

## ДІЯ ГЕЛІЮ НА ОЧИЩЕННЯ ВОДИ З РІЗНОЮ КОНЦЕНТРАЦІЄЮ МІКРООРГАНІЗМІВ

<sup>1</sup>Національний університет «Львівська політехніка»

Досліджено вплив барботованого інертного газу на процес життєздатності паличкоподібних мікроорганізмів у воді. Мікрооб'єктами слугували резистентні спорогенні клітини роду *Bacillus cereus*, які належать до родини *Bacillaceae*, а досліджуваним газом — гелій. Гелій подавали зі швидкістю 0,2 см<sup>3</sup>/с. Бактерії вносили до дистильованої дезаерованої води, створюючи модельні водні середовища з різним вихідним числом мікроорганізмів (ЧМ). Концентрація мікроорганізмів в одиниці об'єму води знаходилась в межах одного порядку: ЧМ<sub>01</sub> = 3,4 · 10<sup>4</sup> КУО/см<sup>3</sup>, ЧМ<sub>02</sub> = 4,8 · 10<sup>4</sup> КУО/см<sup>3</sup> та ЧМ<sub>03</sub> = 7 · 10<sup>4</sup> КУО/см<sup>3</sup>. Застосовували глибинний метод культивування бактеріальних клітин. Умови культивування мікроорганізмів: температура 37 °С, тривалість 48 год. Величину ЧМ до і після експериментів визначали підрахунком колоній, які виростили на поживному середовищі на чашках Петрі. Підраховану кількість клітин виражали в колонійутворюючих одиницях (КУО). Під час мікроскопічних досліджень вивчено клітини культури фіксованого препарату (одно-добові та три-добові). Отримано зображення фіксованого препарату клітин зі збільшенням у 1200 разів. Показано форму та розміри клітин фіксованого препарату, а також форму та розташування спор, які знаходяться всередині клітин. Встановлено, що спори мають овальну форму і їхній розмір менший ніж поперечник клітини.

За результатами експериментальних досліджень показано зміну величин ЧМ в часі, коли відбувалось зменшення чисельності клітин в одиниці об'єму води впродовж двогодинної тривалості процесу, незалежно від різного ЧМ<sub>0</sub>. Розраховано частку зруйнованих клітин для кожної їх концентрації після кожних тридцяти хвилин обробки води та наведено величини відношення вихідного ЧМ до поточного після кожного відбору проб води. Графічно побудовано залежності частки загиблих клітин від тривалості обробки мікробної води гелієм. Спостерігали збільшення частки загиблих клітин зі зменшенням вихідної концентрації клітин у воді. Досягнуто найвищий відсоток зруйнованих бацил, коли ЧМ<sub>01</sub> = 3,4 · 10<sup>4</sup> КУО/см<sup>3</sup>, який становив 77,06 %, тоді як для ЧМ<sub>02</sub> = 4,8 · 10<sup>4</sup> КУО/см<sup>3</sup> та ЧМ<sub>03</sub> = 7 · 10<sup>4</sup> КУО/см<sup>3</sup> — 72,92 % та 47,72 %, відповідно. Таким чином, експериментально показано достатньо високу ефективність дії самого лише гелію під час обробки мікробної води з вмістом резистентних спорогенних бактерій.

**Ключові слова:** мікроорганізми, *Bacillus cereus*, руйнування, газ, гелій.

### Вступ

Процеси очищення води від різних мікроорганізмів досліджуються науковцями й досі, оскільки у воді містяться не лише забруднювачі хімічного, а й біологічного походження [1], [2]. Згідно з аналізом літературних джерел, найдешевшим методом знезараження води є хлорування [3], [4]. Однак, від цього методу обробки води починають відмовлятися, беручи до уваги утворення вторинних продуктів забруднення води хлоровмісними сполуками [5], [6]. Окрім присутності хлорпохідних сполук, у воді після її хлорування в роботах [3], [7] йдеться про появу хлоррезистентних мікроорганізмів в такому середовищі. Навіть концентрація хлору 10 мг/дм<sup>3</sup> не забезпечує повного руйнування мікроскопічних грибів [3].

Не меншу ефективність знезараження води демонструють теоретичні і практичні дані щодо дії озону [8]—[11]. Кінетика загибелі *Escherichia coli* під дією озону досліджена в [9]. Застосування озону за концентрації озону-повітряної суміші 20 мг/дм<sup>3</sup> підвищує ступінь знезараження стічних вод до 96,4 % [8]. Інактивацию мікрофлори озонуванням більше 80 % (0,02 г/г біомаси) досліджено в роботі [10]. Дія озону характеризується високою ефективністю, але ефект не пролонгований, озон також утворює токсичні продукти взаємодії [12]. Озонування застосовується в промисловості та абсолютно не підходить для систем централізованого водопостачання, басейнів тощо.

Вплив аргону на життєздатність *Bacillus cereus* описано в роботі [13], де відзначено активне руйнування мікроорганізмів в умовах подачі аргону та обчислено, що  $k_d = (2,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ . Дія кисню на аеробні бактерії вивчена в роботі [14], в якій здійснені дослідження дозволили виявити та описати процеси нагромадження та зменшення мікробного числа у воді. За низької концентрації бактерій *Bacillus* досліджено активне їх розмноження в атмосфері кисню, а за високої — спостерігали зменшення кількості клітин у воді [14]. Вплив водню, аргону, кисню, повітря та ультразвуку низької інтенсивності на життєдіяльність дріжджів роду *Saccharomyces cerevisiae* описано в роботі [15]. Однак даних про вплив гелію на життєздатність мікроорганізмів у наукових роботах автором практично не знайдено. Тому, метою роботи є дослідження впливу гелію на бактерії за різної їхньої концентрації у воді.

### Об'єкти та методи дослідження

Для досліджень використовували чисту культуру бактерій роду *Bacillus cereus*. За допомогою мікробіологічної петлі клітини бактерій вносили в свіжопідготовлену дистильовану воду, створюючи, таким чином, модельну мікробну воду. Дистильовану воду попередньо дезаерували кип'ятінням та подальшим охолодженням перед внесенням біомаси.

Досліджувану мікробну воду об'ємом  $75 \text{ см}^3$  заливали у скляний реактор. Перед заливанням мікробної води у реактор, його стерилізували в сушильній шафі. Скляний реактор оснащений штуцерами для термопари, барботування газу та відбирання проб води. Для барботування використовували гелій. Інертний газ барботували у модельну воду впродовж всього процесу зі швидкістю  $0,2 \text{ см}^3/\text{с}$  та загальною його витратою  $1,4 \text{ дм}^3$ . Тривалість процесу барботування становила дві години (7200 с). Кожних 30 хвилин здійснювали відбирання проб води для обчислення величини ЧМ. Постійну температуру мікробної води ( $T = 288 \pm 1 \text{ К}$ ) впродовж всього експерименту підтримували шляхом охолодження скляного реактора проточною водою.

Для визначення загальної кількості мікроорганізмів у воді використовували універсальне поживне середовище — м'ясо-пептонний агар (МПА), такого складу: м'ясна вода ( $1 \text{ дм}^3$ ), пептон (10 г), агар (15 г). Культивування досліджуваних мікроорганізмів здійснювали глибинним методом з подальшим витриманням їх в електричному сухоповітряному термостаті ТС-80М-3. Бактерії вирощували за постійної температури ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ) тривалістю 48 год. Методику кількісного визначення мікроорганізмів у воді детально описано в роботі [14].

### Результати і обговорення

Для досліджень використовували модельні води з різним ЧМ<sub>0</sub>: ЧМ<sub>01</sub> =  $3,4 \cdot 10^4 \text{ КУО}/\text{см}^3$ , ЧМ<sub>02</sub> =  $4,8 \cdot 10^4 \text{ КУО}/\text{см}^3$  та ЧМ<sub>03</sub> =  $7 \cdot 10^4 \text{ КУО}/\text{см}^3$ . Кількість бактеріальних клітин в одиниці об'єму води знаходилась в межах порядку  $10^4 \text{ КУО}/\text{см}^3$ . Вибір досліджуваних мікрооб'єктів пов'язаний з домінуванням бактерій саме цього роду в різних природних водах [16].

Під час дослідження особливостей росту бактерій на поживному середовищі на чашках Петрі спостерігали поверхневі, глибинні та донні колонії. Останні за розмірами відповідали точковим та дрібним колоніям. Мікроскопічні дослідження показано на рис. 1, на якому виразно видно одно- та три-добові культури фіксованого препарату зі збільшенням в 1200 разів. Такі дослідження дозволили визначити наявність спор у клітині та встановити їх форму і розташування всередині клітини. Показано, що спори бацил овальної форми з субтермінальним розташуванням (рис. 1б).

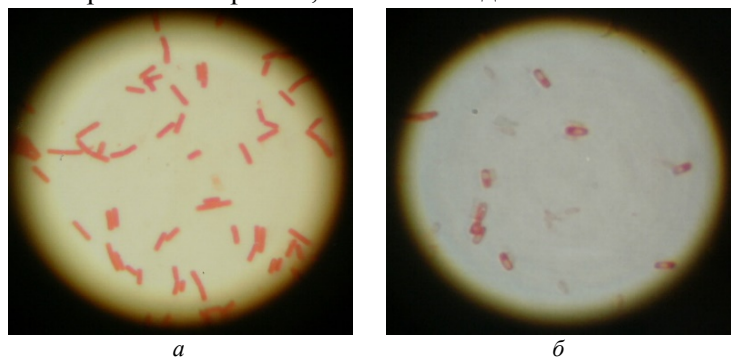


Рис. 1. Особливості мікроскопічних досліджень клітин *Bacillus cereus*: клітини культури фіксованих препаратів, забарвлених фуксином основним: а — одно-добові культури; б — три-добові з субтермінальним розташуванням овальних спор. Збільшення у 1200 разів

Для досліджень використовували три-добові культури мікроорганізмів, тобто клітини з уже сформованими ендоспорами (рис. 1б). Відомо з теоретичних джерел [2], що спорогенні клітини характеризуються більшою резистентністю до дії зовнішніх факторів, порівняно з вегетативними.

Експериментальні точки на рис. 2 отримані за середньоарифметичними даними трьох паралельних висівів зразків мікробної води. Цей рисунок демонструє зростаючі залежності частки загиблих клітин ( $D_d$ ) від тривалості обробки мікробної води самим лише гелієм. Криві між собою схожі за характером, однак відрізняються розрахованими величинами відношення ЧМ/ЧМ<sub>0</sub> (таблиця), в якій також наведено зміну ЧМ в залежності від режиму обробки мікробної води.

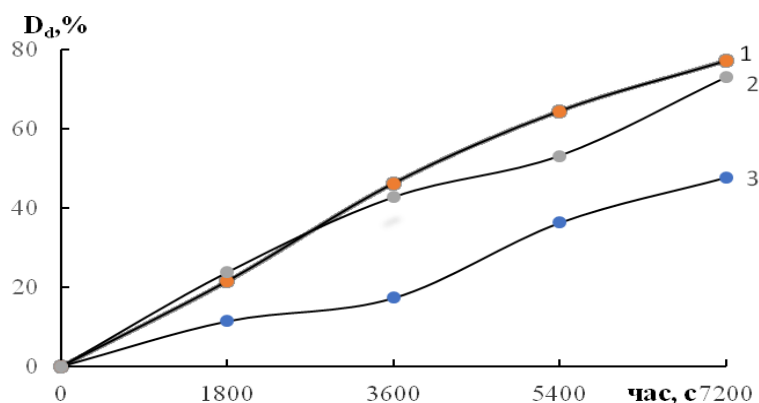


Рис. 2. Залежність частки загиблих клітин від тривалості процесу. Експериментальні дані показані точками. Вихідні дані: 1 — ЧМ<sub>01</sub> = 3,4 · 10<sup>4</sup> КУО/см<sup>3</sup>; 2 — ЧМ<sub>02</sub> = 4,8 · 10<sup>4</sup> КУО/см<sup>3</sup>; 3 — ЧМ<sub>03</sub> = 7 · 10<sup>4</sup> КУО/см<sup>3</sup>. Умови процесу: T = 288 ± 1 K

#### Зміна величин ЧМ та відношення ЧМ/ЧМ<sub>0</sub> від тривалості обробки мікробної води гелієм в залежності від різної вихідної кількості мікроорганізмів

Тривалість дії гелію, с	ЧМ для різної вихідної кількості мікроорганізмів, КУО/см <sup>3</sup>		
	3,4 · 10 <sup>4</sup>	4,8 · 10 <sup>4</sup>	7 · 10 <sup>4</sup>
1800	2,67 · 10 <sup>4</sup>	3,56 · 10 <sup>4</sup>	6,2 · 10 <sup>4</sup>
3600	1,83 · 10 <sup>4</sup>	2,75 · 10 <sup>4</sup>	5,79 · 10 <sup>4</sup>
5400	1,21 · 10 <sup>4</sup>	2,25 · 10 <sup>4</sup>	4,46 · 10 <sup>4</sup>
7200	7,8 · 10 <sup>3</sup>	1,3 · 10 <sup>4</sup>	3,66 · 10 <sup>4</sup>
ЧМ/ЧМ <sub>0</sub> для різної вихідної кількості мікроорганізмів, КУО/см <sup>3</sup>			
1800	0,79	0,76	0,89
3600	0,54	0,57	0,82
5400	0,36	0,47	0,64
7200	0,23	0,27	0,52

Як випливає з табличних даних, величини ЧМ/ЧМ<sub>0</sub> коливаються в близьких межах для нижчих концентрацій мікроорганізмів у воді, тоді як для ЧМ<sub>03</sub> = 7 · 10<sup>4</sup> КУО/см<sup>3</sup> величина ЧМ/ЧМ<sub>0</sub> після обробки гелієм тривалістю 7200 с є більшою практично вдвічі. Це свідчить про факт, що гелій демонструє вищу ефективність знезараження води за нижчих кількостей бацилярних клітин у водному середовищі. Ці дані підтверджують розраховані частки загиблих клітин, які дорівнюють 77,06 %; 72,92 % та 47,72 % (рис. 2), відповідно для ЧМ<sub>01</sub> = 3,4 · 10<sup>4</sup> КУО/см<sup>3</sup>, ЧМ<sub>02</sub> = 4,8 · 10<sup>4</sup> КУО/см<sup>3</sup> та ЧМ<sub>03</sub> = 7 · 10<sup>4</sup> КУО/см<sup>3</sup>.

Таким чином, барботуванням самого лише гелію вдалося досягнути найвищого ступеня знезараження води (77,06 %) за її мікробного забруднення 3,4 · 10<sup>4</sup> КУО/см<sup>3</sup>. Загалом ступінь знезараження води за мікробного навантаження 10<sup>4</sup> КУО/см<sup>3</sup> знаходиться в діапазоні 47,72...77,06 %. Це вказує на достатньо високу ефективність застосування лише самого гелію в процесах водоочищення, враховуючи факт присутності у воді лише резистентних мікроорганізмів.

#### Висновки

Досліджено життєдіяльність мікроорганізмів у воді з різною їх кількістю в одиниці об'єму води під час барботування гелію. Модельні води з різним вихідним числом мікроорганізмів в одиниці об'єму води піддавали безперервному барботуванню гелієм впродовж всієї тривалості процесу. Отримано зображення одно-добових та три-добових культур фіксованого препарату зі збільшенням мікроскопа в 1200 раз. Показано субтермінальне розташування овальних спор бацилярних клітин. Мікробне навантаження коливалося в межах одного порядку — 10<sup>4</sup> КУО на одиницю об'єму води. Найбільшу частку загиблих бацилярних клітин обчислено для найнижчої їх концент-

рації у воді ( $ЧМ_{01} = 3,4 \cdot 10^4$  КУО/см<sup>3</sup>), тобто 77,06 %. Досягнуто достатньо високий ступінь знезараження води від спорогенних паличкоподібних бактерій після дії самого гелію.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- [1] M. Haseena, M. F. Malik, and A. Javed, "Environmental Risk Assessment and Remediation," *J. Water pollution and human health*, no. 1(3), pp. 16-19, 2017. <https://doi.org/10.4066/2529-8046.100020>.
- [2] F. N. Chaudhry, and M. F. Malik, "Factors Affecting Water Pollution: A Review," *J. Ecosyst Ecography*, no. 7(1), 225 p., 2017.
- [3] Y. Du, Q. Y. Wu, and Y. Lu, "Increase of cytotoxicity during wastewater chlorination: impact factors and surrogates," *J. Hazard Mater.*, 324, pp. 681-690, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.11.042>.
- [4] I. Huma, I. Masih, and J. P. Hoek, "An exploration of disinfection by-products formation and governing factors in chlorinated swimming pool water," *J. Water Health.*, no. 6(6), pp. 861-892, 2018. <https://doi.org/10.2166/wh.2018.067>.
- [5] C. Bertelli, S. Courtois, and M. Rosikiewicz, "Reduced Chlorine in Drinking Water Distribution Systems Impacts Bacterial Biodiversity in Biofilms," *Front Microbiol.*, no. 9, pp. 252-260, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02520>.
- [6] I. H. Mohsen, A. H. Mohsen, and H. K. Zaidan, "Health effects of chlorinated water: a review article," *J. Biotechnol.*, no. 16(3), pp. 163-167, 2019. <https://doi.org/10.34016/pjbt.2019.16.3.24>.
- [7] A. Nescerecka, J. Rubulis, and M. Vital, "Biological instability in a chlorinated drinking water distribution network," *PLoS One*, no. 9(5), pp. 89-95, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096354>.
- [8] А. М. Пальчицкий, и Т. С. Малахова, «Эффективность очистки и обеззараживания сточных вод от вирусов», *Химия и технология воды*, № 17(6), с. 656-661, 1995.
- [9] Н. Г. Потапченко, Т. И. Левадная, и Н. М. Соболева, «Кинетика гибели E. coli под действием озона», *Химия и технология воды*, № 29(6), с. 582-594, 2007.
- [10] C. Li-Bing, Y. Sang-Tian, and X. Xin-Hui, "Enhanced sludge solubilization by microbubble ozonation," *Chemosphere*, no. 72(2), pp. 205-212, 2008.
- [11] K. Hiragaki, T. Ishimaru, and M. Nakanishi, "Generation of ozone foam and its application for disinfection," *Eur Phys J. Appl. Phys.*, no. 71, pp. 20810-20816, 2015.
- [12] M. Q. Zhu, N. Y. Gao, and W. H. Chu, "Impact of pre-ozonation on disinfection by-product formation and speciation from chlor(am)ination of algal organic matter of *Microcystis aeruginosa*," *Ecotox. Environ. Safe*, no. 120, pp. 256-262, 2015.
- [13] І. З. Коваль, «Життєздатність спорогенних бактерій в атмосфері інертних газів», *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, № 12(1), с. 8-13, 2020. <https://doi.org/10.26565/1992-4259-2020-23-10>.
- [14] І. З. Коваль, «Вплив концентрації аеробних бактерій на процес їх життєздатності в присутності кисню», *Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна серія «Екологія*, № 23, с. 118-123, 2020.
- [15] Ch. Dai, F. Xiong, and R. He, "Effects of low-intensity ultrasound on the growth, cell membrane permeability and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*," *Ultrasonics Sonochem.*, no. 36, pp. 191-197, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.11.035>
- [16] І. З. Коваль, «Переважаюча мікрофлора природних та стічних вод Львівщини», *Chemistry, Technology and Application of Substances*, № 3 (2), с. 121-126, 2020. <https://doi.org/10.23939/ctas2020.02.121>.

Рекомендована кафедрою екології та екологічної безпеки ВНТУ

Стаття надійшла до редакції 5.05.2021

**Коваль Ірина Зеновіївна** — канд. техн. наук, доцент, доцент кафедри фізичної, аналітичної та загальної хімії, e-mail: irynazk@gmail.com.

Національний університет «Львівська політехніка», Львів

I. Z. Koval<sup>1</sup>

## The Effect of Helium on Water Purification with Different Concentrations of Microorganisms

<sup>1</sup>Lviv Polytechnic National University

The influence of bubbled inert gas on the viability process of rod-shaped microorganisms in the water has been studied. The micro-objects were resistant sporogenic cells of *Bacillus cereus* type, which belong to the *Bacillaceae* family, and the test gas was helium. Helium was fed at a rate of 0.2 cm<sup>3</sup>/s. Bacteria were added to distilled deaerated water, creating model aqueous media with different initial numbers of microorganisms (NM). The concentration of microorganisms per unit volume of water was within the same order:  $NM_{01} = 3.4 \cdot 10^4$  CFU/cm<sup>3</sup>,  $NM_{02} = 4.8 \cdot 10^4$  CFU/cm<sup>3</sup> and  $NM_{03} = 7 \cdot 10^4$  CFU/cm<sup>3</sup>. An in-depth method of culturing bacterial cells was used. Conditions for culturing microorganisms was temperature of 37 °C, duration of 48 hours. NM values before and after experiments was determined by counting the colonies that grew on the nutrient medium on Petri dishes. The calculated number of cells was expressed in colony-forming units (CFU). During microscopic examinations, cells of the fixed preparations culture (1-day and 3-day) were studied. Fixed cell preparations at  $\times 1200$  are shown. The shape and size of the cells of the fixed preparation are shown, as well as the shape and location of

the spores inside the cells. Illustrative material shows the oval shape of the spores. It was found that the diameter of the spores is smaller than the cell diameter.

The results of experimental studies show a change of NM values over time, during which there was a decrease of the cells number per unit volume of water during the two-hour duration of the process, regardless of the different  $NM_0$ . The proportion of destroyed cells for each of their concentrations after every 30 minutes of water treatment was calculated and the values of the initial NM ratio to the current NM after each water sampling were given. The dependences of the proportion of destroyed cells of the treatment duration of microbial water with helium are graphically constructed. An increase in the proportion of destroyed cells with a decrease in the initial concentration of cells in the water was observed. The highest percentage of destroyed bacilli was reached at  $NM_{01} = 3.4 \cdot 10^4$  CFU/cm<sup>3</sup>, which was 77.06 %, while for  $NM_{02} = 4.8 \cdot 10^4$  CFU/cm<sup>3</sup> and  $NM_{03} = 7 \cdot 10^4$  CFU/cm<sup>3</sup> are 72.92 % and 47.72 %, respectively. Thus, a sufficiently high efficiency of helium alone during the treatment of microbial water containing resistant sporogenic bacteria has been experimentally shown.

**Keywords:** microorganisms, *Bacillus cereus*, destruction, gas, helium.

**Koval Iryna Z.** — Cand. Sc. (Eng.), Associate Professor, Associate Professor of the Chair of Physical, Analytical and General Chemistry, e-mail: irynazk@gmail.com

И. З. Коваль<sup>1</sup>

## Действие гелия на очистку воды с различной концентрацией микроорганизмов

<sup>1</sup>Национальный университет «Львовская политехника»

Исследовано влияние барботированного инертного газа на процесс жизнеспособности палочковидных микроорганизмов в воде. Микрообъектами служили резистентные спорогенные клетки рода *Bacillus cereus*, которые принадлежат к семейству *Bacillaceae*, а исследуемым газом — гелий. Гелий подавали со скоростью 0,2 см<sup>3</sup>/с. Бактерии вносили в дистиллированную дезаэрированную воду, создавая модельные водные среды с различным исходным числом микроорганизмов (ЧМ). Концентрация микроорганизмов в единице объема воды находилась в пределах одного порядка:  $ЧМ_{01} = 3,4 \cdot 10^4$  КОЕ/см<sup>3</sup>,  $ЧМ_{02} = 4,8 \cdot 10^4$  КОЕ/см<sup>3</sup> и  $ЧМ_{03} = 7 \cdot 10^4$  КОЕ/см<sup>3</sup>. Применяли глубокий метод культивирования бактериальных клеток. Условия культивирования микроорганизмов: температура 37 °С, продолжительность 48 часов. Величину ЧМ до и после экспериментов определяли подсчетом колоний, выросших на питательной среде на чашках Петри. Подсчитанное количество клеток выражали в колониеобразующих единицах (КОЕ). Во время микроскопических исследований изучены клетки культуры фиксированного препарата (одно-суточные и трех-суточные). Получено изображение клеток фиксированных препаратов при увеличении в 1200 раз. Показана форма и размеры клеток фиксированного препарата, а также форма и расположение спор, которые находятся внутри клеток. Иллюстративный материал демонстрирует овальную форму спор. Установлено, что диаметр спор меньше диаметра клетки.

По результатам экспериментальных исследований показано изменение величин ЧМ во времени, когда происходило уменьшение численности клеток в единице объема воды в течение двухчасового процесса, независимо от различного  $ЧМ_0$ . Рассчитано долю разрушенных клеток для каждой их концентрации после каждых 30-ти минут обработки воды и приведены величины отношения выходного ЧМ к текущему после каждого отбора проб воды. Графически построены зависимости доли погибших клеток от продолжительности обработки микробной воды гелием. Наблюдали увеличение доли погибших клеток с уменьшением исходной концентрации клеток в воде. Достигнут наивысший процент разрушенных бацилл при  $ЧМ_{01} = 3,4 \cdot 10^4$  КОЕ/см<sup>3</sup>, который составил 77,06 %, тогда как для  $ЧМ_{02} = 4,8 \cdot 10^4$  КОЕ/см<sup>3</sup> и  $ЧМ_{03} = 7 \cdot 10^4$  КОЕ/см<sup>3</sup> — 72,92 % и 47,72 %, соответственно. Таким образом, экспериментально показано достаточно высокую эффективность действия одного только гелия во время обработки микробной воды с содержанием резистентных спорогенных бактерий.

**Ключевые слова:** микроорганизмы, *Bacillus cereus*, разрушения, газ, гелий.

**Коваль Ирина Зеновьевна** — канд. техн. наук, доцент, доцент кафедры физической, аналитической и общей химии, e-mail: irynazk@gmail.com