

РОЙ І. Ю., РЕШЕТНЯК Л. Р., КЛИМЕНКО Н. А., СТАВСЬКА С. С., ЗДОРОВЕНКО Г. М.
Інститут колоїдної хімії і хімії води ім. А. В. Думанського НАН України
Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»

ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРІЙ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ ВУГІЛЬНОГО ФІЛЬТРА СИСТЕМИ ПІДГОТОВКИ ВОДИ БРОВАРНОГО ВИРОБНИЦТВА

Зі змивів з активованого вугілля виділено та охарактеризовано три найпоширеніші споріві бактеріальні культури, що можуть відігравати вирішальну роль в утворенні біоплівки у вугільному фільтрі під час доочищення води, яку використовують у виробництві пива.

Ключові слова: активоване вугілля, бактерії, біоплівка.

© Рой І. Ю., Решетняк Л. Р., Клименко Н. А., Ставська С. С., Здоровенко Г. М., 2014.

Постановка проблеми. Під час використання вугільних фільтрів для очищення та доочищення води на поверхні вугілля утворюється біоплівка, що складається з частинок забруднень, мікробних клітин і продуктів їхнього метаболізму. Із часом виникає потреба в промиванні фільтрів, щоб видалити біоплівку для їхнього відновлення. Вивчення морфолого-культуральних і фізіолого-біохімічних властивостей бактерій, що утворюють плівку, є необхідним для розроблення раціональних методів санації фільтрів.

Аналіз попередніх досліджень. Особливістю багатьох бактерій є їхня здатність до адгезії, завдяки чому в природних і штучно створених умовах вони прикріплюються до поверхонь і розмножуються на них, утворюючи біоплівки [1, 2]. У біоплівках клітини занурені в біополімерний матрикс, який вони продукують [3, 4]. Бактерії, інтегровані в біоплівку, стійкіші до негативних впливів і мають вищу біохімічну активність порівняно з планктонними, тобто завислими у воді, клітинами [5, 6]. Ключовою подією є адгезія клітини до поверхні, зануреної у водне середовище. Надалі бактерії синтезують матрикс, що стає головним структурним компонентом біоплівки (85 %). Близько 15 % припадає на бактеріальні клітини [7]. Біополімерний матрикс складається переважно з екзополісахаридів (ЕПС). Окрім них, він містить ліпополісахариди, білки, нуклеїнові кислоти, мінеральні речовини. Матрикс відіграє структурну й протекторну ролі. Бактеріальні клітини в біоплівці стійкіші до впливу біоцидів та інших несприятливих чинників. Завдяки цьому біоплівки є дуже стійкими до стресових факторів, а видалення їх з будь-яких поверхонь є складним завданням.

Для промислового очищення та доочищення води на browарному виробництві використовують сорбційні фільтри на основі активованого вугілля (АВ). На їхньому завантаженні під час використання утворюється біоплівка, яка періодично злущується [8], що призводить до вторинного забруднення очищуваної води. Зазвичай на підприємствах застосовують термічну санацію, тобто промивання фільтрів водою за температури 95 °С протягом 2,5 год. Проте вже через три доби на поверхні вугільних гранул починає формуватися біоплівка [9]. Зрозуміло, що для розроблення ефективних методів відновлення експлуатаційних характеристик вугільних фільтрів варто дослідити властивості і склад бактерій, що утворюють біоплівку.

Метою статті було виділення типових культур бактерій із біоплівки, утвореної на завантаженні вугільних фільтрів для доочищення водопровідної води на browарному виробництві, і вивчення їх морфолого-культуральних та фізіолого-біохімічних властивостей для розроблення ефективних методів боротьби з ними під час санації фільтрів.

Виклад основного матеріалу. Бактерії виділяли з біоплівки, утвореної на гранулах АВ марок Silcarbon K-835 і Filtrasorb 400, відібраних із поверхні фільтра й на глибинах 0,5 і 1 м. На АВ надходила пропущена крізь піщаний фільтр вода з міського водогону зі вмістом активного залишкового хлору 0,2...0,4 мг/дм³, яка відповідала нормативним вимогам до питної води. Чисті культури виділяли методом виснажуючого посіву на м'ясо-пептонний агар (МПА) у чашках Петрі. Під час вивчення морфолого-культуральних ознак описували форму й розмір (діаметр) колоній, характер поверхні і краю, профіль, колір, ступінь прозорості й блиску, структуру і консистенцію [10]. Здатність утворювати плівку (пелікулу) на поверхні рідкого живильного середовища визначали шляхом посіву ізолятів на м'ясо-пептонний бульйон (МПБ) [13]. Фарбування за Грамом здійснювали загальноприйнятими методами [12, 13]. Спори в клітинах виявляли за методикою [12]. Фізіолого-біохімічні особливості мікроорганізмів визначали за такими ознаками: окиснення і ферментування глюкози; розрідження желатина; здатність до утворення сірководню, індолу, аміаку; наявність каталазної, оксидазної, нітратредуктазної активності; рухливість [10, 13].

Відомо, що існує кореляція між морфологією колоній і здатністю синтезувати ЕПС [12]. Клітини, що утворюють ЕПС, на твердих живильних середовищах ростуть у вигляді зморшкуватих, шорстких, складчастих колоній. Бактерії, нездатні до синтезу екзополісахариду, утворюють гладенькі пласкі колонії [7]. Таким чином, нами з проб АВ, відібраних на різних глибинах фільтра, були виділені три чисті культури бактерій, які кількісно переважали в біоплівці і відповідали характеристикам, притаманним бактеріям, здатним до утворення біоплівок. Одержані ізоляти були позначені 1, 2 і 3 (табл. 1).

Таблиця 1 – Морфолого-культуральні властивості бактерій, виділених із тіла вугільного фільтра

Властивості	Номер ізоляту		
	1	2	3
Форма колоній	кругла	неправильна	неправильна
Діаметр колоній, мм	1...2	3...4	8...12
Поверхня колоній	зморшкувата	зморшкувата	шорстка, зморшкувата
Профіль колоній	бугристий	бугристий	бугристий
Блиск, прозорість	матова	матова	матова
Колір колоній	безбарвна	біла	безбарвна
Край колоній	хвилястий	хвилястий	хвилястий, гладенький, блискучий
Структура колоній	дрібнозерниста	дрібнозерниста	неоднорідна, дрібнозерниста
Консистенція колоній	щільна, матеріал важко знімається з середовища	щільна, матеріал важко знімається з середовища	м'яка, слизувата, матеріал легко знімається з середовища

Примітка: середовище культивування – МПА, тривалість – 48 год, температура – 37 °С.

Колонії досліджуваних ізолятів мали зморшкувату або зморшкувато-шорстку поверхню, що є притаманним саме бактеріям, які активно утворюють біоплівку [12]. Штам 1 було виділено з поверхні фільтра, штам 2 – із глибини 0,5 м, штам 3 – із глибини 1 м (рис. 1). Штам 3 відрізнявся від штамів 1 і 2 більшим розміром колоній та м'якою слизуватою, консистенцією, пов'язаною, вірогідно, з посиленням синтезом ЕПС.

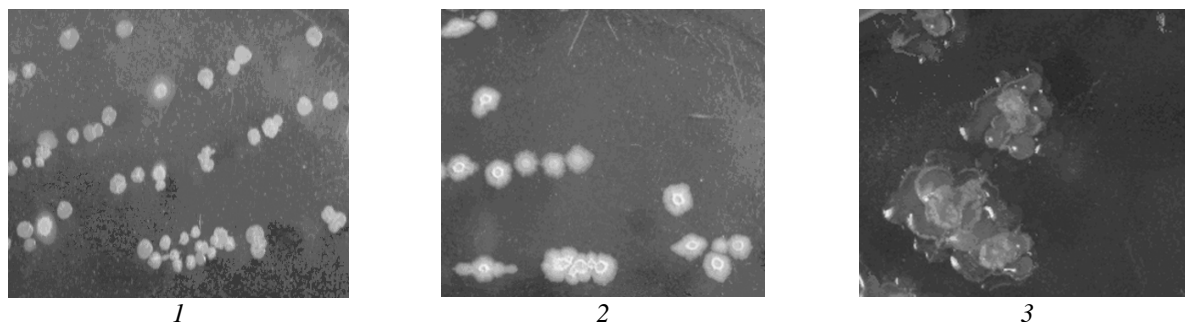


Рис. 1 – Особливості зростання на м'ясо-пептонному агарі бактерій, виділених із тіла вугільного фільтра

Зростаючи на рідкому живильному середовищі (МПБ) протягом 24...48 год, усі три штами утворювали на межі поділу фаз «рідина–повітря» щільну зморшкувату плівку (пелікулу) (рис. 2), що також може свідчити про їх здатність утворювати біоплівку на твердих поверхнях [7, 12].

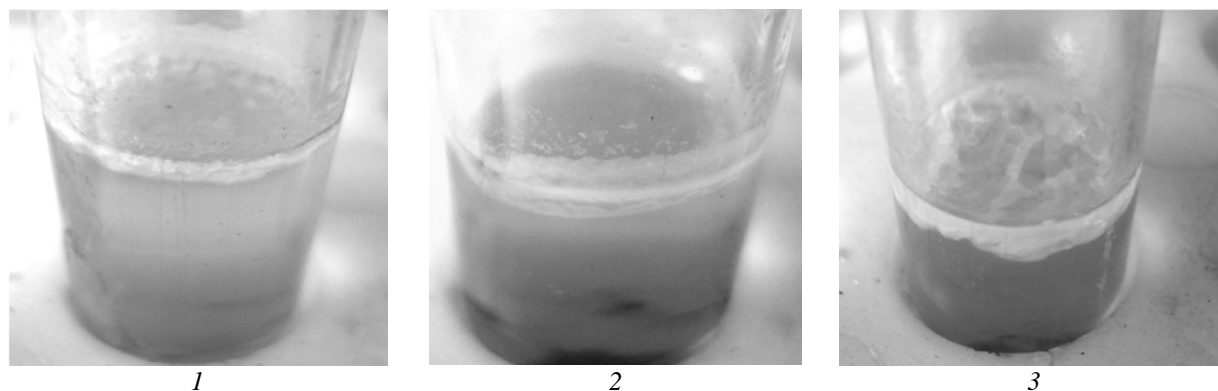


Рис. 2 – Особливості зростання на м'ясо-пептонному бульйоні бактерій, виділених із тіла вугільного фільтра

Мікроскопія мазків, пофарбованих за Грамом, свідчить, що всі клітини мають паличковидну форму і є грампозитивними. Усі вони утворюють ендоспори, розташовані центрально, та мають однакові фізіолого-біохімічні властивості (табл. 2).

Таблиця 2 – Фізіолого-біохімічні властивості бактерій, виділених з тіла вугільного фільтра

Властивості	Номер ізоляту		
	1	2	3
Окиснення/ферментація глюкози	+/-	+/-	+/-

Гідроліз желатину	+	+	+
Утворення сірководню	–	–	–
Утворення аміаку	–	–	–
Утворення індолу	–	–	–
Нітратредуктазна активність	–	–	–
Каталазна активність	+	+	+
Оксидазна активність	+	+	+
Рухливість	+	+	+

Усі три ізоляти, виділені з біоплівки, є аеробами, утворюють спори і за своїми морфолого-культуральними й фізіолого-біохімічними властивостями можуть бути віднесені до роду *Bacillus* [14]. Усі спороутворюючі бактерії є стійкими до підвищеної температури, тому саме вони виживають після температурної санації фільтрів і швидко відновлюють біоплівку на поверхні гранул АВ.

Висновки. Із біоплівки, утвореної на гранулах активованого вугілля сорбційного фільтра для доочищення води броварного виробництва, виділені типові бактеріальні штами. Їх ідентифіковано як представників роду *Bacillus*, стійких до підвищеної температури. Це є підставою для відмови від температурної санації вугільних сорбційних фільтрів для доочищення води броварного виробництва.

Перспективи подальших досліджень. Передбачається розроблення принципово інших методів видалення біоплівки з поверхні вугільного завантаження виробничих фільтрів.

Список використаної літератури

1. *Flemming H. C.* Biofilms and environmental protection / H. C. Flemming // *Water Sci. Technol.* – 1993. – V. 27. – P. 1–10.
2. *Hamilton W. A.* Biofilms: microbial interactions and metabolic activity / W. A. Hamilton // *Ecology of Microbial Communities.* – Cambridge : Cambridge Univ. Press, 1987. – P. 361–385.
3. *Miller M. B.* Quorum sensing in bacteria / M. B. Miller, B. L. Bassler // *Ann. Rev. Microbiol.* – 2001. – V. 55. – P. 165–199.
4. *Гинцбург А. Л.* «Quorum sensing» или социальное поведение бактерий / А. Л. Гинцбург, Т. С. Ильина, Ю. М. Романова // *Журн. микробиол. эпидемиол.* – 2003. – № 5. – С. 86–93.
5. *Dunne W. M.* Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? / W. M. Dunne // *Clinical Microbiology Rev.* – 2002. – 15. – No. 2. – P. 155–166.
6. *Friedman L.* Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms / L. Friedman, R. Kolter // *Molecular Microbiology.* – 2004. – V. 51. – No. 3. – P. 675–690.
7. *Branda S. S.* Biofilm: the matrix revisited / S. S. Branda, A. Vic, L. Friedman, R. Kolter // *Trends in Microbiol.* – 2005. – V. 13. – № 1. – P. 21–25.
8. *Ротмистров М. Н.* Микробиология очистки воды / М. Н. Ротмистров, П. И. Гвоздяк, С. С. Ставская. – К. : Наук. думка, 1978. – 268 с.
9. *Клименко Н. А.* Удаление биопленки с активных углей при эксплуатации промышленных адсорбционных фильтров / Н. А. Клименко, Г. М. Здоровенко, И. А. Шевчук и др. // *Химия и технология воды.* – 2013. – № 1.
10. *Поздеев О. К.* Медицинская микробиология / под ред. В. И. Покровского. – М. : ГЭОТАР-МЕД, 2004. – С. 260–268.
11. *Ali A.* High-frequency rugose exopolysaccharide production by *Vibrio cholerae* / A. Ali, M. H. Rashid, D. K. R. Karaolis // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2002. – 68. – No. 11. – P. 5773–5778.
12. *Гудзь С.* Практикум з мікробіології. / С. Гудзь, С. Гнатюш, І. Білінська. – Львів : ЛНУ ім. І. Франка, 2003. – Ч. 1. – 80 с.
13. *Руководство к практическим занятиям по микробиологии* / под ред. Н. С. Егорова. – М. : Изд-во Моск. ун-та, 1983. – С. 125–129.
14. *Определитель бактерий Берджи.* – М. : Мир, 1997 – 432 с.

Надійшла до редакції 15.02.2014

Roy J. Yu, Reshetnyak L. R., Klimenko N. A., Stavskaya S. S., Zdorovenko G. M.

THE CHARACTERISTICS OF BACTERIA ISOLATED FROM CARBON FILTER OF WATER TREATMENT SYSTEM AT THE BREWERY

When using the sorption coal filters for treatment and advanced water treatment, a biofilm – aggregate of contamination particles, microbial cells and the products of their metabolism – is formed on the coal surface. The named particles are attached to each other and enclosed in a matrix of their extracellular polymeric synthesized compounds. Such community of microorganism has the changed phenotype which is occurred in other parameters of growth, a reproduction speed and an expression of specific genes. A uniform genetic system is established in a biofilm in the form of plasmids which define social behavior of microorganisms. The coordinated activity of microbes' community makes biofilms to be low-vulnerable to disinfectants and factors of macro-organism

protection, and the removal of the film from any surface becomes a challenging task. Therefore over time, there is a need in filters flushing for the biofilms removal in order to restore the filter effectiveness and to prevent secondary contamination of purifying water as it can be dangerous to human health. The study of morphologic-cultural and physiological-biochemical properties of bacteria forming a film is necessary for the development of rational methods of filters cleaning and the improvement of the quality of treated water.

The paper studies biological features of biofilms at active carbon filters used in industrial process water treatment systems of an enterprise producing special drinks. The three most common bacterial cultures, which can play a key role in the biofilms formation in the carbon filter in advanced water treatment for beer production, have been isolated and characterized from swabs from the activated carbon. All three selected bacterial cultures are identified as members of the genus *Bacillus*. The obtained data are the basis for the development of more effective methods for a biofilm removal from the activated carbon surface at the industrial filters for the brewing industry, and/or combination temperature sanitation with other technologies.

The present paper studies biological features of biofilms at active carbon filters of water treatment systems for process water at the enterprise of special drinks. Three most common bacterial cultures, which can play a critical role in the formation of biofilms in the carbon filter at water purification used for beer production, were isolated from swabs from the activated carbon and characterized. The obtained data are the basis for the development of more effective methods for the removal of biofilm from the surface of the activated carbon filters at the brewing industry, and/or combination of temperature sanitation with other techniques.

Keywords: activated carbon, bacteria, biofilm.

References

1. *Flemming H. C.* Biofilms and environmental protection / H. C. Flemming // *Water Sci. Technol.* – 1993. – V. 27. – P. 1–10.
2. *Hamilton W. A.* Biofilms: microbial interactions and metabolic activity / W. A. Hamilton // *Ecology of Microbial Communities.* – Cambridge : Cambridge Univ. Press, 1987. – P. 361–385.
3. *Miller M. B.* Quorum sensing in bacteria / M. B. Miller, B. L. Bassler // *Ann. Rev. Microbiol.* – 2001. – V. 55. – P. 165–199.
4. *Gincburg A. L.* «Quorum sensing» ili social'noe povedenie bakterij [«Quorum sensing» or social conduct of bacteria] / A. L. Gincburg, T. S. Il'ina, Ju. M. Romanova // *Zhurn. mikrobiol. jepidemiol.* – 2003. – № 5. – S. 86–93.
5. *Dunne W. M.* Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? / W. M. Dunne // *Clinical Microbiology Rev.* – 2002. – 15. – No. 2. – P. 155–166.
6. *Friedman L.* Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms / L. Friedman, R. Kolter // *Molecular Microbiology.* – 2004. – V. 51. – No. 3. – P. 675–690.
7. *Branda S. S.* Biofilm: the matrix revisited / S. S. Branda, A. Vic, L. Friedman, R. Kolter // *Trends in Microbiol.* – 2005. – V. 13. – № 1. – P. 21–25.
8. *Rotmistrov M. N.* Mikrobiologija ochildki vody [Microbiology of water treatment] / M. N. Rotmistrov, P. I. Gvozdjak, S. S. Stavskaja. – K. : Nauk. dumka, 1978. – 268 s.
9. *Klimenko N. A.* Udalenie bioplenki s aktivnyh uglej pri jekspluatcii promyshlennyh adsorbcionnyh fil'trov [Removing of biofilm from active coals during exploitation of industrial adsorption filters] / N. A. Klimenko, G. M. Zdorovenko, I. A. Shevchuk i dr. // *Himija i tehnologija vody.* – 2013. – № 1.
10. *Pozdeev O. K.* Medicinskaja mikrobiologija [Medical microbiology] / pod red. V. I. Pokrovskogo. – M. : GJeO-TAR-MED, 2004. – S. 260–268.
11. *Ali A.* High-frequency rugose exopolysaccharide production by *Vibrio cholerae* / A. Ali, M. H. Rashid, D. K. R. Karaolis // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2002. – 68. – No. 11. – P. 5773–5778.
12. *Gudz' S.* Praktikum z mikrobiologii [Practical work is from microbiology] / S. Gudz', S. Gnatush, I. Bilins'ka. – L'viv : LNU im. I. Franka, 2003. – Ch. 1. – 80 s.
13. *Rukovodstvo k prakticheskim zanjatijam po mikrobiologii* [Guidance to practical employments on microbiology] / pod red. N. S. Egorova. – M. : Izd-vo Mosk. un-ta, 1983. – S. 125–129.
Opredelitel' bakterij Berdzhii [Determinant of bacteria of Berdzhii]. – M. : Mir, 1997 – 432 s.