

БИОИНДИКАЦИЯ

процесса очистки металлсодержащих СТОЧНЫХ ВОД С АНАЛИЗОМ РАЗВИТИЯ микробных сообществ биофильтра

Рассмотрено влияние компонентов промышленных сточных вод завода грузовых автомобилей Daimler AG на микробиоценоз биофильтров очистных сооружений данного предприятия по результатам физико-химического анализа состава сточных вод, а также по данным исследования образцов биопленки с использованием методов светопольной микроскопии и флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH).

Введение

Оценка качества среды и антропогенных изменений в водных экосистемах может производиться как по их физико-химическим характеристикам, так и с применением методов биологического контроля. Оба подхода имеют свои преимущества и недостатки.

Анализ физико-химических характеристик среды предоставляет непосредственные сведения о составе среды; при этом в ней регистрируются конкретные количественные изменения. Однако охарактеризовать токсичность среды в этом случае оказывается недостаточным, т.к. главный критерий – реакция на нее биоты остается неучтенным.

Преимущество использования методов биологического контроля среды – биотестирования и биоиндикации заключается в их большей надежности и объективности. Состояние биоты определяется токсичностью и составом среды и отчетливо иллюстрирует негативное воздействие любого происхождения, независимо от учета и степени изученности параметров среды. Но, адекватно отражая степень негативного воздействия среды в целом, биоиндикация не объясняет, какими именно факторами оно создается. Поэтому наиболее эффективным оказывается сочетание обоих подходов [1].

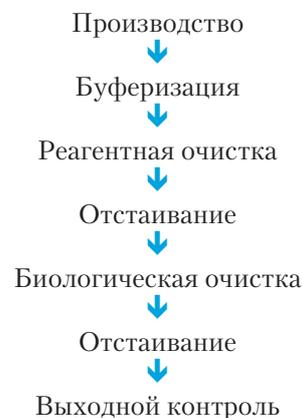
А.А. Халилова*, инженер, ФГБОУ ВПО «Казанский национальный исследовательский технологический университет»

А.С. Сироткин, доктор технических наук, профессор, заведующий кафедрой промышленной биотехнологии, ФГБОУ ВПО «Казанский национальный исследовательский технологический университет»

Цель исследования – изучение влияния компонентов промышленных сточных вод (СВ) завода грузовых автомобилей Daimler AG на микробиоценоз биофильтров очистных сооружений данного предприятия по результатам физико-химического анализа состава СВ и образцов биопленки с использованием методов светопольной микроскопии и флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH).

Материалы и методы исследования

На очистных сооружениях завода Daimler AG – Woerth (Германия) применяется следующая схема очистки сточных вод:



Для биологической очистки применяются два последовательно функционирующих капельных биофильтра высотой 8 м каждый и высотой загрузочного материала 6 м. Производительность биофильтра составляет 165 м³/сут. В качестве носителя для биопленки используются вулканические камни (рис. 1).

* Адрес для корреспонденции: albina.khalilova@gmail.com

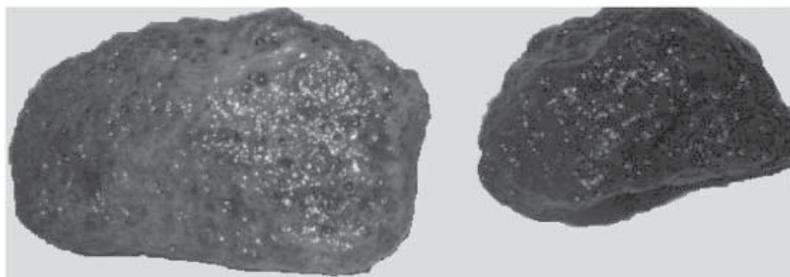


Рис. 1. Загрузочный материал биофильтров – вулканические камни.

Для определения состояния микробиоценоза биопленки при повышении концентрации органических веществ, а также влияния ионов Ni^{2+} , характерных для состава исследованных СВ, был проведен модельный эксперимент с использованием лабораторного биофильтра, который имел следующие эксплуатационные характеристики: высота реактора 87 см, внутренний диаметр 5 см, общий объем 5 дм³, производительность насоса 0,3 м³/ч (рис. 2). В качестве носителя для биопленки и инокулята использовались вулканические камни, отобранные из промышленных биофильтров.

Для инокуляции лабораторного биофильтра в течение 7 сут подавалась СВ, отобранная из промышленных очистных сооружений.

Для исследования процессов биоиндикации в лабораторном биофильтре использовалась промышленная СВ с искусственным внесением хлорида никеля $NiCl_2$.

Результаты и их обсуждение

Изучение индикаторных организмов, характерных для биоценоза биофильтров очистных сооружений, проводилось при помощи светопольной микроскопии. Выявлено присутствие таких организмов как коловратки, черви, прикрепленные инфузории, свободноплавающие инфузории и жгутиковые, циклопы, водные клещи, нитчатые бактерии.

Присутствие организмов-индикаторов в биопленке определялось как качественно, так и количественно. Для количественного учета индикаторных организмов в образцах биопленки применялась пятибалльная система [2]:

- 1 – единичное нахождение (1-2);
- 2 – мало (3-9);
- 3 – (10-15);
- 4 – много (16-25);
- 5 – в массе (>25).

В процессе экспериментального наблюдения промышленного процесса очистки СВ была выявлена зависимость числа индикаторных

организмов в образцах биопленки из двух биофильтров от изменения концентрации органических веществ в поступающей СВ (рис. 3, 4).

Из-за протекания процесса сукцессии в системе биофильтров не представлялось возможным выделить какую-либо одну группу организмов, приоритетную для биоиндикации. Тем не менее, основным биоиндикатором биопленки являлись черви как постоянные представители биоценоза.

Организмы, идентифицированные в составе биопленки, взятой из биофильтра 1, представлены в табл. 1.

Из полученных данных следует, что количество организмов зависит от концентрации органических веществ в поступающей СВ. Увеличение ХПК приводит к росту общего числа индикаторов в биопленке.

В ходе исследования биоценоза биофильтра 2 были обнаружены индикаторные организмы, представленные в табл. 2.

При этом следует отметить, что биофильтр 2 характеризуется меньшим представительством групп организмов из-за истощения биопленки вследствие недостатка питательных веществ в СВ, очищенной в биофильтре 1.

Из данных рис. 5 видно, что существует диспропорция в концентрации органических веществ в СВ, поступающих на очистку в биофильтры 1 и 2. Значения ХПК СВ, поступающей в биофильтр 2 после биофильтра 1, не превышали 50 мгО₂/дм³. Также следует отметить, что эффективность очистки СВ по ХПК в биофильтре 2 составляла не более 30%. Таким образом, биоценоз второго био-

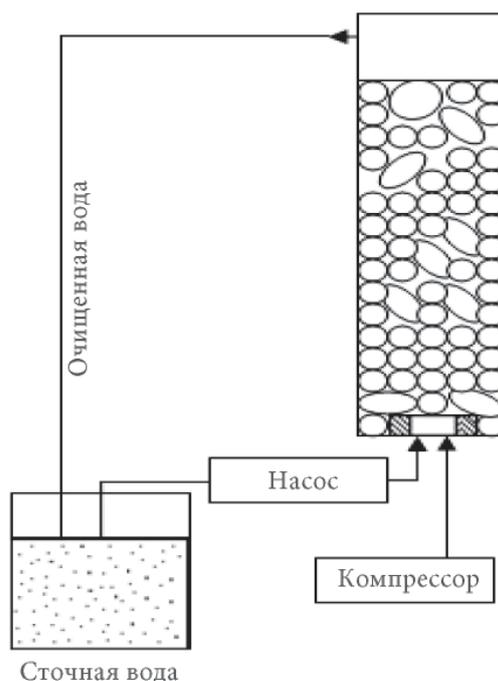
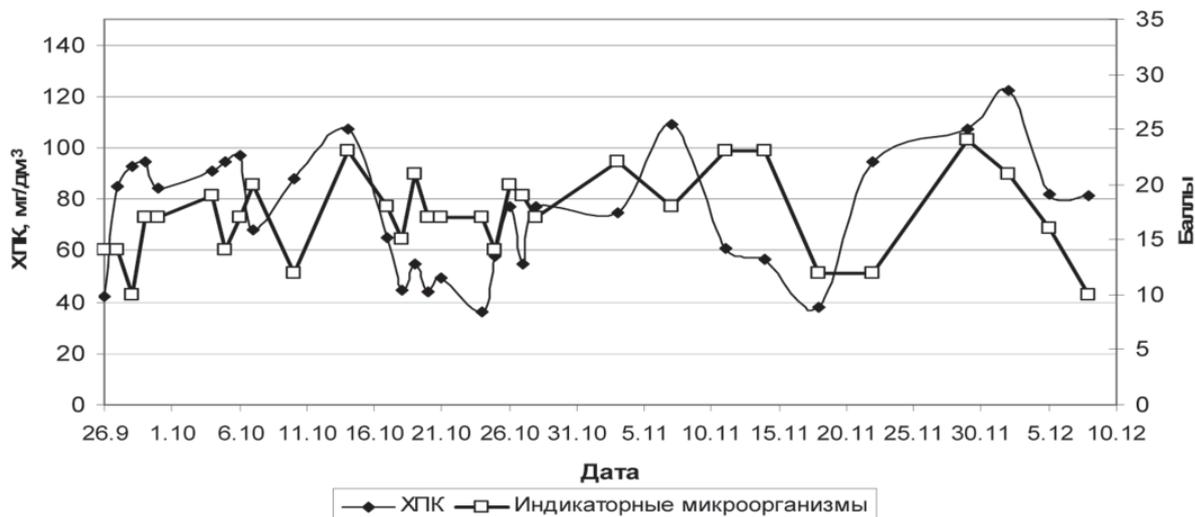


Рис. 2. Схема модельной биофильтрационной системы.



↑ **Рис. 3.** Зависимость суммарного количества индикаторных организмов от концентрации органических веществ в СВ, поступающей на биофильтр 1.

↓ **Рис. 4.** Зависимость суммарного количества индикаторных организмов от концентрации органических веществ в СВ, поступающей на биофильтр 2.



↓ **Рис. 5.** Кинетика концентрации органических веществ в процессе биофильтрации СВ.

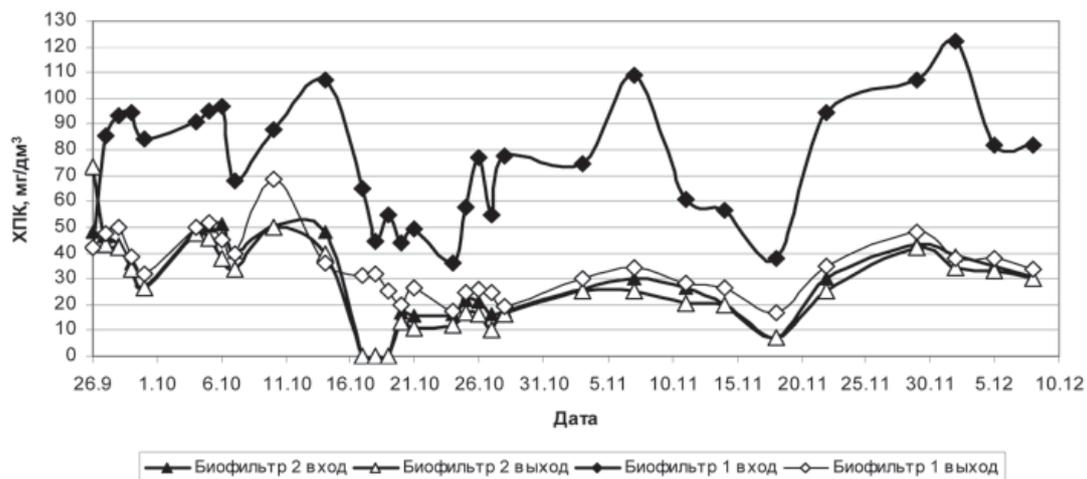


Таблица 1

Количественный и качественный состав индикаторных организмов биопленки в биофилт্রে 1

Дата	Индикаторные организмы, баллы							Сумма
	Свободно-плавающие	Прикрепленные	Коловратки	Черви	Амебы	Водные клещи	Циклопы	
26.9	5	2	1	5	–	1	–	14
27.9	5	5	–*	3	1	–	–	14
28.9	3	3	–	4	–	–	–	10
29.9	4	5	4	4	–	–	–	17
30.9	3	2	5	4	–	3	–	17
4.10	5	5	4	5	–	–	–	19
5.10	2	5	4	3	–	–	–	14
6.10	3	4	5	5	–	–	–	17
7.10	5	5	5	3	–	2	–	20
10.10	5	3	1	3	–	–	–	12
14.10	4	4	5	4	2	4	–	23
17.10	5	3	2	3	4	1	–	18
18.10	3	2	3	4	2	1	–	15
19.10	4	4	4	5	3	1	–	21
20.10	3	5	3	4	1	1	–	17
21.10	4	3	3	5	1	1	–	17
24.10	3	2	4	4	3	–	1	17
25.10	3	3	2	4	1	1	–	14
26.10	4	1	5	5	1	3	1	20
27.10	5	5	2	5	1	1	–	19
28.10	4	2	2	4	3	1	1	17
3.11	3	5	5	5	2	2	–	22
7.11	5	4	4	3	2	–	–	18
11.11	5	5	3	4	2	3	1	23
14.11	5	4	2	5	2	4	1	23
18.11	3	2	1	4	2	–	–	12
22.11	2	4	1	2	–	–	3	12
29.11	5	5	4	5	1	3	1	24
2.12	5	5	2	5	1	3	–	21
5.12	3	3	1	5	–	3	1	16
8.12	3	2	–	3	2	–	–	10

* – данный организм не обнаружен

филтра в каскаде находится в условиях лимитирования по субстрату.

Флуоресцентная *in situ* гибридизация

Экспериментальные наблюдения промышленного процесса биофилтрации СВ проводились в течение более двух месяцев (рис. 3-5, табл. 1, 2). В этот период содержание аммонийного азота в поступающей воде не превышало 3 мг/дм³. Однако по данным многолетнего контроля очистных сооружений в процессе эксплуатации биофилтров возникали проблемы с повышенным содержанием неорганических соединений азота в СВ. Поэтому в ходе дальнейшего анализа в

составе биопленки с использованием метода флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) идентифицировались микроорганизмы, участвующие в процессах аэробного превращения соединений азота – нитрификации (*β-proteobacterial ammonia-oxidizing bacteria*, *p. Nitrospira*, *p. Nitrobacter*), а также анаэробного превращения азота – денитрификации (*Azoarcus/Thauera cluster*). Кроме того, идентификации подвергались микроорганизмы-гетеротрофы *Zoogloea ramigera*. Метод флуоресцентной *in situ* гибридизации основан на гибридизации (связывании) специфических флуоресцентно окрашенных олигонуклеотидных зондов с комплементар-

Таблица 2

Количественный и качественный состав индикаторных организмов биопленки в биофилт্রে 2

Дата	Индикаторные организмы, баллы					
	Коло- вратки	Черви	Свободно- плавающие	Прикреп- ленные	Амебы	Сумма
26.9	–*	–	–	–	–	–
27.9	–	–	–	–	–	–
28.9	–	–	–	–	–	–
29.9	1	1	–	–	–	2
30.9	–	–	–	–	–	–
4.10	1	–	–	–	–	1
5.10	1	–	–	–	–	1
6.10	1	1	–	–	–	2
7.10	–	–	–	–	–	–
10.10	–	1	–	–	–	1
14.10	–	3	1	–	2	6
17.10	–	3	–	–	1	4
18.10	1	3	1	–	2	7
19.10	1	2	1	–	1	5
20.10	–	2	1	–	2	5
21.10	–	2	1	–	1	4
24.10	1	3	1	–	1	6
25.10	1	1	–	–	–	2
26.10	1	3	1	–	2	7
27.10	1	2	1	–	1	5
28.10	–	3	1	1	2	7
3.11	1	2	1	–	2	6
7.11	2	3	–	1	3	9
11.11	1	3	–	1	2	7
14.11	2	4	–	1	2	9
18.11	1	3	1	1	2	8
22.11	–	1	1	–	1	3
29.11	2	2	–	1	1	6
2.12	1	4	1	3	2	11
5.12	–	3	1	1	1	6
8.12	3	3	1	–	–	7

* – данный организм не обнаружен

ными участками 16S или 23S рРНК объектов идентификации. Для идентификации нитрифицирующих и денитрифицирующих бактерий использовались генные зонды, указанные в табл. 3 [3].

Микроскопирование образцов биопленок с отдельными гибридизированными и окрашенными культурами осуществлялось с помощью микроскопа Axioskop Carl Zeiss, Jena (Germany) с применением прикладного программного обеспечения AxioVision 3.1 (Carl Zeiss Vision GmbH, Bildanalyse Systeme) для обработки полученных изображений (рис. 6, 7).

Аммонийокисляющие бактерии, идентифицированные в составе биопленки, встречаются одиночными клетками или небольшими скоплениями (рис. 6 в). Их развитие лимитировано невысоким содержанием аммонийного азота в поступающей СВ. В виде отдельных клеток обнаруживались микроорганизмы–гетеротрофы, в том числе денитрификаторы (рис. 6 а, б).

Полученные данные свидетельствуют о преимущественном развитии в составе микробного консорциума гетеротрофов – денитрификаторов *Zoogloea ramigera*, а также нитритокисляющих микроорганизмов р. *Nitrobacter* (рис. 7). Развитие последних позволяет охарактеризовать протекание процесса нитрификации с высокой степенью глубины окисления азота.

Биоиндикация микробных сообществ в модельном биофилт্রে

Биоиндикация процесса биофилтрации СВ в модельном биофилт্রে осуществлялась систематически в течение 24 ч по показателям СВ и состоянию биопленки в ответ на содержание в поступающей СВ органических веществ, а также ионов никеля.

На первом этапе изучалось влияние концентрации органических веществ на состояние

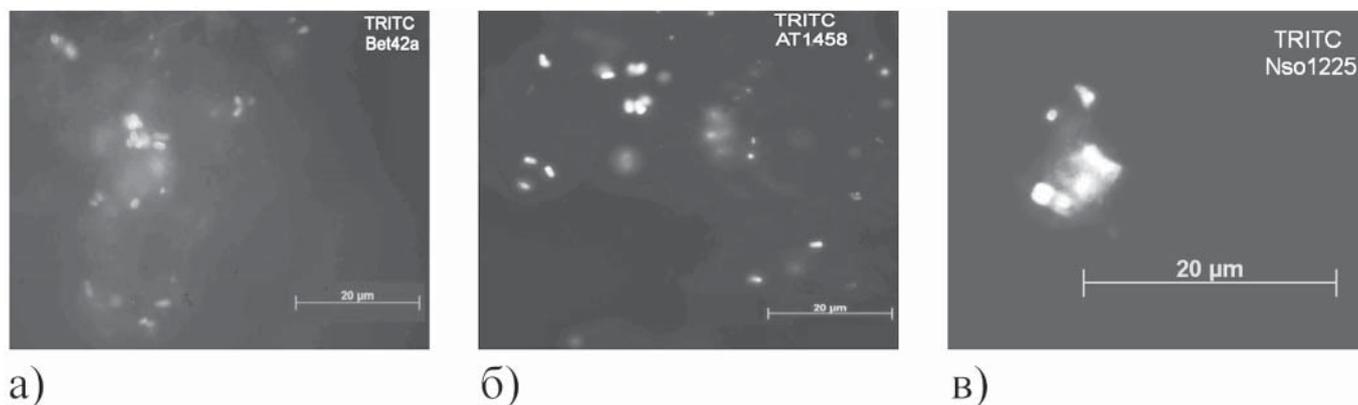


Рис. 6. Бактериальные клетки: а) β -proteobacteria; б) *Azoarcus/Thauera*; в) β -proteobacterial ammonia-oxidizing bacteria.

Таблица 3

Характеристика использованных генных зондов

Наименование зонда	Последовательность нуклеотидов (5'-3')	Определяемые микроорганизмы	Литературные источники
Bet42a	GCC TTC CCA CTT CGT TT	<i>β-proteobacteria</i>	Manz et al., 1992
Nso1225	CGC CAT TGT ATT AGC TGC TGT GA	<i>β-proteobacterial ammonia-oxidizing bacteria</i>	Mobarry et al., 1996
Ntspa685	CAC CGG GAA TTC CGC GCT CCT C	<i>Nitrospira moscoviensis, Nitrospira marina and 710-9 clone</i>	Hovanec et al., 1998
NIT3	CCT GTG CTC CAT GCT CCG	<i>Genus Nitrobacter</i>	Wagner t al., 1996
AT 1458	GAA TCT CAC CDT GGT AAG CGC	<i>Azoarcus/Thauera</i>	Rabus et al., 1999
ZRA23a	CTG CCG TAC TCT AGT TAT	<i>Zoogloea ramigera</i>	Rosello-Mora et al., 1995

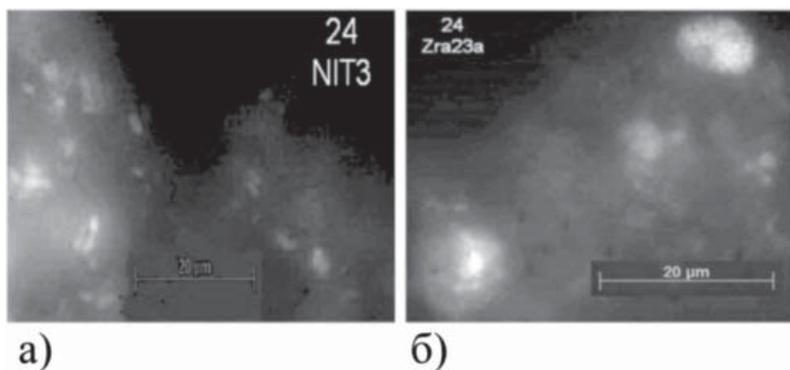


Рис. 7. Бактериальные клетки: а) Genus Nitrobacter; б) Zoogloea ramigera.

индикаторных организмов. Результаты представлены на *рис. 8* и в *табл. 4*.

Из полученных результатов следует, что наилучшее развитие микрофлоры биопленки отмечено при ХПК поступающей СВ, не превышающем 350 мгО₂/дм³. При дальнейшем повышении концентрации органических веществ наблюдалось подавление развития организмов биопленки. Однако даже

Рис. 8. Изменение суммарного количества индикаторных организмов в зависимости от концентрации органических веществ в СВ.



при концентрации ХПК свыше 2000 мгО₂/дм³ не происходило полного угнетения биоценоза.

На втором этапе лабораторных исследований изучалось состояние биоценоза биопленки при увеличении концентрации ионов Ni²⁺ в СВ, поступающей на очистку. Полученные результаты приведены на *рис. 9* и в *табл. 5*. Следует отметить, что концентрация ХПК не превышала 150 мгО₂/дм³.

Концентрация ионов Ni²⁺ в производственной СВ, поступающей на биологическую очистку, не превышала 0,5 мг/дм³. При этом из производственного опыта известно, что в течение года в ней регистрируется повышение концентрации ионов никеля.

Таким образом, биопленка, отобранная для исследований из промышленных биофильтров, получена в условиях постоянного присутствия ионов Ni²⁺ в концентрациях, не превышающих значения ПДК. Поэтому увеличение концентрации ионов металла до 1 мг/дм³ не вызывает у микробиоценоза значительного отрицательного ответа. Дальнейшее повышение концентрации токсиканта приводит к уменьшению числа и разнообразия индикаторных организмов.

Таблица 4

Количественный и качественный состав индикаторных организмов биопленки в модельном биофилт্রে при увеличении концентрации ХПК

Дата	Индикаторные организмы, баллы							Сумма
	Свободно-плавающие	Прикрепленные	Коловратки	Черви	Амебы	Водные клещи	Циклопы	
14.11	4	5	3	4	1	3	1	21
15.12	5	5	2	5	1	-*	-	18
16.12	4	5	1	5	1	2	-	18
17.12	5	3	1	4	1	3	1	18
18.12	5	2	1	4	1	1	-	14
21.12	3	3	1	4	2	-	1	14
22.12	2	1	1	3	1	1	-	9

* – данный организм не обнаружен

Таблица 5

Количественный и качественный состав индикаторных организмов биопленки, сформировавшейся в модельном биофилт্রে с добавлением ионов Ni^{2+}

Дата	Индикаторные организмы, баллы						Сумма
	Свободно-плавающие	Прикрепленные	Коловратки	Черви	Амебы	Водные клещи	
1.11	5	5	3	5	1	4	23
2.12	5	5	1	5	3	2	21
5.12	3	1	1	4	2	1	12
7.12	3	1	1	4	2	2	13
8.12	3	1	1	4	-*	2	11
9.12	2	-	2	3	2	2	11

* – данный организм не обнаружен

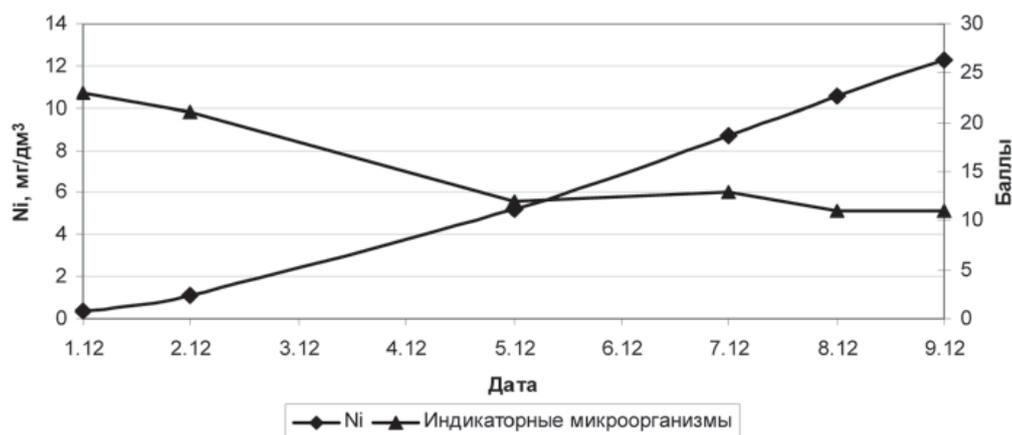
Заключение

В биопленке промышленных биофилтров были обнаружены следующие группы индикаторных организмов: коловратки, черви, прикрепленные инфузории, свободноплавающие простейшие

(инфузории и жгутиконосцы), циклопы, водные клещи, нитчатые бактерии. В дальнейшем идентифицированные организмы были использованы для оценки процесса очистки производственных СВ.

По результатам биоиндикации процесса биологической очистки производственных СВ количественно охарактеризовано лимитирование по органическим веществам организмов биопленки во втором биофилт্রে в каскаде из двух биофилтров.

Рис. 9. Изменение суммарного количества индикаторных организмов в зависимости от концентрации ионов никеля в СВ.



С использованием метода флуоресцентной *in situ* гибридизации в составе образцов биопленки из промышленных биофильтров обнаружены группы микроорганизмов, принимающие участие в процессах трансформации соединений азота: *β-proteobacteria*, *β-proteobacteria ammonia-oxidizer* (аммонийо-кисляющие нитрификаторы), *Genus Nitrobacter* (нитритокисляющие нитрификаторы), *Zoogloea ramigera*, *Azoarcus-Thauera cluster* (денитрификаторы). Тем самым подтверждено, что в плотном слое загрузки промышленных биофильтров формируются аэробные и анаэробные зоны, где развиваются соответствующие группы микроорганизмов, участвующие в разнообразных процессах конверсии загрязняющих веществ с их полным удалением из СВ.

По результатам модельного эксперимента рекомендовано проведение процесса биофильтрации с оптимальной концентрацией органических веществ в СВ по ХПК от 150 до 300 мг O₂/дм³ для условий эксперимента. Для рассмотренного предприятия выявлено, что увеличение концентрации ионов Ni²⁺ до 8 мг/дм³ не оказывает значительного негативного воздействия на адаптированную микрофлору биопленки. При этом концентрация органических веществ должна быть не менее 150 мг ХПК/дм³.

Литература

1. Шуйский В.Ф. Биоиндикация качества водной среды, состояния пресноводных экосистем и их антропогенных изменений / В.Ф. Шуйский, Т.В. Максимова, Д.С. Петров //

Ключевые слова:

микробиоценоз
биопленки,
биоиндикация,
флуоресцентная
in situ гибридизация

Сб. научн. докл. VII междунар. конф. «Экология и развитие Северо-Запада России». С-Пб.: Изд-во МАНЭБ, 2002. С. 441-451.

2. Фауна аэротенков (Атлас) / Под ред. Кутиковой Л.А. Л.: Наука, 1984. 264 с.

3. Кирилина, Т.В. Биоконверсия соединений азота и фосфора в процессе биофильтрации сточных вод и их доочистки погруженными макрофитами. Дис..... канд. техн. наук. Казань, 2011.126 с.

*Авторы выражают искреннюю благодарность профессору Йозефу Винтеру, доктору Клаудии Галлерт, а также аспиранту Монике Фельхнер-Цвирелло за организацию аналитических исследований в условиях модельного эксперимента и за консультации в осуществлении флуоресцентной *in situ* гибридизации образцов биопленки в Институте инженерной биологии и биотехнологии сточных вод Института технологий г. Карлсруэ, Германия.*

Авторы признательны доктору Бирте Бауэрндистель и инженеру Ольге Эмих за приглашение для проведения исследований, организацию рабочего места по проведению промышленных экспериментов, а также за содействие при выполнении экспериментальной работы на очистных сооружениях завода грузовых автомобилей Daimler AG – Woerth, Германия.

A.A. Khalilova, A.S. Sirotkin

BIOINDICATION OF PURIFICATION PROCESS OF METAL-CONTAINING WASTE WATER AND ANALYSIS OF MICROBIAL COMMUNITY DEVELOPMENT ON BIOFILTER

Physical-chemical analysis results of waste water composition, lightfield microscopy and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) data on biofilm samples characterize element influence of waste water from lorry works Daimler AG on biofilter microbiocenosis of purifying constructions of the factory.

Key words: microbiocenosis of biofilm, bioindication, fluorescent *in situ* hybridization