиях ограниченного доступа кислорода к микроорганизмам. Значения pH среды в диапазоне 6–8 способствуют образованию бактериями большого количества нитчатых структур. Снижение либо увеличение уровня pH приводит к деградации нитчатых структур с образованием нитей средней длины либо одиночных клеток.

Ключевые слова: сточные воды, активный ил, биоценоз, нитчатые бактерии, морфологические характеристики.

Для цитирования: Масехнович А. А., Гребенчикова И. А., Маркевич Р. М., Рымовская М. В. Влияние условий культивирования на морфологические характеристики нитчатых форм бактерий, выделенных из биоценозов очистных сооружений // Труды БГТУ. Сер. 2, Химические технологии, биотехнологии, геоэкология. 2024. № 2 (283). С. 161–166.

DOI: 10.52065/2520-2669-2024-283-18.

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

THE INFLUENCE OF CULTIVATION CONDITIONS ON THE MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF FILAMENTOUS FORMS OF BACTERIA ISOLATED FROM BIOCEANOSES OF WASTEWATER TREATMENT PLANTS

Despite the wide variety of methods to combat filamentous bulking of activated sludge, insufficient data has been accumulated to effectively address this problem. Therefore, the search for ways to effectively suppress the development of filamentous forms of microorganisms is an important ecological and biotechnological task.

The influence of cultivation conditions on the morphological characteristics of filamentous bacteria isolated from biocenoses of urban wastewater treatment plants has been established.

It has been shown that with insufficient aeration or in its absence, most isolates are characterized by the intensive formation of a large number of long filaments, while in aerobic conditions, the degradation of filamentous structures occurs. Cultivation in a nutrient-poor environment promotes the formation of longer filaments regardless of aeration conditions. Prolonged cultivation without adding fresh nutrient medium leads to the breakdown of filaments into individual cells on 5–10 days from the beginning of the experiment in aerobic and on 20–25 days in microaerobic and anaerobic conditions. The mass development of bacteria in a number of isolates can be observed under high loads of organic substances under conditions of intensive aeration, as well as under microaerobic conditions.

The most significant changes in the pH values of the culture fluid in comparison with the initial ones were noted in conditions of limited oxygen access to microorganisms. The pH values of the medium in

the range of 6–8 contribute to the formation of a large number of filamentous structures by bacteria. A decrease or increase in the pH level leads to degradation of filamentous structures with the formation of medium-length filaments or single cells.

Keywords: wastewater, activated sludge, biocenosis, filamentous bacteria, morphological characteristics.

For citation: Masekhovich A. A., Grebenchikova I. A., Markevich R. M., Rymovskaya M. V. The influence of cultivation conditions on the morphological characteristics of filamentous forms of bacteria isolated from biocenoses of wastewater treatment plants. *Proceedings of BSTU, issue 2, Chemical Engineering, Biotechnologies, Geoecology*, 2024, no. 2 (283), pp. 161–166 (In Russian).

DOI: 10.52065/2520-2669-2024-283-18.

Введение. Одной из распространенных в мировой практике проблем биологической очистки сточных вод является нитчатое вспухание активного ила [1]. Массовое развитие нитчатых форм организмов (цианобактерий, хламидобактерий, сапротрофных грибов) приводит к образованию рыхлых открытых хлопьев с развитой поверхностью [2]. Такой ил занимает большой объем, становится легким, теряет хлопьевидную структуру, плохо оседает, не уплотняется и в большом количестве выносятся из вторичных отстойников, ухудшая состояние водоемов и снижая эффективность работы очистных сооружений [3].

В то же время наличие нитчатых микроорганизмов в активном иле нельзя рассматривать только как отрицательное явление [4]. Их положительный вклад в очистку сточных вод заключается в том, что за счет большой удельной площади поверхности они способствуют быстрому извлечению из воды загрязняющих веществ [5]. Кроме того, при малой концентрации нитчатые бактерии благоприятно влияют на формирование флоккул активного ила (увеличиваются их размеры и прочность), за счет чего повышается степень осветления воды при отстаивании иловой смеси в отстойниках [6].

Несмотря на большое разнообразие методов борьбы с нитчатым вспуханием, в настоящее время накоплено недостаточно данных для эффективного решения этой проблемы [7]. Поэтому поиск факторов, которые позволили бы быстро и эффективно подавлять развитие нитчатых бактерий, является важнейшей задачей, стоящей перед учеными и инженерами, работающими в сфере очистки сточных вод [8].

Основная часть. Цель работы – установление влияния условий культивирования на морфологические характеристики нитчатых форм бактерий, выделенных из биоценозов очистных сооружений.

Объектами исследования являлись изоляты нитчатых бактерий, выделенные из биоценозов активного ила Минской очистной станции (МОС) производства Минскочиствод УП «Минскводоканал» [9].

Первый этап экспериментальных исследований заключался в установлении влияния условий аэрации на формирование бактериями нитчатых структур [10].

Условия интенсивной аэрации создавали путем культивирования бактерий в емкостях с небольшим количеством питательной среды (50 см³) в шейкере-инкубаторе Environmental Shaker – Incubator ES-20 при частоте встряхиваний 180–200 мин⁻¹.

Для моделирования микроаэробных условий бактерии культивировали при той же частоте встряхиваний в емкостях с высоким слоем среды. При этом возникало незначительное перемешивание культуральной жидкости.

Анаэробные условия культивирования обеспечивали созданием высокого слоя среды в пробирках без перемешивания.

Эксперимент проводили при температуре 20–25°C в течение 10–30 сут без внесения свежей питательной среды. Периодически отбирали пробы бактериальных суспензий и микроскопировали полученные образцы для выявления нитчатых структур с использованием светового биологического микроскопа BYLAN [11] при увеличении ×100.

Для создания условий средней нагрузки на ил по органическим веществам, характерной для большинства очистных сооружений, в качестве питательной среды применяли полусинтетическую среду ССВ, состав которой разработали на основе среднегодового состава сточных вод, поступающих на Минскую очистную станцию [12]. Для моделирования условий высокой нагрузки на активный ил по органическим веществам, отмечаемой при поступлении на очистные сооружения высококонцентрированных сточных вод, служила полноценная среда R2A [13].

В условиях средней нагрузки на ил по органическим веществам наиболее длинные нити большинства бактериальных изолятов (M3, M4, M5, M9, M10, M21, M22, M23, M24, M25, M26, M27, M28, M31, M41, M47, M50) образовывало в анаэробных условиях, в микроаэробных условиях длинные нити характерны для бактерий изолятов M0, M2, M7, M11, M13, M17, в аэробных – для M42, M43, M46, M48.

Следует отметить, что бактерии изолятов M4, M5, M26, M28, M31, M41 в анаэробных, M0, M2, M7, M13, M17 в микроаэробных и M48 в аэробных условиях образуют крупные скопления длинных нитей, которые могут создавать проблемы при отстаивании активного ила на действующих очистных сооружениях (рис. 1).

При моделировании условий высокой нагрузки на активный ил по органическим веществам изучаемые микроорганизмы формировали наиболее длинные нити в микроаэробных условиях. Так, большие скопления длинных нитей образовывали бактерии изолятов М2, М3, М9, М10. Для бактерий изолятов М7, М26, М47 аналогичное явление наблюдалось в аэробных условиях (рис. 2).

С увеличением продолжительности культивирования, по мере потребления питательных веществ и накопления в культуральной жидкости продуктов метаболизма, в условиях интенсивной аэрации отмечен распад нитей на отдельные клетки уже на 5–10 сутки, в микроаэробных и анаэробных условиях – на 20–25 сутки от начала эксперимента независимо от создаваемой нагрузки по органическим веществам.

На втором этапе эксперимента изучали влияние жизнедеятельности бактерий на уровень рН культуральной жидкости.

Нитчатые микроорганизмы культивировали в среде ССВ с исходным значением рН 6,4 при различных условиях аэрации. По истечении 24 ч измеряли рН культуральной жидкости изучаемых изолятов при помощи стационарного рН-метра HANNA INSTRUMENTS рН 211 (рис. 3).

Согласно полученным результатам, при культивировании большинства бактериальных изолятов отмечается лишь незначительное подкисление питательной среды со снижением значений рН не более чем на 1. Подобное явление наблюдалось в аэробных условиях для бактерий изолятов М3, М21, М22, М43; в микроаэробных – для М0, М3, М22, М28, М43, в анаэробных – для М0, М2, М3, М4, М5, М10, М26, М28. Наибольшее влияние на рН исходной среды оказали бактерии изолята М24 (в аэробных условиях) и М9, М41 (в анаэробных условиях), в результате жизнедеятельности которых произошло значительное снижение рН до величин 4,1; 4,2; 4,6 соответственно.

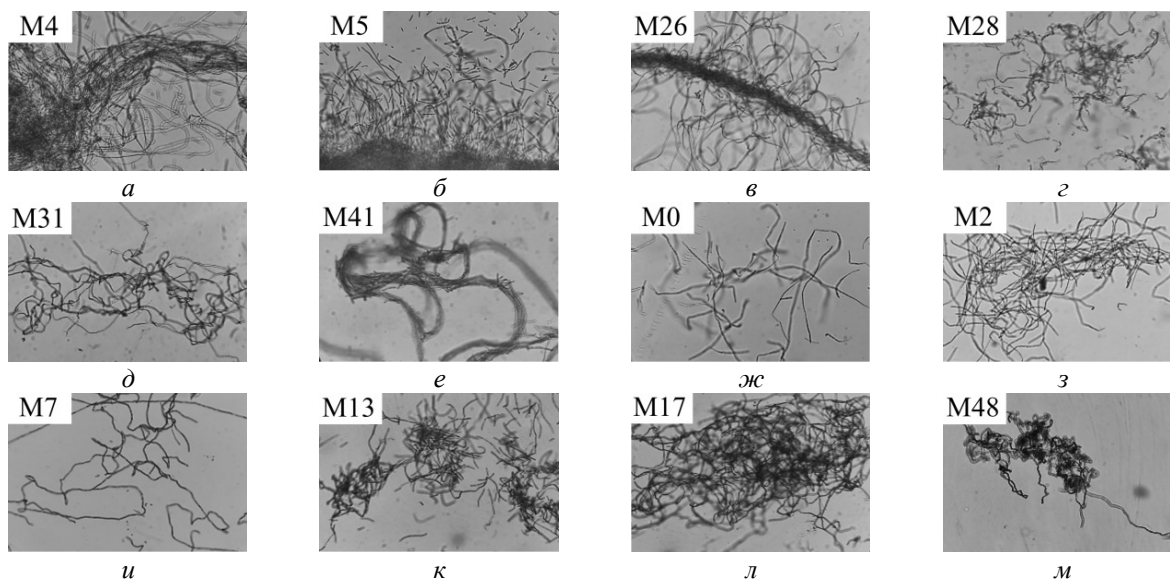


Рис. 1. Микрофотографии скоплений бактериальных нитей, полученных при культивировании в среде ССВ в анаэробных (а–е), микроаэробных (ж–л) и аэробных (м) условиях

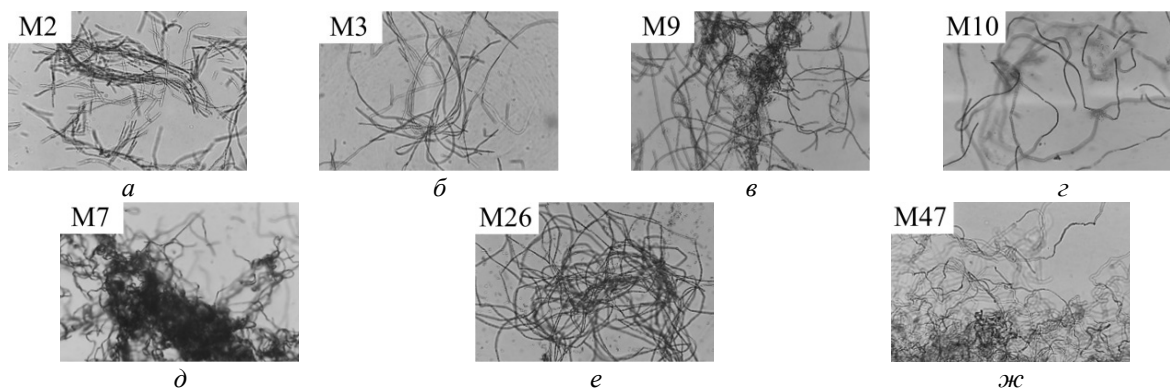


Рис. 2. Микрофотографии скоплений бактериальных нитей, полученных при культивировании в среде R2A в микроаэробных (а–г) и аэробных (д–ж) условиях

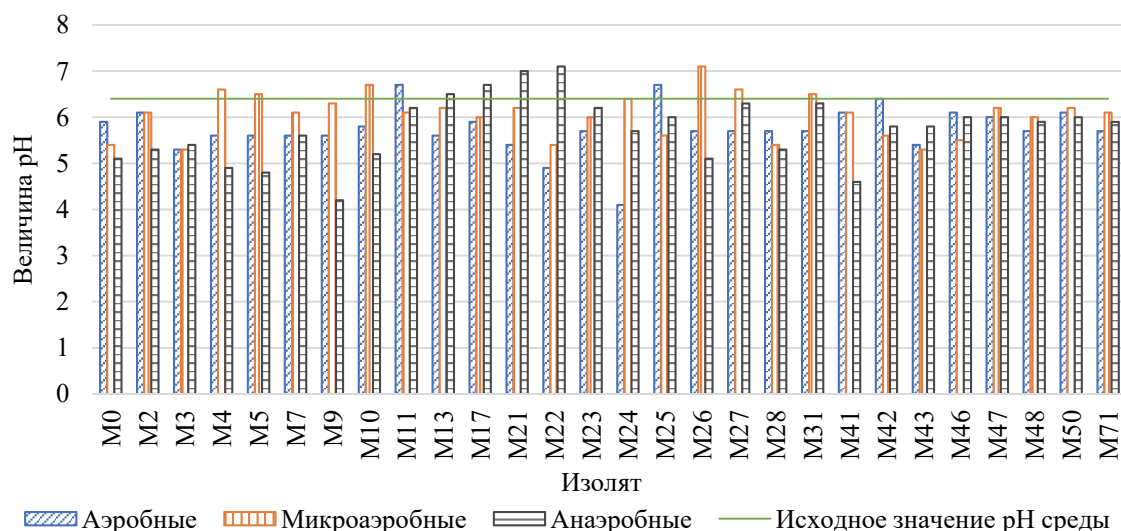


Рис. 3. Значения pH культуральной жидкости по истечении 24 ч культивирования изолятов бактерий в среде ССВ

Отмечена способность некоторых бактериальных изолятов увеличивать значения pH среды. Так, в микроаэробных условиях бактерии изолята M26 и в аэробных бактерии изолята M22 повышали значение pH культуральной жидкости до 7,1. Эти изменения могут быть результатом как образования продуктов метаболизма, так и неравномерного потребления отдельных компонентов среды [14].

На третьем этапе эксперимента изучали влияние величины pH среды на формирование бактериями нитчатых структур [15]. Для этого микроорганизмы культивировали в среде ССВ в микроаэробных условиях с исходными значениями pH 4; 6; 8; 10. Через 24 и 48 ч отбирали пробы бактериальных суспензий и микроскопировали полученные образцы для сравнения нитчатых структур, образованных бактериями при различных значениях pH.

В соответствии с результатами эксперимента для бактерий всех изучаемых изолятов были установлены следующие общие закономерности:

- при культивировании в среде, имеющей уровень pH, равный 4, наблюдалась деградация нитей с распадом на отдельные клетки;
- наиболее активный рост нитчатых форм микроорганизмов был отмечен в среде со значениями pH 6 и 8;
- в среде с величиной pH 10 для бактерий характерно образование небольшого количества нитей средней длины.

Заключение. Согласно полученным результатам, установлено следующее.

Культивирование в бедной питательной среде способствует формированию большинством бактерий более длинных нитей в сравнении с богатой питательными веществами средой при всех исследованных условиях аэрации.

При недостаточной аэрации или в ее отсутствие для большинства изолятов характерно интенсивное образование наиболее длинных нитей в большем количестве в сравнении с аэробными условиями; в аэробных же, напротив, происходит деградация нитчатых структур, в ряде случаев с образованием одиночных клеток.

Увеличение продолжительности культивирования без внесения свежей питательной среды приводит к распаду нитей на отдельные клетки на 5–10 суток от начала эксперимента в аэробных и на 20–25 суток в микроаэробных и анаэробных условиях.

При высокой нагрузке на активный ил (что соответствует залповым сбросам на городские очистные сооружения высококонцентрированных потоков сточных вод) в условиях интенсивной аэрации массово могут развиваться изоляты бактерий M7, M26, M47, в микроаэробных условиях – M2, M9, M10.

При культивировании нитчатых микроорганизмов может происходить как подкисление, так и подщелачивание культуральной жидкости, что может быть результатом образования продуктов метаболизма либо неравномерного потребления отдельных компонентов среды. Наиболее значимые различия значений pH в сравнении с исходными отмечены в условиях ограниченного доступа кислорода к микроорганизмам.

Значения pH среды в диапазоне 6–8 способствуют образованию бактериями большого количества нитчатых структур, в то время как в кислой среде происходит распад нитей на отдельные клетки, в щелочной – на нити средней длины и отдельные клетки.

Полученные данные важны для разработки методов подавления массового развития нитчатых бактерий на городских очистных станциях.

Список литературы

1. Wanner J. Activated sludge bulking and foaming control. Lancaster: Technomic Publishing, 1993. 327 p.
2. Маркевич Р. М., Гребенчикова И. А., Рымовская М. В. Биотехнологическая переработка промышленных отходов. Минск: БГТУ, 2018. 300 с.
3. Шевченко Т. А., Иваненко И. О. Анализ причин нитчатого вспухания активного ила и меры борьбы с ним // Коммунальное хозяйство городов. 2014. № 114. С. 67–70.
4. Jorgensen S. E., Gromiec M. J. Mathematical model in biological waste water treatment. Amsterdam: Elsevier, 1985. 802 p.
5. Bacteriophages of wastewater foaming-associated filamentous *Gordonia* reduce host levels in raw activated sludge / M. Liu [et al.] // Scientific reports. 2015. Vol. 5, no. 1. P. 13754. DOI: 10.1038/srep13754.
6. The influence of protruding filamentous bacteria on floc stability and solid-liquid separation in the activated sludge process / W. Burger [et al.] // Water research. 2017. Vol. 123, no. 1. P. 578–585. DOI: 10.1016/j.watres.2017.06.063.
7. Кичигина С. Е. Устойчивость функционирования систем биологической очистки путем исключения нитчатого вспухания активного ила: автореф. дис. ... канд. техн. наук: 03.00.23. Щелково, 2007. 27 с.
8. Гогина Е. С., Гульшин И. А. Использование озона для контроля нитчатого вспухания активного ила // Строительство: наука и образование. 2012. № 3. С. 5.
9. Совершенствование гидробиологического анализа активного ила на Минской очистной станции / О. С. Дубовик [и др.] // Водоснабжение и санитарная техника. 2021. № 10. С. 26–36.
10. Жмур Н. С. Технологические и биохимические процессы очистки сточных вод на сооружениях с аэротенками. М.: АКВАРОС, 2003. 512 с.
11. Белясова Н. А. Микробиология. Лабораторный практикум. Минск: БГТУ, 2007. 160 с.
12. Бунина В. В. Контроль качества очистки сточных вод на Минской очистной станции. Принцип составления графика лабораторного контроля за работой очистных сооружений // Современные тенденции в развитии водоснабжения и водоотведения: материалы Междунар. конф., посвящ. 145-летию УП «Минскводоканал», Минск, 13–14 февр. 2019 г. Минск, 2019. С. 133–136.
13. 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.
14. Белясова Н. А. Микробиология. Минск: БГТУ, 2005. 292 с.
15. Дочкина Ю. Н., Корчагин В. И., Плякина А. А. Воздействие абиотических факторов на состояние биоценоза активного ила и его гидробиохимические показатели // Лесотехнический журнал. 2021. № 4. С. 29–42.

References

1. Wanner J. Activated sludge bulking and foaming control. Lancaster, Technomic Publishing, 1993. 327 p.
2. 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).
3. Shevchenko T. A., Ivanenko I. O. Analysis of the causes of filamentous swelling of activated sludge and measures to combat it. *Kommunal'noye khozyaystvo gorodov* [Municipal services of cities], 2014, no. 114, pp. 67–70 (In Russian).
4. Jorgensen S. E., Gromiec M. J. Mathematical model in biological waste water treatment. Amsterdam, Elsevier, 1985. 802 p.
5. Liu M., Gill J. J., Young R., Summer E. J. Bacteriophages of wastewater foaming-associated filamentous *Gordonia* reduce host levels in raw activated sludge. *Scientific reports*, 2015, vol. 5, no. 1, p. 13754. DOI: 10.1038/srep13754.
6. Burger W., Krysiak-Baltyn K., Scales P. J., Martin G. J. O., Stickland A. D., Gras S. L. The influence of protruding filamentous bacteria on floc stability and solid-liquid separation in the activated sludge process. *Water research*, 2017, vol. 123, no. 1, pp. 578–585. DOI: 10.1016/j.watres.2017.06.063.
7. Kichigina S. E. *Ustoychivost' funktsionirovaniya sistem biologicheskoy ochistki putem isklyucheniya nitchatogo vspukhaniya aktivnogo ila. Avtoreferat dissertatsii kandidata tekhnicheskikh nauk* [Stability of the functioning of biological purification systems by eliminating filamentous swelling of activated sludge. Abstract of thesis PhD (Engineering)]. Shchelkovo, 2007. 27 p. (In Russian).
8. Gogina E. S., Gul'shin I. A. The use of ozone to control filamentous swelling of activated sludge. *Stroitel'stvo: nauka i obrazovaniye* [Construction: science and education], 2012, no. 3, p. 5 (In Russian).

9. Dubovik O. S., Markevich R. M., Gavrilovich E. V., Grebenchikova I. A., Ivanovich V. V. Improving the hydrobiological analysis of activated sludge at the Minsk wastewater treatment facilities. *Vodosnabzheniye i sanitarnaya tekhnika* [Water supply and sanitary technique], 2021, no. 10, pp. 26–36 (In Russian).

10. Zhmur N. S. *Tekhnologicheskiye i biokhimicheskiye protsessy ochistki stochnykh vod na sooruzheniyakh s aerotenkami* [Technological and biochemical processes of wastewater treatment at facilities with aerotanks]. Moscow, AKVAROS Publ., 2003. 512 p. (In Russian).

11. Belyasova N. A. *Mikrobiologiya. Laboratornyy praktikum* [Microbiology. Laboratory workshop]. Minsk, BGTU Publ., 2007. 160 p. (In Russian).

12. Bunina V. V. Quality control of wastewater treatment at the Minsk wastewater Treatment Plant. The principle of drawing up a schedule for laboratory control over the operation of wastewater treatment plants. *Sovremennyye tendentsii v razvitiy vodosnabzheniya i vodootvedeniya: materialy Mezhdunarodnoy konferentsii, posvyashchennoy 145-letiyu UP "Minskvodokanal"* [Modern trends in the development of water supply and sanitation: materials of the International Conference dedicated to the 145th anniversary of the UE "Minskvodokanal"]. Minsk, 2019, pp. 133–136 (In Russian).

13. 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.

14. Belyasova N. A. *Mikrobiologiya* [Microbiology]. Minsk, BGTU Publ., 2005. 292 p. (In Russian).

15. Dochkina Yu. N., Korchagin V. I., Plyakina A. A. The effect of abiotic factors on the state of activated sludge biocenosis and its hydro-biochemical parameters. *Lesotekhnicheskiy zhurnal* [Forestry Engineering journal], 2021, no. 4, pp. 29–42 (In Russian).

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

Grebenchikova 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