

ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ СПОРОГЕННИХ БАКТЕРІЙ В АТМОСФЕРІ ІНЕРТНИХ ГАЗІВ

І. З. КОВАЛЬ

Національний університет "Львівська політехніка"
вул. С. Бандери, 12, м. Львів, Україна, 79013
e-mail: irynazk@gmail.com

Досліджено життєздатність спорогенних бактерій в умовах барботування інертних газів (аргону та гелію) через водну систему та здійснено порівняння дії кожного з досліджуваних газів на процес їх руйнування у воді. Досліджуваними мікрооб'єктами слугували бактерії роду *Bacillus cereus*, як переважаюча мікрофлора різних природних вод з вихідним мікробним навантаженням 10^4 на 1 см^3 досліджуваної води. За кінетичним рівнянням реакції першого порядку розраховано величини ефективних констант швидкості руйнування бактерій. Відзначено ефективну природу газу в процесі очищення води від мікроорганізмів. Експерименти проводились в скляному реакторі при постійному охолодженні водопровідної води. Вирощування досліджуваних бактерій проведено глибинним методом з подальшим зберіганням в термостаті при $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ впродовж 48 год. Кількість мікроорганізмів в одиниці об'єму досліджуваної води визначалась загальною чисельністю бактерій, що виростили на поживному середовищі на чашках Петрі і виражена в колоній-утворюючих одиницях. Загальна витрата барботованого газу становила $1,4 \text{ дм}^3$, який подавали зі швидкістю $0,2 \text{ см}^3/\text{с}$ в досліджуваній об'єм води (75 см^3) впродовж всієї тривалості процесу. Обчислене загальне мікробне число у водах з відкритих водойм та різних виробничих стічних водах слугувало встановленню вихідного числа мікроорганізмів в одиниці об'єму досліджуваної води. Графічно представлено динаміку чисельності бактерій під впливом газів на водну систему. Представлені колонії бактерій роду *B. cereus* під час росту на поживному середовищі до та після барботування мікробної води газом. Зменшення кількості бактеріальних клітин спостерігали в атмосфері обидвох досліджуваних газів, однак з різною активністю. Порівняння величин ефективних констант швидкості руйнування бактерій для аргону та гелію показало, що чисельність клітин активніше зменшувалась в умовах барботування аргону. Відзначено активне руйнування мікроорганізмів в умовах подачі аргону, порівняно з гелієм, незалежно від вихідної кількості бактерій в 1 см^3 досліджуваної води. Дія аргону на воду з вмістом бактерій описується більшою величиною ефективною константи швидкості відмирання клітин: $kd(\text{Ar}) > kd(\text{He})$. Показано, що ефективність очищення води від мікроорганізмів залежить від природи барботованого газу.

Ключові слова: бактерії роду *Bacillus cereus*, аргон, гелій, очищення води.

Вступ. Проблема забруднення поверхневих вод і надалі не втрачає своєї актуальності. Міста України потерпають, в першу чергу, від скидання стічних вод (СВ) у води відкритих водойм. Санітарно-біологічні дослідження (Хвесик, 2013) якості СВ міст Лубни, Кременчук, Світловодськ, Кіровоград зазначають низький ступінь очищення після скидання води з очисних споруд у басейн річки Дніпра. Так, в окремих випадках у пробах СВ в містах Лубни та Кременчук виявлено яйця гельмінтів ($1-4 \text{ екз./дм}^3$) та високий показник індексу лактозопозитивних кишкових паличок (Хвесик, 2013). В $0,001 \text{ см}^3$ води може містити до 10^9 бактерій. Декілька мільйонів бактерій виявлено в одиниці об'єму стічних і річкових водах (Койнова та ін., 2019).

Згідно з (Гойванович та ін., 2018), після досліджень майже 18 тис. із приблизно 27 тис. приватних криниць на Львівщині відхилення за бактеріологічними показниками виявлено у 15,7% проб. Деякі показники перевищують встановлені норми для питних вод, зокрема коли-індекс. В

криничних водах деяких населених пунктів Львівщини (с. Долішне, с. Довге та м. Моршин) середньорічний показник коли-індексу вище норми в 3,3-8,2 рази (Гойванович та ін., 2018). За даними (Рябокоть, 2011), 33% водопровідної води у Вінниці не відповідає санітарно-мікробіологічним нормативам. Це далеко неповний перелік прямого забруднення відкритих водойм промисловими відходами, але цілком достатній для усвідомлення катастрофічного стану водних ресурсів, які забруднюють води не лише хімічними, але й біологічними забрудниками.

Хоча існує багато способів знезараження води, таких як хімічні та фізичні методи, у багатьох країнах все ще використовується хлор для знезараження питної води. Проте, в літературі є численні повідомлення про реактивацію мікроорганізмів (МО) у хлорованій питній воді, появу хлоррезистентних організмів, які зберігають життєздатність (Du et al., 2017; Nescerecka et al., 2014) та погіршують санітарно-

гігієнічні показники води. Досліджено (Du et al., 2017), що навіть концентрація хлору 10 мг/дм^3 не забезпечує повного видалення мікроскопічних грибів з води. Тому, для одержання гарантованого бактерицидного ефекту застосовують надлишкові дози хлору, але це, відповідно, погіршує органолептичні показники води, зумовлює її денатурацію.

Застосування гіпохлориту натрію (NaOCl) зумовлює відкладення нальоту на внутрішній поверхні труби, а також помутніння води, що обмежує його використання в процесах водоочищення.

Все частіше піднімається питання необхідності відмови від хлорування води через утворення токсичних, мутагенних та канцерогенних хлорорганічних сполук (Zamyadi et al., 2013; Bertelli et al., 2018; Piyas et al., 2018; Mohsen et al., 2019), що зумовлює повторне забруднення води. Про таку водопровідну воду говорять не як про питну, а як про техногенну (Mohsen et al., 2019).

Тому, в роботі пропонується розглянути процес барботування газів через мікробну воду і дослідити життєздатність МО. Окрім того, вплив інертних газів мало вивчений в процесах водоочищення. Представлені експериментальні дослідження можуть внести конкретні рекомендації та висновки щодо вибору природи барботованого газу для видалення бактерій з водного середовища не лише як безпосередній реагент, але й в комбінації, наприклад, з фізичними методами обробки води.

Матеріали та методи. Для дослідження були використані спорогенні бактерії роду *B. cereus*, що пов'язано з домінуванням бактерій саме цього роду в різних природних водах (Koval, 2016). Чисті культури вказаних МО були внесені з дотриманням умов стерильності до стерильної води. Стерильна вода приготовлена на основі водопровідної води шляхом її стерилізації в автоклаві. Таким чином були створені окремі модельні середовища з різним вихідним числом мікроорганізмів (ЧМ), щоб максимально наблизитись за кількісним вмістом до реального рівня мікробіологічного забруднення природних та виробничих СВ. Кількість бактеріальних клітин в одиниці об'єму води знаходилась в межах $10^4 \div 10^5 \text{ КУО/см}^3$.

Культивування досліджуваних МО здійснений глибинним методом. МО росли в термостаті при постійній температурі ($T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$) тривалістю 48 год, що характерно для бактерій. Підрахунок числа мікроорганізмів (ЧМ) в 1 см^3 досліджуваної води полягає у визначенні загальної кількості МО, які мають здатність рости на м'ясо-пептонному агарі (МПА) на чашках Петрі. Культивування МО

здійснювалось в електричному сухоповітряному термостаті ТС-80М-3.

Модельні води піддавались барботуванню інертними газами (аргон, гелій) протягом двох годин ($t = 7200 \text{ с}$). Газ барботувався у модельну воду впродовж всього процесу зі швидкістю $0,2 \text{ см}^3/\text{с}$. Загальна його витрата за 2 год процесу становила $1,4 \text{ дм}^3$.

Об'єм досліджуваної мікробної води становив 75 см^3 , який заливався в стерильний скляний реактор з вмонтованими штуцерами для термометра, барботування газу та відбирання проб води. Реактор охолоджувався протічною водою, що забезпечувало постійну температуру мікробної води ($T = 288 \pm 1 \text{ K}$) впродовж всього експерименту.

Підрахована кількість клітин до і після обробки виражена в колонійутворюючих одиницях (КУО). Експериментальні точки діаграми в нижчепредставлених експериментальних матеріалах отримані за середньоарифметичними даними трьох паралельних висівів зразків мікробної води.

Результати та їх обговорення. Для встановлення мікробного забруднення у модельних водах здійснений підрахунок КУО в 1 см^3 природних та СВ Львівської області. Так, у водах з відкритих водойм ЧМ знаходилось в межах 10^4 КУО/см^3 , а у випадку виробничих СВ наступним чином: для СВ пивоварні «Кумпель» $\text{ЧМ}_0 = 1,1 \times 10^5 \text{ КУО/см}^3$ та для СВ фармацевтичного заводу «Галичфарм» $\text{ЧМ}_0 = 3,86 \times 10^4 \text{ КУО/см}^3$. Тому для здійснення експериментів до стерильної води була внесена чиста культура спорогенних клітин роду *B. cereus* з розрахунком мікробного забруднення води в діапазоні $10^4 \div 10^5 \text{ КУО/см}^3$.

Дослідження зміни чисельності бактерій від тривалості барботування інертних газів (аргону та гелію) представлено на рис. 1 та 2, які дозволяють оцінити і надати порівняльну характеристику життєздатності клітин в умовах експерименту. Як бачимо, барботування обидвох інертних газів через мікробну систему веде до зменшення ЧМ впродовж всього дослідження. Для порівняння результативності дії досліджуваних газів розраховані величини ефективних констант швидкостей відмирання бактерій (k_d) за кінетичним рівнянням реакції першого порядку (таблиця). При здійсненні експериментів використано модельні води з різним ЧМ_0 , однак згідно попередніх досліджень величина ефективної константи швидкості життєздатності МО не залежить від вихідної кількості клітин у водній системі (Koval, 2017), що засвідчує доцільність порівняння результатів експериментів з різним ЧМ_0 .

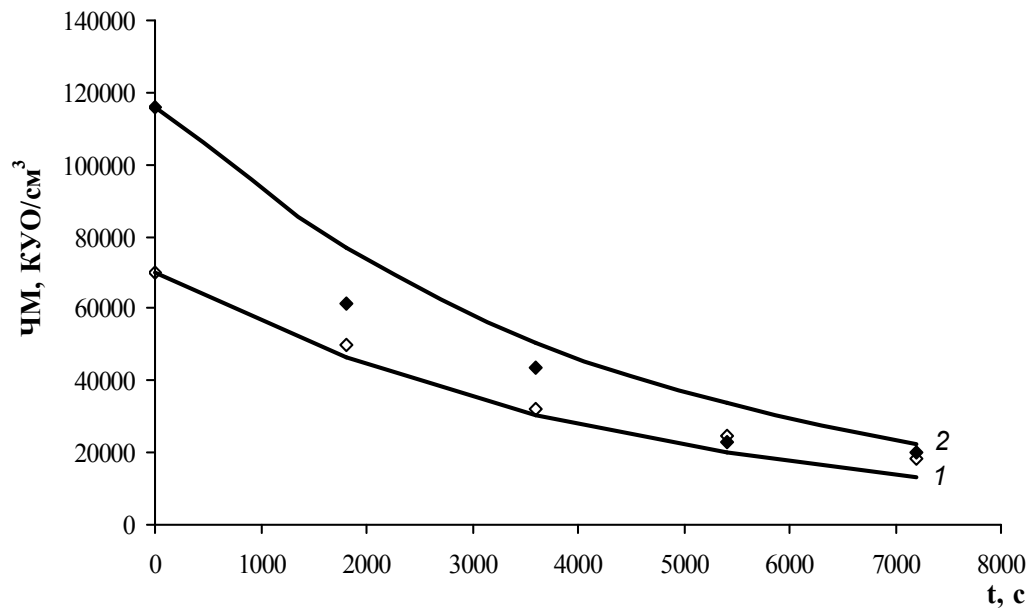


Рис. 1. Зміна чисельності бактерій роду *B. cereus* від тривалості барботування аргону через водну систему. Експериментальні дані представлені точками. Вихідні дані: $ЧМ_{01} = 7 \times 10^4$ КУО/см³ (1); $ЧМ_{02} = 1,2 \times 10^5$ КУО/см³ (2). Умови процесу: $T = 288 \pm 1$ К.

Fig. 1. The change of the number of *B. cereus* bacteria type from the duration of argon bubbling through the water system. Experimental data are represented by points. Initial data: $NM_{01} = 7 \times 10^4$ CFU/cm³ (1); $NM_{02} = 1.2 \times 10^5$ CFU/cm³ (2). Process conditions: $T = 288 \pm 1$ K.

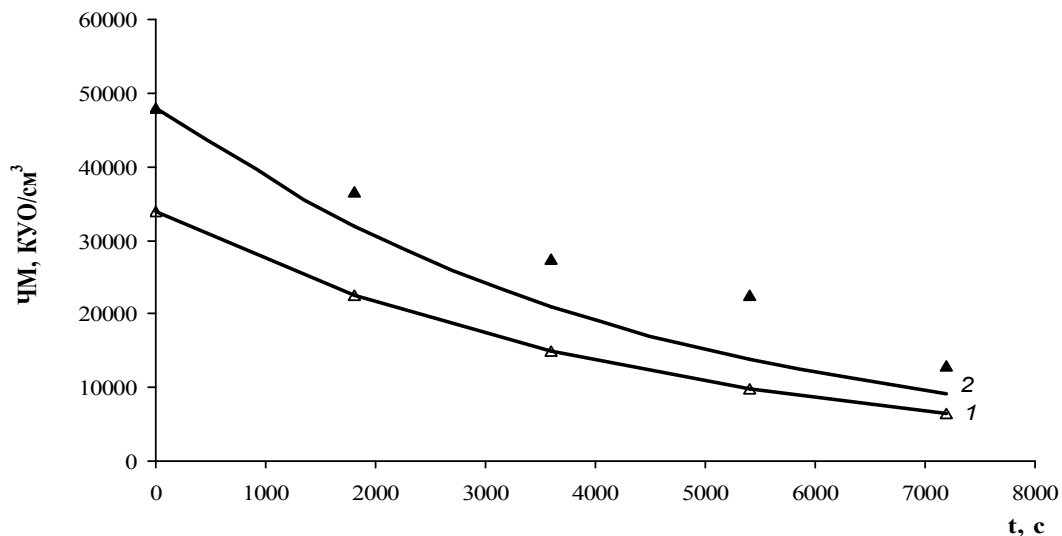


Рис. 2. Зміна чисельності бактерій роду *B. cereus* від тривалості барботування гелію через водну систему. Експериментальні дані представлені точками. Вихідні дані: $ЧМ_{01} = 3,4 \times 10^4$ КУО/см³ (1); $ЧМ_{02} = 4,8 \times 10^4$ КУО/см³ (2). Умови процесу: $T = 288 \pm 1$ К.

Fig. 2. The change of the number of *B. cereus* bacteria type from the duration of helium bubbling through the water system. Experimental data are represented by points. Initial data: $NM_{01} = 3.4 \times 10^4$ CFU/cm³ (1); $NM_{02} = 4.8 \times 10^4$ CFU/cm³ (2). Process conditions: $T = 288 \pm 1$ K.

Зменшення кількості бактеріальних клітин при барботуванні аргону і гелію спостерігається впродовж всього процесу, незалежно від вихідної кількості бактерій в одиниці об'єму водної системи. Однак процеси для аргону та гелію неоднакові за ефективністю загибелі клітин. Величина ефективною константи швидкості відмирання бактерій в першому

випадку більша (таблиця), що вказує на більшу кількість відмерлих клітин в умовах барботування аргону.

Візуальну кількість мікробних клітин в одиниці об'єму системи до та після експерименту за участю аргону зображено на рис. 3, який ілюструє чисельність КУО на твердому поживному середовищі.



а

Рис. 3. КУО бактерій роду *B. cereus* на МПА, вирощені глибинним методом при висіві мікробної води. Час відбирання проби води: **а** – до початку експерименту, **б** – після барботування мікробної води аргоном тривалістю 7200 с. ЧМ₀ = 7×10⁴ КУО/см³ (**а**); ЧМ = 27×10⁴ КУО/см³ (**б**). Умови процесу: T = 30 °C, розведення 1:10⁴.



б

Fig. 3. CFU of *B. cereus* bacteria type on MPA, which are grown by the deep method when sowing microbial water. Water sampling time: **a** - before experiment, **b** - after argon bubbling of microbial water of 7200 s. NM₀ = 7 × 10⁴ CFU/cm³ (**a**); NM = 27 × 10⁴ CFU/cm³ (**b**). Process conditions: T = 30 °C, dilution 1: 10⁴.

Таблиця.

Ефективні константи швидкості відмирання бактерій (k_d)

Природа газу	R _d	k _d , с ⁻¹
He	0,937	(8,16±0,07)×10 ⁻⁵
Ar	0,893	(2,3±0,1)×10 ⁻⁴

Table.

Effective rate constants of bacterial destruction (k_d)

Також можна порівняти ефективність відмирання бактерій *B. cereus* в залежності від природи газу і, таким чином, визначити газоподібну атмосферу, в якій цей процес перебігає активніше. За результатами порівняння величин ефективною константи швидкості відмирання бактерій для аргону та гелію більшу ефективність в процесі водоочищення виявляє аргон:

$$k_{d(\text{Ar})} > k_{d(\text{He})}$$

Отже, ефективність відмирання бактеріальних клітин залежить від природи барботованого газу через мікробну систему.

Таким чином, дослідження дозволяють описати процеси відмирання клітин МО в присутності інертних газів (Ar, He) та вказує на активне очищення води від бактерій *B. cereus* в умовах барботування аргону.

Висновки. На прикладі відмирання бактерій роду *B. cereus* при барботуванні інертних газів (аргону та гелію) представлено результативність їх застосування в процесах водоочищення. Здійснено порівняння величин ефективною константи швидкості руйнування бактерій для аргону та гелію. Експериментально показано більшу ефективність процесу відмирання бацил в

атмосфері аргону. Встановлено, що ефективність зменшення ЧМ в одиниці об'єму водної системи залежить від природи барботованого газу.

Список літератури:

- Bertelli C., Courtois S., Rosikiewicz M., Piriou P., Aebly S., Robert S., Loret J. F., Greub G. Reduced Chlorine in Drinking Water Distribution Systems Impacts Bacterial Biodiversity in Biofilms. *Front Microbiol.* 2018; 9: 252-260. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02520
- Гойванович Н. К., Антоняк Г. Л., Коссака Г. М. Моніторинг показників якості криничних вод стрийського району. *Наукові доповіді НУБіП України.* 2018; 5(75): 175-180. DOI: 10.31548/dopovidi2018.05.001
- Du, Y., Wu Q. Y., Lu Y., Hu H. Y., Yang Y., Liu R., Liu F. Increase of cytotoxicity during wastewater chlorination: impact factors and surrogates. *J. Hazard Mater.* 2017; 324: 681-690. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2016.11.042
- Huma I., Masih I., Hoek J. P. An exploration of disinfection by-products formation and governing factors in chlorinated swimming pool water. *J. Water Health.* 2018; 16(6): 861-892. <https://doi.org/10.2166/wh.2018.067>
- Zamyadi A., Fan Y., Daly R. I. & Prévost M. Chlorination of *Microcystis aeruginosa*: toxin release

- and oxidation, cellular chlorine demand and disinfection by-products formation. *Water Res.* 2013; 47: 1080–1090. DOI: 10.1016/j.watres.2012.11.031
6. Koval I. Cavitation influence on the *Bacillus cereus* bacteria and *Oscillatoria brevis* cyanobacteria. *The environment and the industry.* 2016; 19: 89-95. DOI: 10.21698/simi.2016.0010
 7. Koval I. Microbial disaggregation with and without gas bubbling under cavitation conditions. *The environment and the industry.* 2017; 20: 56–60. DOI: 21698/simi.2017.0007
 8. Койнова І. Б., Чорна А.-К. Водойми міста Львова: сучасний геоecологічний стан та можливості його покращення. *Людина та довкілля. Проблеми неоекології.* 2019; 32: 6-15. <https://doi.org/10.26565/1992-4224-2019-32-01>
 9. Mohsen I. H., Mohsen A. H., Zaidan H. K. Health effects of chlorinated water: a review article. *J. Biotechnol.* 2019; 16(3): 163-167. DOI: 10.34016/pjbt.2019.16.3.24
 10. Nescerecka A., Rubulis J., Vital M., Juhna T., Hammes F. Biological instability in a chlorinated drinking water distribution network. *PLoS One.* 2014; 9(5): 89-95. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096354>
 11. Решетченко С. І., Рохманов М. Я. Екологічний стан водних ресурсів луганської області. *Людина та довкілля. Проблеми неоекології.* 2013; 1-2: 104-109.
 12. Рябоконт С. В. Шляхи та проблеми охорони водних ресурсів Вінниччини (на прикладі поверхневих водойм). *Науковий вісник НЛТУ України.* 2011; 21(11): 109-116.
 13. Хвесик М.А. Екологічні проблеми басейну р. Дніпро та шляхи їх вирішення. *Екологія і природокористування.* 2013; 17: 68-74.
- References:**
1. Bertelli C., Courtois S., Rosikiewicz M., Piriou P., Aeby S., Robert S., Loret J. F., Greub G. Reduced Chlorine in Drinking Water Distribution Systems Impacts Bacterial Biodiversity in Biofilms. *Front Microbiol.* 2018; 9: 252-260. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02520
 2. Hoivanovych N. K., Antonyak H. L., Kossak H. M. Monitoring of quality indicators for well waters of stryї district. *Naukovi dopovidi NUBiP Ukrayiny.* 2018; 5(75): 175-180. DOI: 10.31548/dopovidi2018.05.001 (in Ukrainian).
 3. Du, Y., Wu Q. Y., Lu Y., Hu H. Y., Yang Y., Liu R., Liu F. Increase of cytotoxicity during wastewater chlorination: impact factors and surrogates. *J. Hazard Mater.* 2017; 324: 681–690. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2016.11.042
 4. Huma I., Masih I., Hoek J. P. An exploration of disinfection by-products formation and governing factors in chlorinated swimming pool water. *J. Water Health.* 2018; 16(6): 861–892. <https://doi.org/10.2166/wh.2018.067>
 5. Zamyadi A., Fan Y., Daly R. I. & Prévost M. Chlorination of *Microcystis aeruginosa*: toxin release and oxidation, cellular chlorine demand and disinfection by-products formation. *Water Res.* 2013; 47: 1080–1090. DOI: 10.1016/j.watres.2012.11.031
 6. Koval I. Cavitation influence on the *Bacillus cereus* bacteria and *Oscillatoria brevis* cyanobacteria. *The environment and the industry.* 2016; 19: 89-95. DOI: 10.21698/simi.2016.0010
 7. Koval I. Microbial disaggregation with and without gas bubbling under cavitation conditions. *The environment and the industry.* 2017; 20: 56–60. DOI: 21698/simi.2017.0007
 8. Koinova I.B., Chorna A-K. Lviv reservoirs: current geo-ecological status and opportunities for its improvement. *Man and Environment. Issues of Neoecology.* 2019; 32: 6-15. <https://doi.org/10.26565/1992-4224-2019-32-01> (in Ukrainian).
 9. Mohsen I. H., Mohsen A. H., Zaidan H. K. Health effects of chlorinated water: a review article. *J. Biotechnol.* 2019; 16(3): 163-167. DOI: 10.34016/pjbt.2019.16.3.24
 10. Nescerecka A., Rubulis J., Vital M., Juhna T., Hammes F. Biological instability in a chlorinated drinking water distribution network. *PLoS One.* 2014; 9(5): 89-95. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096354>
 11. Reshetchenko S. I., Rokhmanov M. Ya. Ecological condition of water resources of Luhansk region. *Man and Environment. Issues of Neoecology.* 2013; 1-2: 104-109. (in Ukrainian).
 12. Ryabokon S.V. Ways and problems of guard of aquatic resources of Vinnitsa Region (for example of superficial reservoirs). *Naukovyy visnyk NLTU Ukrainy.* 2011; 21(11): 109-116. (in Ukrainian).
 13. Hvesyk M.A. Environmental problems Dnipro river basin and ways to solve it. *Ecology and nature management.* 2013; 17: 68-74. (in Ukrainian).

VIABILITY OF SPOROGENIC BACTERIA IN AN INERT GAS ATMOSPHERE

I. Z. Koval

The viability of sporogenic bacteria under the conditions of bubbling inert gases (argon and helium) through the water system was investigated and the action of each studied gases on the process of its destruction in water was compared. Bacillus cereus bacteria type were as the investigated microobjects and, as the predominant microflora of different natural waters, with an initial microbial load of 10^4 per 1 cm^3 of investigated water. According with the first-order kinetic equation were calculated the values of the effective rate constants of the bacteria destruction. The effective gas nature in the process of water purification from microorganisms is noted. The experiments were carried out in a glass reactor with constant cooling of tap water. The growth of the investigated bacteria were carried out by the deep

method, followed by storage in a thermostat at $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 48 h. The number of microorganisms per unit volume of investigated water was determined by the total number of bacteria grown on the culture medium on Petri dishes and expressed in colony-forming units. The total flow rate of the bubbled gas was 1.4 dm^3 , which was fed at a rate of $0.2\text{ cm}^3/\text{s}$ to the investigated water volume (75 cm^3) throughout the duration of the process. The calculated total microbial count in natural water and various industrial wastewater was used to determine the initial number of microorganisms per unit volume of investigated water. The dynamics of bacterial numbers under the influence of gases on the water system is presented graphically. Colonies of *B. cereus* bacteria type are presented during growth on nutrient medium before and after bubbling of microbial water with gas. Decreasing of the bacterial cells number was observed in the atmosphere of both investigated gases, but with different activity. Comparison of the values of the effective rate constants of bacteria for argon and helium showed that the cell number decreased more actively under argon bubbling conditions. Active destruction of microorganisms under argon bubbling compared to helium was observed, regardless of the initial bacterial count in 1 cm^3 of investigated water. The effect of argon on water containing bacteria is described by the greater value of the effective rate constant of cell destruction: $k_d(\text{Ar}) > k_d(\text{He})$. It is shown that the efficiency of water purification from microorganisms depends on the nature of the bubbled gas.

Keywords: Bacillus cereus bacteria type, argon, helium, water purification.

Отримано редколегією 07.04.2020