

УДК 628.16:579.222

Кравченко О. В., Кузьмінський Є. В., Панченко О. С.

МЕТОДОЛОГІЧНІ ПІДХОДИ ДО БІОТЕХНОЛОГІЇ ОЧИЩЕННЯ ПИТНОЇ ВОДИ: МЕТОДИКИ ВИДІЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ ЗАЛІЗО- ТА МАРГАНЕЦЬОКИСНЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ

У статті запропоновано методики виділення та ідентифікації залізо- та марганецьокиснювальних бактерій з поверхневих і підземних вод. У результаті перевірки запропонованої методики виділено культури залізо- та марганецьокиснювальних мікроорганізмів, віднесених до шести родів: *Siderocapsa*, *Leptothrix*, *Sphaerotillus*, *Galionella*, *Metallogenium*, *Hyphomicrobium*.

Ключові слова: методики, залізобактерії, марганецьокиснювальні бактерії, водопідготовка, біотехнологія очищення питної води.

Постановка проблеми в загальному вигляді. Стрімкий розвиток біотехнології підготовки питної води [1–5] потребує розроблення стандартизованих методик для якісної водопідготовки й розвитку уявлення про біологічні агенти, які можна застосовувати. В Україні марганець та залізо є постійними компонентами природних вод, їх вміст у підземних водах у деяких областях вищий за допустимі норми.

У праці [6] показано, що біологічна трансформація як марганцю, так і заліза здійснюється за участі одних і тих самих груп залізо- та марганецьокиснювальних мікроорганізмів. У разі біологічного способу видалення заліза з води використовують три групи залізобактерій: нитчасті (наприклад, *Leptotrix ochracea*, *Crentoprix polyspora*), стеблові (*Jallionella ferruginea*) та істинні (*Eubacteriales*) бактерії, які наявні в природних водах і мережах водопостачання [7].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Спробу виділити чисті культури залізо- та марганецьокиснювальних мікроорганізмів виконано в праці [8]. Дослідникам вдалося культивувати в лабораторних умовах роди *Galionella*, *Leptothrix*, *Metallogenium*. Спробу систематизації залізобактерій розглядали в праці [9]. Вчені виділили близько 115 чистих культур із донних осадів озера Байкал.

В Україні не було проведено встановлення видового різноманіття залізо- та марганецьокиснювальних мікроорганізмів з поверхневих і підземних вод. Актуальність наших досліджень насамперед визначається необхідністю систематизувати розрізнені знання про залізо- та марганецьокиснювальні мікроорганізми. Розроблення методики виділення та систематизації даних мікроорганізмів із води різноманітних джерел є суттєвою для розширення уявлення про них. Також накопичення чистих культур цих мікроорганізмів важливе для розроблення біотехнологій знезалізнення та деманганізації поверхневих і підземних вод України.

Мета статті. Метою цієї роботи є розроблення і перевіряння методики виділення з поверхневих вод мікроорганізмів, які окислюють залізо та марганець, і їх ідентифікація.

Викладення основного матеріалу. Об'єктом дослідження стала вода, яка характеризується підвищеним вмістом заліза та марганцю. Для виділення чистих культур мікроорганізмів використовували метод Дригальського. Виділення бактерій проводили на середовищах № 1 і № 2 такого складу: $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ – 0,5 г, NaNO_3 – 0,5 г, K_2HPO_4 – 0,5 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г, лимонна кислота – 10 г, сахароза – 2 г, гідролізат казеїну панкреатичний – 1 г, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 5,9 г (для залізоокиснювальних бактерій) або $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 4,7 г (для марганецьокиснювальних), агар-агар – 20 г, дистильована вода –

1 л, рН 6,8 [9]. Також використовували середовище Чапека зі стрептоміцином [8].

Для визначення видової належності виділених організмів вивчали їх морфологію, проводили забарвлення за Грамом, забарвлення оксидів заліза та марганцю в капсулах і чохлах бактерій. Морфологію клітин вивчали за допомогою мікроскопа Leica ATC 2000. Видову належність виділених чистих культур встановлювали порівнянням з фотографіями [10].

Для знаходження оксидів заліза та марганцю в клітинних структурах використовували цитохімічні методи забарвлення: для Fe^{3+} – жовтою кров'яною сіллю, для Mn^{4+} – розчином бензидину. Наявність оксидів металів, забарвлених у синій колір, виявляли під світловим мікроскопом, а також на колоніях, що вирости на чашках.

Виділені чисті культури для збереження пересівали в пробірки на середовище такого складу: $MnSO_4$ – 7 мг, $(NH_4)_2SO_4$ – 1,5 г, KCl – 0,05 г, K_2HPO_4 – 0,05 г, $Ca(NO_3)_2$ – 0,01 г, глюкоза – 2 мг, дистильована вода – 1 л [9].

Результати та їх обговорення. У результаті наукового пошуку розроблено методики виділення й ідентифікації залізо- та марганецьокиснювальних бактерій (рисунки 1 та 2). За розробленою методикою виділено чисті культури залізо- та марганецьокиснювальних мікроорганізмів. Для добирання поживного середовища застосовано підхід, що ґрунтується на здатності бактерій використовувати як джерело вуглецю органічні кислоти й цукри.

У разі використання середовища Чапека зі стрептоміцином не вдалось отримати розвитку залізо- та марганецьокиснювальних бактерій. Спостерігався слабкий ріст колоній, накопичення заліза та марганцю вдалось виявити тільки забарвленням оксидів заліза та марганцю гексаціанофератом калію й бензидином відповідно. Цього не достатньо для подальшої роботи з ідентифікації бактерій.

Розвиток бактерій на чашках Петрі з селективними середовищами № 1 і 2 ставав помітним на 4–5 добу культивування за температури 25°C. На поверхні середовища спостерігалися характерні колонії: жовто-оранжеві – колонії залізобактерій; бурі – колонії марганецьокиснювальних бактерій. Середовища по мірі розвитку мікроорганізмів змінювали колір: від світло-зеленого до ржавого – у залізобактерій, від бежевого до коричневого – у марганецьокиснювальних бактерій. Розмір та структура колоній були різноманітними.

Наступним етапом роботи була ідентифікація виділених організмів. Виділені бактерії забарвлювали за Грамом. Залізобактерії є грамнегативними, а також не забарвлюються за Грамом, грампозитивних. На основі цього принципу, а також за морфологією ідентифіковано р. *Siderocapsa*, для якого характерна сферична форма клітин; р. *Leptothrix* – прямі палички, оточені чохлом; р. *Sphaerotillus* – палички. Ті клітини, що не забарвлювалися за Грамом і мали форму стеблин, віднесено до р. *Galionella* (форма стеблин – ключова ознака для цього роду).

Для розрізнення родів *Leptothrix* та *Sphaerotillus* застосовано зафарбовування оксидів заліза жовтою кров'яною сіллю. Встановлено, що р. *Leptothrix* накопичує оксиди заліза в чохлах, тому вони забарвлюються в синій колір, а бактерії р. *Sphaerotillus* мають тонкий чохол і практично не накопичують оксидів заліза, тому вони не забарвлюються. Цей принцип дає змогу розрізнити вказані роди.

Для колоній, вирощених на селективному середовищі № 2, принцип ідентифікації родів такий самий. За допомогою забарвлення оксидів марганцю бензидином вдалось ідентифікувати р. *Metallogenium*. Також цей рід має характерну морфологічну ознаку – колонії у формі «павучка», тому їх легко виявити серед інших марганецьокиснювальних бактерій.

Дослідження під світловим мікроскопом колоній з обох середовищ дали змогу ідентифікувати бактерії р. *Huphomicrobium*, характерною ознакою якого є утворення протек.

Усього під час дослідження виділено 10 культур залізо- та марганецьокиснювальних мікроорганізмів. Усі культури пересівали з рідкого на поживне середовище для зберігання. Для підтримання культури періодично пересівають на свіже поживне середовище.

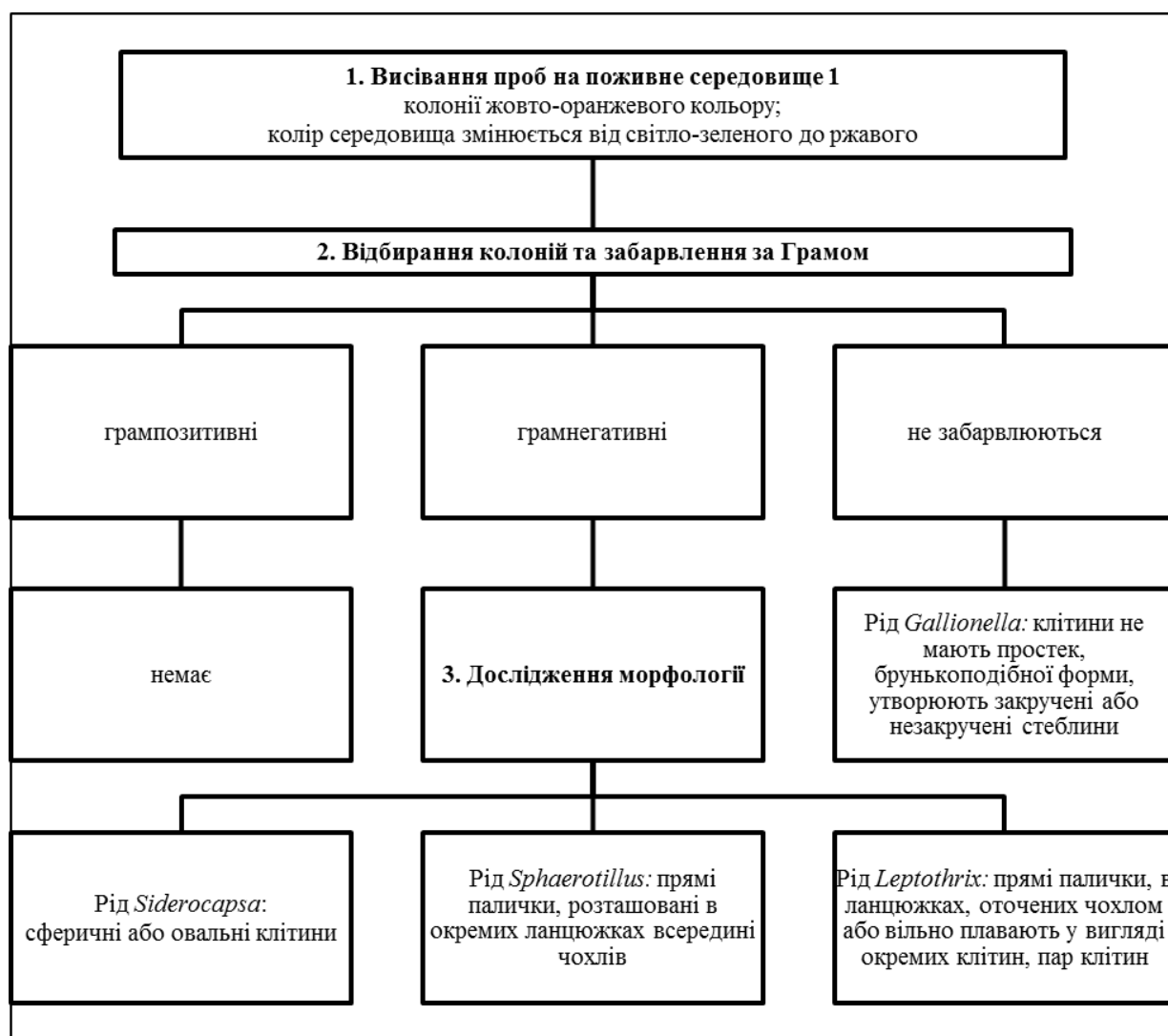


Рисунок 1. Методика виділення та ідентифікації залізоокиснювальних бактерій



Рисунок 2. Методика виділення та ідентифікації марганецьокиснювальних бактерій

Висновки. Розроблено та перевірено методики виділення й ідентифікації з поверхневих вод мікроорганізмів, які окислюють залізо та марганець. Цю методику може бути застосовано для швидкої ідентифікації відомих родів залізо- та марганецьокиснювальних мікроорганізмів порівняно зі способом добування селективних середовищ для кожного роду окремо [11].

Отримано 10 культур залізо- та марганецьокиснювальних мікроорганізмів, віднесених до шести родів: *Siderocapsa*, *Leptothrix*, *Sphaerotillus*, *Galionella*, *Metallogenium*, *Hurhomicrobium*. Виділені штами можуть бути рекомендовані до використання на практичних заняттях у вишах та застосовані у розробленні біотехнологій знезалізнення й деманганзації питної води.

Подальші дослідження в цьому напрямку необхідно спрямувати на розроблення стандартизованих методик для виділення залізо- та марганецьокиснювальних мікроорганізмів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Николадзе Г. И. Технология очистки природных вод / Г. И. Николадзе. – М. : Высш. шк. – 1987. – 479 с.
2. Кульский Л. А. Теоретические основы и технология кондиционирования воды / Л. А. Кульский. – К. : Наукова думка. – 1971.
3. Кульский Л. А. Технология очистки природных вод / Л. А. Кульский, П. П. Строкач. – К. : Вища. шк., 1986. – 352 с.
4. Николадзе Г. И. Улучшение качества подземных вод / Г. И. Николадзе. – М. : Стройиздат, 1987. – 240 с.

5. Золотова Е. Ф. Очистка воды от железа, марганца, фтора и сероводорода / Е. Ф. Золотова, Г. Ю. Асс. – М. : Стройиздат. – 1975. – 176 с.
6. Дрожжин О. С. Роль железобактерий в трансформации железа и марганца в грунтовых водах и использование их для очистки питьевой воды : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.16 / Олег Сергеевич Дрожжин. – Воронеж, 2001. – 20 с.
7. Приоритетные направления в технологии очистки подземных вод от железа / А. В. Мамченко [и др.] // Химия и технология воды. – 2009. – Т. 31, № 1. – С. 57 – 77.
8. Квартенко О. М. Використання закріпленої мікрофлори для очистки підземних вод з підвищеним вмістом заліза : автореф. дис. ... канд. техн. наук : 05.23.04 / Олександр Миколайович Квартенко. – Рівне, 1997. – 23 с.
9. Захарова Ю.Р. Микроорганизмы, окисляющие железо и марганец в донных осадках озера Байкал : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.16 / Захарова Юлия Робертовна. – Владивосток, 2007. – 21 с.
10. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Смита и др.; Пер. с англ. В 2 т. – М.: Мир, 1997.
11. Практикум по биологии почв: Учеб. пособие / Зенова Г. М., Степанов А. Л., Лихачева А. А., Манучарова Н. А. – М.: Издательство МГУ, 2002. – 120 с.

Кравченко А. В., Кузьминский Е. В., Панченко Е. С.

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К БИОТЕХНОЛОГИИ ОЧИСТКИ ПИТЬЕВОЙ ВОДЫ: МЕТОДИКИ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ЖЕЛЕЗО- И МАРГАНЕЦОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ

*В статье предложены методики выделения и идентификации железо- и марганецоксилирующих бактерий из поверхностных и подземных вод. В результате проверки предложенных методик было выделено культуры железо- и марганецоксилирующих микроорганизмов, отнесенных к шести родам: *Siderocapsa*, *Leptothrix*, *Sphaerotillus*, *Galionella*, *Metallogenium*, *Hyphomicrobium*.*

Ключевые слова: методики, железобактерии, марганецоксилирующие бактерии, водоподготовка, биотехнология подготовки питьевой воды.

O. Kravchenko, Ye. Kuzminskiy, O. Panchenko

METHODOLOGICAL APPROACHES TO THE BIOTECHNOLOGY OF DRINKING WATER PURIFICATION: METHODS OF ISOLATION AND IDENTIFICATION OF IRON AND MANGANESE-OXIDIZING BACTERIA

*The methodologies of isolation and identification of iron and manganese-oxidizing bacteria from surface and groundwater is proposed in the article. As a result of the verification of the proposed method, cultures of iron and manganese-oxidizing microorganisms were assigned to six genera: *Siderocapsa*, *Leptothrix*, *Sphaerotillus*, *Galionella*, *Metallogenium*, *Hyphomicrobium*.*

Key words: methodologies, iron bacteria, manganese-oxidizing bacteria, water treatment, biotechnology of drinking water preparation.

Рецензент: Хоружий В.П., д-р. техн. наук, професор, Київський національний університет будівництва і архітектури, м. Київ