

Гвоздяк П.И.¹, докт. биол. наук, проф.,
Сапура Е.В.¹, аспирант, **Демчина В.П.²**

¹ **Институт коллоидной химии и химии воды НАН Украины, Киев**
просп. Акад. Вернадского, 42, 03680 Киев-142, Украина, e-mail: sapura.work@gmail.com

² **Институт газа НАН Украины, Киев**
ул. Дегтяревская, 39, 03113 Киев, Украина, e-mail: ig-secr@i.com.ua

Очистка питьевой воды от нитратов пробиотиками

Изучали очистку питьевой воды от нитратов с помощью пробиотических бактерий *Bacillus subtilis*, *B. Licheniformis*, а также *Lactobacillus acidophilus*, *L. bifidus*, *L. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, которые входят в состав соответствующих медицинских препаратов. Показано, что при медленном (0,1 м/ч) фильтровании воды, содержащей 300–500 мг/дм³ нитратов, через зернистые (песок, активированный уголь) и волокнистую (химическое волокно в виде носителя ВИЯ) загрузки с предварительно иммобилизованными на них пробиотическими бактериями концентрация нитратов уменьшается до уровня ниже 2,5 мг/дм³. Жизнедеятельность и денитрифицирующую способность микроорганизмов поддерживали добавкой к исследуемой воде этилового спирта в количестве 0,1 см³ на каждые 100 мг KNO₃. Образующийся в результате денитрификации газ, состоял на 95–97 % из N₂, на 0,1–0,3 % из CO₂, иногда C₂H₄ (< 1 %), остальные (2–3 %) из H₂O и не содержал H₂, CH₄, H₂S. *Библ.* 14.

Ключевые слова: питьевая вода, нитраты, пробиотики, денитрификация.

Загрязнение природных вод нитратами растёт катастрофически по всему миру, что заставляет закрывать колодцы и использовать дорогие многоступенчатые методы очистки питьевой воды [1, 2]. В Украине также наблюдается неуклонное ежегодное увеличение количества загрязнённых нитратами источников питьевой воды [3].

Повышенная концентрация нитратов в воде пагубно влияет на организм человека, а у детей нитраты легко восстанавливаются до нитритов, которые взаимодействуют с гемоглобином крови с образованием метгемоглобина, что приводит к болезни крови, известной как «посинение кожных покровов» («blue baby syndrome») [4].

В соответствии с международными и отечественными стандартами, концентрация нитратов (NO₃⁻) в воде не может превышать 45 мг/дм³, а в доочищенной — даже 5 мг/дм³ [5], а в колодцах многих областей Украины этот уровень достигает 950 мг/дм³ [3, 4].

Существует много методов освобождения воды от нитратов: химические (восстановление железом, алюминием, палладием и др.), физико-химические (электролиз, ионный обмен, нанофильтрация, обратный осмос), биологические (гетеротрофная и автотрофная денитрификация, применение мембранных биореакторов). Однако на практике используются только ион-

ный обмен, обратный осмос, электролиз и гетеротрофная (биологическая) денитрификация [1, 6, 7].

Биологическая денитрификация известна почти полтора века. Благодаря своей простоте, относительной дешевизне и безусловной экологичности она очень широко и успешно используется в очистке промышленных и особенно коммунальных сточных вод. В научно-технической литературе представлены примеры биологического освобождения питьевой воды от нитратов. В частности, Nilsson и Ohlson [8] ещё в 1982 г. предложили использовать иммобилизованные в альгинатный гель клетки *Pseudomonas denitrificans* для осуществления биологической денитрификации, а в качестве источника углерода добавлять этанол. Они добились впечатляющих результатов: концентрация нитратов уменьшилась от 104 до 0,1 мг/дм³. Однако иммобилизация в альгинатный гель — это технически сложная и дорогостоящая процедура, а закрепленные таким образом микробные клетки не могут, к сожалению, функционировать длительное время.

В [9] предложено использовать для освобождения питьевой воды от нитратов «микробные сообщества» (microbial communities) неопределённого состава. Но очистка воды от нитратного загрязнения таким способом также является опасной для здоровья человека, так как бакте-

рии рода *Pseudomonas* являются условно патогенными и вредными для организма человека, а поэтому использование их в практике подготовки питьевой воды недопустимо, а микробные сообщества неопределенного состава могут содержать патогенные микробы.

Цель данного исследования — изучение процесса очистки питьевой воды от избытка в ней нитратов с помощью пробиотических бактерий, которые не только безвредны, но и чрезвычайно полезны для здоровья человека [10].

Экспериментальные методы исследования

В опытах использовали лиофилизированные массы живых микробных клеток *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* медицинского препарата «Биоспорин-Биофарма» (Украина) и *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* препарата «Йогурт в капсулах» фирмы «Pharma science» (Канада). Культуры выращивали на питательном агаре Государственного предприятия «Экспериментальный завод медпрепаратов» ИБОНХ НАН Украины и иммобилизовали на предварительно простерилизованных материалах: 1) песке, через который фильтруют питьевую воду на Днепровской водопроводной станции ОАО «АК «Киевводоканал»; 2) песке гранодиоритном [11] (размер фракции 3,0–5,0 мм), соответственно с ТУ У 324584–01–80–01; 3) гранулированном активированном угле микрорпористом битумном с высокими адсорбционными свойствами и волокнистым носителем «ВИЯ» соответственно с техническими условиями ТУ 995990.

Воду из крана, предварительно отстоянную в течение 1 сут, с внесенными в нее по 300–500 мг KNO_3 и по 0,5–0,7 см³ этилового спирта на 1 дм³ воды, пропускали снизу вверх сначала под гидростатическим давлением, а затем с помощью перистальтического насоса в режиме медленного фильтрования (со скоростью 0,1 м/ч) через слой (20–25 см) иммобилизованного пробиотиками песка, гранодиорита и активированного угля в колонках диаметром 30, 50 и 80 мм соответственно. Иммобилизованный пробиотиками носитель ВИЯ монтировали в колонке диаметром 20 мм и высотой слоя 100 см из расчета 10 кг носителя в 1 м³ фильтра.

Опыты проводили при комнатной температуре (12–25 °С) в течение 300 дней с перерывами на 1 и 3 мес. Химический анализ воды на содержание нитрат-иона проводили с помощью метода трехволновой фотометрии в ультрафиолете [12] и с помощью бумажного Nitrat-Test

фирмы «Merck» (Германия). Количество микроорганизмов в очищенной воде определяли по ГОСТ 18963–73.

Для определения газа, образующегося при освобождении воды от нитратов с помощью пробиотических бактерий, в биореакторы (ПЭТ-бутылки емкостью 5,5 дм³) вносили по 1 дм³ носителя (песка, активированного угля) с иммобилизованными на нем пробиотиками, 3 дм³ отстоянной водопроводной воды, 6 г KNO_3 и 12 см³ этанола. Бутылки закрывали резиновыми пробками с отверстиями со стеклянными патрубками, на которые надевали резиновые шланги, которые после полного вытеснения воздуха из ПЭТ-бутылок перекрывали зажимами. Биореакторы инкубировали в термостате при 28 °С в течение 3–4 сут, затем образовавшийся газ направляли в предварительно заполненные 20 %-м водным раствором NaCl газовые пипетки и отдавали на анализ в специальную лабораторию при Институте газа НАН Украины. Анализ газа осуществляли на газовом хроматографе 6890 N фирмы «Agilent». Условия анализа: детектор — катарометр; анализ легких газов проводили на колонке MOLSIV длиной 15 м, углеводов — на колонке PLOTQ длиной 15 м. Образцы газа вводили непосредственно в дозатор хроматографа. Эксперименты состояли из четырех серий опытов.

Результаты и их обсуждение

Предложенные еще в 1829 г. английским инженером Симпсоном так называемые медленные, или английские фильтры для подготовки питьевой воды [13] переживают сейчас определенное возрождение. На любых загрузках таких фильтров (песке, активированном угле и т.п.) интенсивно развиваются микроорганизмы, образуя мощную биопленку, которая способствует очищению воды. Однако исследования последних лет свидетельствуют о большом разнообразии организмов, создающих такую биопленку, о наличии в ней и не очень желательных микробов. Чтобы избежать такого развития событий, было предложено не полагаться на спонтанное создание биопленки из тех микроорганизмов, которые существуют в очищаемой воде, а зафиксировать на загрузках фильтров эпидемически безопасных, полезных для здоровья человека пробиотических бактерий [14].

В развитие этой идеи мы иммобилизовали на загрузках фильтров для воды именно пробиотические бактерии, которые к тому же способны осуществлять процесс денитрификации — восстановление нитратов до молекулярного азота с использованием этилового спирта в ка-

честве источника электронов, энергии и углерода. Использовали тщательно проверенные штаммы бактерий, которые входят в состав медицинских препаратов и продаются в аптечной сети.

Загруженные носителями с иммобилизованными на них пробиотическими бактериями лабораторные колонки-фильтры пришлось сначала промыть в течение 2 сут в режиме медленно-го фильтра для окончательного их созревания и предупреждения вымывания из них избыточного количества пробиотических бактерий. Дальнейшее пропускание воды с повышенным в несколько раз по сравнению с предельно допустимой концентрацией (45 мг/дм³) содержанием нитратов (300–500 мг KNO₃ в 1 дм³ воды) и этанола (0,5–0,7 см³ в 1 дм³ воды) со скоростью 0,1 м/ч приводило к стабильному снижению концентрации нитратов до уровня менее 2,5 мг/дм³ (по методу трехволновой фотометрии в ультрафиолете) и к их отсутствию (по бумажному нитрат-тесту).

Микробиологический анализ очищенной воды показывал наличие бактерий (по культуральным признакам и микроскопии — практически исключительно используемых пробиотиков) в количествах 30–70 колониеобразующих единиц в 1 см³ воды.

Впоследствии выяснилось, что газ, который образуется в результате денитрификации непосредственно в местах, где находятся иммобилизованные бактерии, то есть в теле фильтра, своеобразно кольматирует загрузки, затрудняет прохождение воды сквозь песчаные и угольные фильтры. Увеличение гидростатического давления подаваемой на фильтрование воды до 2,5 м не дало желаемых результатов. Переход к колонкам большего диаметра (80 мм), периодическое осторожное перемешивание загрузки тонким металлическим шпателем на некоторое короткое время улучшало ситуацию, однако не решало проблемы. Заполнение фильтра крупнозернистой (размером 3–5 мм) фракцией градиоритного песка с иммобилизованными на нем пробиотиками продолжило нормальную бесперебойную работу фильтра до 10–12 сут, а потом приходилось перезаряжать фильтр. Нужно также обратить внимание, что высота слоя загрузки (песка, угля) фильтра в лабораторных условиях была в несколько раз меньше слоя классического английского фильтра (100 см). Дальнейшие исследования проводили с подачей очищаемой воды на фильтры снизу вверх с помощью перистальтических насосов, поддерживая скорость фильтрования до 0,1 м/ч. Концентрация нитратов в воде на выходе из фильт-

ра не превышала 2,5 мг/дм³, число микроорганизмов в 1 см³ редко достигало 100–110, значение pH увеличивалось на 0,2–0,5; окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) снижался от –(15–21) до –(50–57) мВ.

Использование волокнистых носителей ВИЯ с иммобилизованными на них пробиотиками в колонке с высотой слоя 100 см не обеспечивало надежного удержания микроорганизмов, превышало их количество в воде на выходе из колонки в несколько раз и даже на порядки по сравнению с ГОСТ 2874–82 «Вода питьевая», и поэтому пришлось пропускать воду после этого фильтра через дополнительный фильтр со слоем песка толщиной 5 см для отделения микробных клеток от очищенной от нитратов воды. Месячный и даже трехмесячный перерыв в фильтровании воды через загрузку с пробиотиками не повлек потери денитрифицирующих способностей иммобилизованных бактерий: уже через 18–24 ч после восстановления медленного фильтрования загрязненной нитратами воды концентрация нитратов снижалась до 2 и ниже. Как показал хроматографический анализ, газ, образовавшийся в результате пробиотической денитрификации в периодических условиях культивирования микроорганизмов в ПЭТ-бутылках (5,5 дм³), на 95–97 % состоит из N₂; в нем содержится незначительное (0,1–0,3 %) количество CO₂, иногда менее 1 % C₂H₄, остальные 2–3 % — H₂O; отсутствуют водород, метан, сероводород. В процессе периодической (без протока воды с нитратами) денитрификации pH воды увеличивается от начальных 6,2 до 8,6 и даже до 9,5 единиц; ОВП снижается с +50 до –(80–130) мВ.

Выводы

В результате проведенной работы показана возможность очистки питьевой воды от опасного загрязнения — нитратов в избыточных концентрациях — с помощью экологически дружелюбных, гигиенически безопасных, полезных для здоровья человека пробиотических бактерий.

Авторы выражают благодарность канд. техн. наук Борисову Б.М. за предоставление градиоритной загрузки, а также общественной организации «МАМА-86» за бумажные нитрат-тесты.

Список литературы

1. Archana, Sharma S.K., Sobti R.Ch. Nitrate Removal from Ground Water: A Review // E-Journal of Chemistry. — 2012. — Vol. 9, № 4. — P. 1667–1675.

2. Burow, K.R., Nolan, B.T., Rupert, M.G., Dubrovsky, N.M. Nitrate in groundwater of the United States // *Environmental Science and Technology*. — 2010. — Vol. 44, № 13. — P. 4988–4997.
3. Коваль В.В., Наталочка В.О., Ткаченко С.К., Міненко О.В. Динаміка забруднення вод сільськогосподарського призначення нітратами в умовах Полтавської області // *Вісн. Полтав. держ. аграр. акад.* — 2011. — № 2. — С. 32–36.
4. Bondarenko Y.G., Samotuga V.V., Papach V.V., Bilyk L.I. Medical-hygienic evolution of the impact of the nitrates of water of decentralized water delivery sources on the health status of the children of the early age // *Environment and Health*. — 2011. — № 4. — P. 23–25.
5. Гончарук В.В. SOS: Питтьєвая вода // *Химия и технология воды*. — 2010. — Т. 32, № 5. — С. 463–512.
6. Zhang Y, Angelidaki I. A new method for in situ nitrate removal from groundwater using submerged microbial desalination-denitrification cell (SMDDC) // *Water Research*. — 2013. — Vol. 47, № 5. — P. 1827–1836.
7. Гончарук В.В., Клименко Н.А., Савчина Л.А., Врубель Т.Л., Козятник И.П. Современные проблемы технологии подготовки питьевой воды // *Химия и технология воды*. — 2006. — Т. 28, № 1. — С. 3–95.
8. Nilsson J, Ohlson S. Columnar denitrification of water by immobilized *Pseudomonas denitrificans* cells // *Eur. J. Appl. Microbiol.* — 1982. — № 14. — P. 86–90.
9. Upadhyaya G, Jackson J, Clancy T.M, Hyun S.P, Brown J, Hayes K.F, Raskin L. Simultaneous removal of nitrate and arsenic from drinking water sources utilizing a fixed-bed bioreactor system // *Water Research*. — 2010. — Vol. 44, № 17. — P. 4958–4969.
10. Ширококов В.П., Янковський Д.С., Димент Г.С. Мікробна екологія людини з кольоровим атласом. — Київ : Червона Рута-Турс, 2009. — 312 с.
11. Пат. 30382 Укр., МПК В 01 Д 24/00. Спосіб очищення води / Б.М.Борисов, В.С.Гедз, В.В.Байранов. — Опубл. 2001, Бюл. № 11.
12. Калиниченко И.Е., Демущая Л.Н. Определение нитратов в питьевой воде методом трехволновой фотометрии в ультрафиолете // *Журн. аналит. химии*. — 2004. — Т. 59, № 3. — С. 240–244.
13. Хлопин Г.В. Курс общей гигиены. — М.; Л. : Госиздат, 1930. — 556 с.
14. Пат. 98326 Укр., МПК С 02 F 3/34 (2006.01). Спосіб біологічного доочищення питної води / П.І.Гвоздяк // *Промислова власність*. — Опубл. 2012, Бюл. № 9.

Поступила в редакцію 26.01.15

**Гвоздяк П.І.¹, докт. біол. наук, проф.,
Сапура О.В.¹, аспірант, Демчина В.П.²**

¹ **Інститут колоїдної хімії та хімії води НАН України, Київ**

просп. Акад. Вернадського, 42, 03680 Київ-142, Україна, e-mail: sapura.work@gmail.com

² **Інститут газу НАН України, Київ**

вул. Дегтярівська, 39, 03113 Київ, Україна, e-mail: ig-secr@i.com.ua

Очищення питної води від нітратів пробіотиками

Вивчали очищення питної води від нітратів за допомогою пробіотичних бактерій *Vacillus subtilis*, *V. licheniformis*, а також *Lactobacillus acidophilus*, *L. bifidus*, *L. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, які входять до складу відповідних медичних препаратів. Показано, що при повільному (0,1 м/год) фільтруванні води із вмістом нітратів 300–500 мг/дм³ через зернисті (пісок, активоване вугілля) та волокнисту (хімічне волокно у вигляді носія ВІЯ) загрузки з попередньо іммобілізованими на них пробіотичними бактеріями концентрація нітратів зменшується до рівня нижче 2,5 мг/дм³. Життєдіяльність та денітрифікуючу здатність мікроорганізмів підтримували додаванням до досліджуваної води етилового спирту в кількості 0,1 см³ на кожні 100 мг КNO₃. Газ, що утворювався під час денітрифікації, складався на 95–97 % з N₂, на 0,1–0,3 % з CO₂, іноді C₂H₄ (< 1 %), решта (2–3 %) з H₂O та не містив H₂, CH₄, H₂S. *Бібл.* 14.

Ключові слова: питна вода, нітрати, пробіотики, денітрифікація.

Gvozdyak P.I.¹, Doctor of Biological Sciences, Professor,
Sapura E.V.¹, PhD Student, **Demchina V.P.²**

¹ **Institute of Colloid Chemistry and Chemistry of Water National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev**

42, Acad. Vernadsky ave., 03680 Kiev-142, Ukraine, e-mail: sapura.work@gmail.com

² **The Gas Institute of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev**

39, Degtyarivska Str., 03113 Kiev, Ukraine, e-mail: ig-secr@i.com.ua

Dismissal of Potable Water from Nitrate by Means of Probiotics

We have investigated the purification of potable water from nitrate by means probiotic bacteria *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* as well as *Lactobacillus acidophilus*, *L. bifidus*, *L. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*, which form part of corresponding medical preparations. It was shown that slow (0.1 m/h) filtration of water, with contents 300–500 mg/l of nitrate, through the grain of sand and activated carbon, the chemical fiber under the pretext of carrier «VIYA» with immobilized probiotic bacteria on them, led to the reduction of nitrate concentration below 2.5 mg/l. Ethanol (0.1 ml to each 100 mg KNO₃) was added to treated water for support of microbial growth. The denitrification gas consisted of 95–97 % of N₂, 0.1–0.3 % – CO₂ sometimes C₂H₄ (< 1 %), and (2–3 %) – H₂O and did not contained H₂, CH₄, H₂S. *Bibl. 14.*

Key words: potable water, nitrate, probiotic, denitrification.

References

1. Archana, Sharma S.K., Sobti R.Ch. Nitrate Removal from Ground Water: A Review. *E-Journal of Chemistry*, 2012, 9 (4), pp. 1667–1675.
2. Burow, K.R., Nolan, B.T., Rupert, M.G., Dubrovsky, N.M. Nitrate in groundwater of the United States. *Environmental Science and Technology*, 2010, 44 (13), pp. 4988–4997.
3. Koval V.V., Natalochka V.A., Tkachenko S.K., Minenko O.V. Dynamics of water pollution by nitrates agricultural land in the Poltava region conditions. *Visnyk Poltavskoyi derzhavnoyi agrarnoyi akademiyi*, 2011, (2), pp. 32–36 (Ukr.).
4. Bondarenko Y.G., Samotuga V.V., Papach V.V., Bilyk L.I. Medical-hygienic evolution of the impact of the nitrates of water of decentralized water delivery sources on the health status of the children of the early age. *Environment and Health*, 2011, (4), pp. 23–25.
5. Goncharuk V.V. SOS: Drinking water. *Khimiya i Tekhnologiya Vody. [Journal of Water Chemistry and Technology]*, 2010, 32 (5), pp. 463–512. (Rus.)
6. Zhang Y, Angelidaki I. A new method for in situ nitrate removal from groundwater using submerged microbial desalination-denitrification cell (SMDDC). *Water Research*, 2013, 47 (5). pp. 1827–1836.
7. Goncharuk V.V., Klimenko N.A., Savchina L.A., Vrubel T.L., Kozyatnik I.P. Water treatment and demineralization technology. Current issues in the technology of drinking water conditioning. *Khimiya i Tekhnologiya Vody [Journal of Water Chemistry and Technology]*, 2006, 28 (1), pp. 2–49. (Rus.)
8. Nilsson J., Ohlson S. Columnar denitrification of water by immobilized *Pseudomonas denitrificans* cells. *Eur. J. Appl. Microbiol.*, 1982, (14), pp. 86–90.
9. Upadhyaya G, Jackson J, Clancy T.M, Hyun S.P, Brown J, Hayes K.F, Raskin L. Simultaneous removal of nitrate and arsenic from drinking water sources utilizing a fixed-bed bioreactor system. *Water Research*, 2010, 44 (17), pp. 4958–4969.
10. Shyrobokov V.P., Yankovsky D.S., Dymet G.S. Microbiol ecology of man. Kiev : Chervona Ruta-Turs, 2009, 312 p. (Ukr.)
11. Borisov B.M., Gedz V.S., Bayranov V.V. A method of water purification. Patent of Ukraine 30382, Bull. N 11. 2001 (Ukr.).
12. Kalynyuchenko I.E., Demutskaya L.N. Determination of nitrate in drinking water by three-wave ultraviolet photometry. *Journal of Analytical Chemistry*, 2004, 59 (3), pp. 240–244 (Rus.).
13. Hlopin G.V. The course of general hygiene. Moscow; Leningrad : Gosizdat, 1930, 556 p. (Rus.).
14. Gvozdyak P.I. Method of biological purification of drinking water. Patent of Ukraine, 98326. – Publ. 2012, Bull. 9. (Ukr.)

Received January 26, 2015