

УДК 504.4.054:579.68

МИКРОБИОЦЕНОЗ СТОЧНЫХ ВОД**В.Б. Сбойчаков, О.В. Решетникова, А.А. Ганичева***Ленинградский государственный университет имени А.С. Пушкина, Лужский институт (филиал),
г. Луга, Россия*

Защита водного бассейна от загрязнений, образующихся в процессе очистки сточных вод, имеет в наше время огромное значение. Загрязнение водоемов, в которые сбрасывают сточные воды, отрицательно сказывается на состоянии его флоры и фауны. Для защиты водоемов от загрязнений определяются условия выпуска сточных вод, при которых качество воды в водных объектах не снижается ниже установленных предельно допустимых концентраций. Нависшая над человечеством угроза загрязнения всех водных бассейнов мира побуждает сосредоточить внимание на биологической очистке сточных вод, в основе которой лежат микробиологические процессы. Среди применяемых методов очистки сточных вод биологическая очистка является наиболее экономически рентабельной и доступной, а на практике она чаще всего оказывается единственно возможной [1, 8, 12, 13, 14].

Под микробиоценозом сточных вод в данном случае следует понимать совокупность популяций разных видов микроорганизмов, обитающих в промышленных сточных водах. В основе методов биологической очистки лежит использование микроорганизмов, разлагающих органические соединения в сточных водах. Чаще всего это аэротенки с активным илом из бактерий. Активный ил является своеобразным сообществом, довольно существенно отличающимся от природных экосистем. Адаптационные свойства организмов активного ила очень высоки. Данная экосистема подвержена постоянной изменчивости. До сих пор остается дискуссионным вопрос – обладают ли бактерии активного ила чувством кворума (quorum sensing), то есть способностью некоторых бактерий общаться и координировать своё поведение за счёт секреции молекулярных сигналов, как это бывает в биопленках [19].

Цель нашей работы состояла в изучении видового состава бактерий, участвующих в процессе очищения промышленных сточных вод Ленинградской области.

Пробы воды отбирали согласно ГОСТ РФ 5.592–2000 [2]. Идентификация выделенных культур осуществлялась на основании изучения тинкториальных свойств, культурально-морфологических и биохимических характеристик в соответствии с описанием, данным в определителе бактерий Bergey's «Manual of Systematic Bacteriology» [17, 21, 22]. Параллельно проводилась идентификация культур с помощью анализа 16S рДНК.

В составе сточных вод выявлены две основных группы поллютантов – консервативные и неконсервативные. Консервативные практически не поддавались биологическому разложению. Это частицы грунта, руды, пустой породы, шлак, неорганические соли тяжёлых металлов, фенолы, пестициды и т. д. В то же время неконсервативные поллютанты (нефтепродукты, органические кислоты и пр.) успешно подвергались процессам самоочищения водоёмов [8, 10].

Биологический метод очистки сточных вод основан на способности бактерий использовать растворенные и коллоидные органические поллютанты в качестве источника питания и минерализовать их в процессе своей жизнедеятельности.

В аэробных условиях (аэротенки) при непрерывной подаче воздуха идет наращивание активного ила. По сути, биологическая очистка сточных вод представляет собой результат функционирования системы «активный ил – сточная вода». Биологическую очистку сточных вод проводили с целью удаления из них взвешенных и растворимых органических и неорганических соединений до концентраций, которые не превышают заранее регламентированные. Большинство бактерий, принимающих участие в очистке, являются гетеротрофами, потребляя только органические вещества. Это, как правило, представители водной микробиоты и некоторые обитатели желудочно-кишечного тракта человека и животных, поступающие с фекальными стоками.

Все микроорганизмы, находящиеся в аэротенке, попадали в него из внешних источников: вместе со сточной водой, из почвы и воздуха, заносились насекомыми. В условиях аэротенка происходила селекция микроорганизмов. Наиболее интенсивно развивались те бактерии, которые находят для себя благоприятные условия, в то время как другие виды подавлялись. Факторами, определяющими направление селекции следует считать степень аэрации, состав загрязнений, температуру, скорость роста, и др. [9]. Численность бактерий составляла от 10^9 – 10^{12} КОЕ/см³.

При аэробной очистке сточных вод протекают два наиболее важных микробиологических процесса:

- окисление органического углерода;
- процессы нитрификации.

Для оптимальной работы активного ила необходимо присутствие трех основных групп бактерий:

- углеродоокисляющих флоккулообразующих, участвующих в образовании хлопьев, для быстрого осаждения в отстойнике с образованием плотного ила;
- углеродоокисляющих нитчатых, обеспечивающих формирование «скелета» вокруг которого образуются флоккулы, помимо этого они являются активными окислителями органических веществ;
- нитрификаторов, превращающих аммонийный азот в нитриты и нитраты.

В составе флоккулообразующих бактерий были выявлены микроорганизмы следующих родов: *Actinomyces*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Cellulovibrio*, *Corynebacterium*, *Desulfotomaculum*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Sarcina* и другие.

Бактерии рода *Brevibacterium* окисляют различные компоненты нефти, парафины, нафтены, фенолы, альдегиды, жирные кислоты. Это весьма актуально для очистки именно промышленных стоков. Окисление алифатических углеводородов происходит за счет бактерий рода *Bacillus*, углеводородов различных групп – *Mycobacterium*, а целлюлозы – за счет бактерий рода *Cellulomonas*.

Большая роль в формировании способности активного ила к хлопьеобразованию принадлежит бактериям рода *Zoogloea* (*Z. ramigera*), близким к псевдомонадам. Они разлагают широкий спектр загрязнений в сточной воде. В сточной воде *Z. ramigera* образовывали аморфные массы полисахаридов, в которых и находились колонии бактерии, напоминающие ветвистые деревья. Клетки *Z. ramigera* обнаруживались как правило в сильно загрязненных водоемах, где наблюдали взвешенные в воде хлопья, слизистые обрастания (зооглеи) на находящихся в воде предметах.

Нитчатые бактерии отвечают за окисление многочисленных органических соединений и образование каркаса, вокруг которого формируются флоккулы [5]. Систематическая принадлежность нитчатых бактерий определялась с помощью различных методов окрашивания. Эти методы основаны на способности микроорганизмов поглощать определенные красители-флюорохромы, в результате люминесценции бактерии приобретали четкие очертания, выявлялись наличие и формы трихом, строение оболочки, присутствие зерен волютина. На основании этого и устанавливалась их родовая принадлежность.

В то же время данные бактерии являются основной причиной плохого осаждения ила в отстойнике и образования так называемого «вспухания». Вспухание активного ила – это реакция биоценоза на неблагоприятные экологические условия [11]. При большом количестве поступающих органических веществ активный ил не способен к их быстрому окислению. Возникает недостаток кислорода в иловой смеси, бактерии-гетеротрофы заменяются более устойчивыми нитчатыми бактериями родов *Sphaerotilus*, *Beggiatoa*, *Thiotrix* и др. При этом нарушаются флоккуляционные свойства, осаждение активного ила. Происходит вынос ила из вторичных отстойников. Все это приводит к ухудшению качества очищенных сточных вод.

Целесообразно различать гелевое вспухание ила в связи с преобладанием полисахаридопродуцирующих бактерий (роды *Zoogloea*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Paracoccus*). Нитчатое же вспухание возникает при чрезмерном развитии и накоплении бактерий с нитчатой структурой (хламидобактерии родов *Sphaerotilus*, *Thiothrix*, *Beggiatoa*, нитчатые сине-зеленые водоросли и сапрофитные грибы).

Денитрификация во вторичных отстойниках приводит к формированию пузырьков азота, что затрудняет устранение ила из сточных вод на выходе. Бактерии-нитрификаторы (представители родов *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*) выполняют роль окислителей аммонийных ионов и выводят минеральный азот из стоков. Пока в сточной воде присутствуют органические вещества, аммиак потребляется гетеротрофами. После того как органические вещества минерализуются, начинают действовать нитрификаторы.

Нитрификаторы (*Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus*) окисляют аммиак до нитритов. Затем другая группа нитрификаторов (*Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrococcus*) окисляет нитриты до нитратов. Большинство нитрифицирующих бактерий являются автотрофами, их рост угнетается в присутствии органических веществ. Гетеротрофные бактерии-нитрификаторы растут довольно медленно и не могут конкурировать с остальными гетеротрофами за пищевые субстраты и кислород.

Поскольку в сравнении с гетеротрофными углеродоокисляющими бактериями нитрификаторы развиваются гораздо медленнее, то в связи с этим производительность аэротенка может существенно снижаться. Наиболее активно процессы нитрификации протекают после окисления так называемой «органики». Для очищения сточных вод целесообразно использовать бактерии, способные принимать участие в процессе, известном под названием «анаммокс» (анаэробное окисление аммония) [18,20]. Бактерии, осуществляющие анаммокс, относятся к типу планктомицетов. Это представители родов *Kuenenia* (*K. stuttgartiensis*), *Brocadia* (*B. anammoxidans*, *B. fulgida*, *B. sinica*), *Anammoxoglobus* (*A. propionicus*), *Jettenia* (*J. asiatica*), *Scalindua* (*S. brodae*, *S. sorokinii*, *S. wagneri*, *S. profunda*).

В бактериях, осуществляющих анаммокс, содержатся так называемые аннаммоксосомы, в которых и происходит процесс анаммокса. Кроме того, их мембраны содержат особые ладдерановые липиды. Эти бактерии отличаются низкой скоростью роста: время удвоения численности составляет несколько недель. Они способны осуществлять превращения субстратов анаммокса (аммоний и нитриты) даже при очень низкой их концентрации. Ферменты этих бактерий, осуществляющие катаболические реакции анаммокса, придают клеткам характерный красный цвет.

Грамотрицательные бактерии кокковой флоры вида *Paracoccus denitrificans* совместно с *Nitrosomonas euroaеа* обладали более высокой способностью восстанавливать нитрит до газообразного азота, что существенно упрощало процесс удаления азота из сточных вод [23].

Нитрифицирующие бактерии целесообразно использовать в качестве индикаторов процесса очистки, поскольку их появление в очищаемой воде свидетельствует о минерализации основной части органических веществ.

При очищении стоков с большим содержанием углеводов и дефицитом азота имело место интенсивное развитие гетероферментативных молочнокислых бактерий рода *Leuconostoc*, которые образуют мощную декстрановую капсулу, затрудняющую осаждение ила во вторичном отстойнике.

При недостаточном уровне аэрации развивались анаэробные процессы с участием микроорганизмов, осуществляющих маслянокислое брожение, сульфатредукцию, денитрификацию и т. д. В сточных водах с высоким содержанием серы при недостатке кислорода в иловой смеси, при наличии в сточных водах токсичных веществ (медь, цинк и т. д.) в активном иле развивались сульфатредукторы, тионовые и серобактерии (наиболее часто встречались бактерии рода *Thiobacillus*). Тионовые микроорганизмы развивались при условии содержания в стоках восстановленных соединений серы. Группу серобактерий объединяет свойство откладывать капли серы внутри клеток или на их поверхности. Бесцветные серные бактерии родов *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Leucothrix* и др. способны формировать длинные нити. В качестве окисляемого субстрата эти бактерии используют сероводород, при недостатке сероводорода сера окисляется в серную кислоту.

Сульфатредукцию осуществляли не только сульфатвосстанавливающие бактерии известных родов, но также метанообразующие архебактерии и отдельные гетеротрофы, которые способны растворять оксиды свинца, меди, марганца, кадмия, цинка, урана, с последующим фотохимическим разложением в аэробных условиях.

В составе активного ила довольно часто обнаруживались грибы, развитию которых способствовала кислая реакция среды, хотя их количество было незначительным: *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* и другие.

При высоком содержании соединений железа, характерном для водных источников Северо-Запада России, в активном иле выявляли микроорганизмы рода *Ferrobacillus*.

Литические микроорганизмы и бактерии-паразиты рода *Bdellovibrio*, присоединяясь к клеткам других бактерий, проникали в них и размножались, что приводило к лизису. Литические микроорганизмы разрушали клетки других бактерий за счет воздействия выделяемых ими литических ферментов.

В активном иле часто присутствовали фототрофные цианобактерии, переходящие к гетеротрофному питанию. Это приводило к утрате ими пигментов, и клетки цианобактерий становились бесцветными. Во вторичных отстойниках клетки цианобактерий часто приобретали зеленую окраску, а в местах сильного освещения – типичную сине-зеленую. Наиболее часто встречались цианобактерии родов *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Osillatoria*. Цианобактерии устойчивы к воздействию неблагоприятных факторов среды, а также токсикантов, поэтому они могут достигать значительной численности в активном иле аэротенков и также вызывать взвухание. Они способны вызывать и эвтрофикацию водоемов.

Биомасса активного ила, участвующего в анаэробном разложении, состояла из двух основных групп бактерий:

- кислотообразующих;
- метаногенных.

Наиболее многочисленными (до 80 % от численности бактерий активного ила) бактериями являлись микроорганизмы рода *Pseudomonas*. В принципе, все природные органические и даже синтетические соединения могут разлагаться псевдомонадами. Широкие ферментативные возможности позволяют некоторым видам бактерий рода *Pseudomonas* разлагать антисептики, дезинфектанты, толуол, бензол, этилбензол, нафталин, каучук, резины, смазочные масла и т. д. [16].

Наиболее часто обнаруживались виды *P. stutzeri*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. rahtoni* и др. Различные виды рода *Pseudomonas* способны вызывать превращение хлорорганических соединений, и в том числе пестицидов, восстанавливать нитрогруппу нитроароматических соединений до газообразных продуктов с последующим разрывом бензольного кольца, использовать капролактамы в качестве единственного источника углерода и азота. Некоторые виды рода *Pseudomonas* способны разрушать серосодержащие соединения, в частности поверхностно-активные вещества (ПАВ) – соли сложных эфиров серной кислоты и алкилсульфонаты. Ацетат при утилизации его псевдомонадами разлагается на CO_2 и H_2O .

К активным деструкторам, часто встречающимся на очистных сооружениях, относятся представители рода *Bacillus*. Бактерии этого рода имеют палочковидную форму, образуют споры, большинство видов подвижны, некоторые из них способны к хлопьеобразованию. *B. subtilis* и *B. mesentericus* относятся к наиболее активным деструкторам капролактама в гексаметилендиамина. Эти же бациллы окисляют алифатические углеводороды.

В активном иле практически всегда присутствовали актиномицеты (родов *Gordonia*, *Rhodococcus*). Из-за присутствия актиномицетов активный ил обладал землисто-плесневым запахом за счет летучих продуктов своей жизнедеятельности (2-метилизоборнеол и геосмин).

Благодаря разнообразию видов кислотообразующих микроорганизмов жизнедеятельность биоценоза анаэробного ила довольно устойчива к изменению кислотности окружающей среды. В то же время слишком высокое содержание органических кислот способно подавить стадию ацетогенеза – разложение до уксусной кислоты.

Группа метаногенных бактерий именуется по конечному продукту процессов жизнедеятельности – метану. Эта группа была представлена метановыми археями нескольких видов, которые в качестве питательной среды используют продукты жизнедеятельности кислотообразующих бактерий. Образование метана происходит с использованием двух механизмов. При реакции первого типа микроорганизмы окисляют метиловый спирт и уксусную кислоту, выделяя при этом метан и углекислый газ. Реакции второго типа характерны для бактерий, использующих выделяющийся в реакциях первого типа углекислый газ, а также водород, образующийся при распаде карбоновых кислот и сложных спиртов. Оба процесса протекают одновременно, в результате чего образуется смесь газов, состоящая на 70 % из метана и на 30 % – из диоксида углерода.

В отличие от кислотообразующих, метаногенные бактерии чувствительны к показателям кислотности окружающей среды и реагируют даже на повышение концентрации солей азотной и серной кислоты. Кроме того, уровень комфортной температуры для метаногенных микроорганизмов находится в пределах 35–40⁰С. При большем содержании ионов водорода метаногенные бактерии погибают, в результате чего процесс разложения приостанавливается на стадии накопления жирных кислот, что впоследствии приводит к полному его прекращению [15].

Помимо бактерий в активном иле выявляли и простейших (инфузории, коловратки, тихоходки, водные клещики и т. д.).

Качество очищения сточных вод определялось содержанием в них бактерий группы кишечных палочек (БГКП), колифагов, сульфатредуцирующих клостридий. Обязательным условием являлось отсутствие в воде патогенных микроорганизмов [3, 4, 6, 7].

В результате такой полезной деятельности бактерий сточные воды очищаются настолько, что преобразовываются в техническую прозрачную воду без запаха и цвета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Водный кодекс Российской Федерации (с изменениями на 27 декабря 2018 года; редакция, действующая с 1 июля 2019 года)
2. ГОСТ РФ 5.592–2000 «Вода. Общие требования к отбору проб»
3. СанПиН 2.1.5.980–00 «Гигиенические требования к охране поверхностных вод»
4. СанПиН 2.1.5.2582–10 «Санитарно-эпидемиологические требования к охране прибрежных вод морей от загрязнения в местах водопользования населения»
5. Методы санитарно-биологического контроля. Методическое руководство по гидробиологическому контролю нитчатых микроорганизмов активного ила (ПНД Ф СБ 14.1.92–96)
6. МУ 2.1.5.800 – 99 «Организация Госсанэпиднадзора за обеззараживанием сточных вод»
7. МУК 4.2.1884–04 «Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов»
8. Голицин, А.Н. Промышленная экология и мониторинг загрязнения природной среды / А.Н. Голицин. – М.: Изд-во «Оникс», 2007. – 331 с.
9. Григорьева, К.И. Проект аэробной очистки сточных вод для водочистительных станций / К.И. Григорьева, Л.П. Сидорова // Фундаментальные и прикладные исследования в области естественных и технических наук: Материалы Межд. науч.-практ. конф. – Белгород, 2018. – С. 60–64.
10. Грушко, Я.М. Вредные органические соединения в промышленных сточных водах / Я.М. Грушко. – Л.: Химия, 1982, – 142 с.
11. Жмур, Н.С. Биологические системы очистки / Н.С. Жмур – М.: Акварос, 2003. – 507 с.
12. Ивчатов, А.Л. Химия воды и микробиология / А.Л. Ивчатов – М.: ИНФРА-М, 2006. – 218 с.
13. Калмыков, А.А. Возможности утилизации отходов на очистных сооружениях / А.А. Калмыков // Экология производства. – 2017. – № 6. – С. 50–56.
14. Новиков, Ю.В. Экология, окружающая среда и человек / Ю.В. Новиков. – М.: ФАИР-ПРЕСС, 2005. – 736 с.
15. Троценко, Ю.А. Аэробные метиловобактерии / Ю.А. Троценко, Н.В. Доронина, М.Л. Торгонская // Пушкино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2010. – 325 с.
16. Убайдуллаева, А.К. Восстановление нитратов культурой *P. stutzeri*, иммобилизованных на различных носителях // А.К. Убайдуллаева, К.К. Байтурсунов, Г.Н. Асанова, А.А. Мустафаева // Вестник КазНМУ. – 2018. – № 1. – С. 266–268
17. Bergey's manual of determinative bacteriology, 1974 eighth edition, 1268 p.
18. Boumann, H.A. Biophysical properties of membrane lipids of anammox bacteria / H.A. Boumann, M. Longo, P. Stroeve, B. Poolman // Biochimica et biophysica acta. – 2009. – Vol. 1788, № 7. – P. 1444–1451
19. Fuqua, W.C. Quorum Sensing in Bacteria: the LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators / W.C. Fuqua, S.C. Winans, E.P. Greenberg // J. of Bacteriology. – 1994. – Vol. 176, № 2. – P. 269–275
20. Jetten, M.S. Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria / M.S. Jetten, L. Niftrik, M. Strous, B. Kartal B. // Critical reviews in biochemistry and molecular biology. – 2009. – Vol. 44, №. 2–3. – P. 65–84
21. The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria, 1981, volume 1, 1102 p.
22. The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria, 1981, volume 2, p. 1103–2284.
23. Ter Beek, J. The nitric-oxide reductase from *Paracoccus denitrificans* uses a single specific proton pathway / J. Ter Beek, N. Krause, J. Reimann, P. Lachmann, P. Adelroth // J. Biol. Chem. - 2013. – Vol. 288, № 42. – P. 30626–30635