



УДК 631.461.4:628.16.0671

П. І. Гвоздяк, О. В. Сапура, В. Ф. Коваленко, О. С. Болгова,
В. П. Демчина

Звільнення питної води від нітратів пробіотиками

(Представлено академіком НАН України В. С. Підгорським)

*Вивчали ефективність очищення питної води від нітратів за допомогою пробіотичних бактерій *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, а також *Lactobacillus acidophilus*, *L. bifidus*, *L. bulgaricus* і *Streptococcus thermophilus*, які входять до складу відповідних медичних препаратів. Показано, що при повільному (0,1 м/год) фільтруванні води з вмістом нітратів 300–500 мг/дм³ через зернисте (пісок, активоване вугілля) та волокнисте (хімічне волокно у вигляді носія ВІЯ) завантаження з попередньо іммобілізованими на них пробіотичними бактеріями концентрація нітратів зменшувалася 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, незначної кількості CO₂ (0,1–0,3%), іноді C₂H₄ (<1%), H₂O (2–3%) і не містив H₂, CH₄, H₂S. Біотестування (на дафніях, гідрах, зернах озимої пшениці) підтвердило високу якість і безпечність одержаної в результаті пробіотичної денітрифікації води.*

Забруднення природних вод нітратами зростає катастрофічно у всьому світі, що змушує закривати криниці та використовувати дорогі багатоступеневі методи очищення питної води [1, 2]. В Україні також спостерігається неухильне щорічне збільшення кількості понаднормово забруднених нітратами джерел питної води [3]. Встановлено, що нітрати у підвищеній концентрації в питній воді згубно впливають на організм людини, а у дітей легко відновлюються до нітритів, які взаємодіють з гемоглобіном крові, спричиняючи утворення метгемоглобіну, що призводить до хвороби крові, відомої як “посиніння шкірних покривів” (“blue baby syndrome”) [4]. Відповідно до міжнародних і вітчизняних стандартів концентрація нітратів у питній воді не повинна перевищувати 45 мг NO₃⁻ в 1 дм³, а в доочищеній — навіть 5 мг NO₃⁻ в 1 дм³ [5], тоді як в криницях багатьох областей України цей рівень сягає 950 мг NO₃⁻ в 1 дм³ [3, 4].

Існує ряд хімічних (відновлення залізом, алюмінієм, паладієм тощо), фізико-хімічних (електродіаліз, іонний обмін, нанофільтрування, зворотний осмос) та біологічних (гетеро-

© П. І. Гвоздяк, О. В. Сапура, В. Ф. Коваленко, О. С. Болгова, В. П. Демчина, 2014

трофна і автотрофна денітрифікація, застосування мембранних біореакторів) методів звільнення води від нітратів, однак на практиці використовується лише іонний обмін, зворотний осмос, електродіаліз та гетеротрофна (біологічна) денітрифікація [1, 6, 7].

Біологічна денітрифікація відома майже півтора століття. Завдяки своїй простоті, відносній дешевизні та безумовній екологічності даний метод дуже широко й успішно використовується в очищенні промислових і особливо комунальних стічних вод, однак у підготовці питної води стикається з певними труднощами, пов'язаними в основному з гігієнічними застереженнями щодо безпеки мікроорганізмів-денітрифікаторів, а також з технологічними складнощами іммобілізації бактерій на різноманітних носіях [8, 9].

Метою даного дослідження було вивчення процесу очищення питної води від надлишку в ній нітратів за допомогою пробіотичних бактерій, які, як відомо [10], не тільки нешкідливі, а й надзвичайно корисні для здоров'я людини — від немовляти до найповажнішого віку.

Матеріали і методи. У дослідях використовували ліофілізовані маси живих мікробних клітин *Bacillus subtilis* та *Bacillus licheniformis* медичного препарату “Біоспорин-Біофарма” (Україна) та *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus bulgaricus* і *Streptococcus thermophilus* препарату “Йогурт у капсулах” (“Pharma science”, Канада). Культури вирощували на поживному агарі Державного підприємства “Експериментальний завод медпрепаратів” ІБОНХ НАН України та іммобілізували на попередньо простерилізованих: 1) піску, через який фільтрують питну воду на Дніпровській водопровідній станції ПАТ “АК “Київводоканал”; 2) піску гранодіоритному [11] (розмір фракції 3,0–5,0 мм), за ТУ У 324584-01-80-01; 3) гранульованому активованому вугіллі мікропористому бітумному з високими адсорбційними властивостями та волокнистому носієві ВІЯ за ТУ 995990.

Воду з крана, відстояну протягом доби, з внесеними до неї по 300–500 мг KNO_3 та по 0,5–0,7 см^3 етилового спирту на 1 дм^3 води, пропускали знизу вверх спочатку під гідростатичним тиском, а потім за допомогою перистальтичного насоса в режимі повільного фільтрування (зі швидкістю 0,1 м/год) через 20–25 см шар іммобілізованого пробіотиками піску, гранодіориту і активованого вугілля в колонках діаметром 30, 50 та 80 мм відповідно.

Іммобілізований пробіотиками носій ВІЯ монтували в колонці діаметром 20 мм і висотою шару 100 см з розрахунку 10 кг носія в 1 м^3 фільтра.

Досліди проводили при кімнатній температурі (12–25 °С) протягом 300 діб з перервами на 1 і 3 міс. Хімічний аналіз води на вміст нітрат-іона здійснювали за методом трихвильової фотометрії в ультрафіолеті [12] та за допомогою паперового Nitrat-Test фірми “Merck” (Німеччина). Кількість мікроорганізмів в очищеній воді визначали за ГОСТ 18963-73.

Для визначення складу газу, що утворюється при звільненні води від нітратів за допомогою пробіотичних бактерій, в біореактори — ПЕТ-пляшки місткістю 5,5 дм^3 — вносили по 1 дм^3 носія (піску, активованого вугілля) з іммобілізованими на ньому пробіотиками, 3 дм^3 відстояної водопровідної води, 6 г KNO_3 і 12 см^3 етанолу. Пляшки закривали гумовими корками з отворами зі скляними патрубками, на які одягали гумові шланги, які після повного витіснення повітря з ПЕТ-пляшок перекривали затискачами. Біореактори інкубували в термостаті (28 °С) протягом 3–4 діб, і газ, що утворювався, спрямовували в попередньо заповнені 20%-м водним розчином NaCl газові піпетки. Аналіз газу здійснювали на газовому хроматографі 6890N (“Agilent”, США) у спеціальній лабораторії при Інституті газу НАН України. Умови аналізу: детектор — катарометр; аналіз легких газів проводили на колонці MOLSIV завдовжки 15 м, вуглеводнів — на колонці PLOTQ завдовжки 15 м. Зразки газу вводили безпосередньо в дозатор хроматографа.

Досліди ставили в чотирьох повторностях.

Біотестування води до та після пробіотичної денітрифікації здійснювали на представниках безхребетних водних організмів, а також на зернах озимої пшениці. Безхребетні — гідра *Hydra attenuata* (Palles, 1860) та *Daphnia magna* (Straus, 1820) досліджувалися за затвердженими в Україні ДСТУ 4173 : 2003 і ДСТУ 4174 : 2003, що відповідають міжнародним стандартам ISO 6341 : 1996 та ISO 10706 : 2000. Тест-організми експонували в статичних системах протягом 96 год.

Зерна озимої пшениці *Triticum durum* Desf. пророщували на зволожений контрольною та досліджуваною водою кружечках фільтрувального паперу в чашках Петрі (по 10 штук у кожній) при 20–22 °С протягом 72 год. Після закінчення експозиції вимірювали довжину і масу корінців.

Статистичну обробку результатів дослідження проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Вірогідність різниці ($p < 0,05$) оцінювали за t -критерієм Стьюдента; використовували прикладну програму “Microsoft Excel”.

Результати та їх обговорення. Запропоновані ще 1829 р. англійським інженером Дж. Сімпсоном так звані повільні, або англійські, фільтри для підготовки питної води [13] переживають зараз певне відродження. Відомо, що на будь-яких завантаженнях таких фільтрів — піску, активованому вугіллі тощо — інтенсивно розвиваються мікроорганізми, утворюючи потужну біоплівку, яка сприяє очищенню води. Водночас дослідження останніх років свідчать про неабияку розмаїтість організмів, що створюють таку біоплівку, про присутній в ній вміст і не дуже бажаних мікробів. Аби уникнути такого розвитку подій, було запропоновано не покладатися на спонтанне створення біоплівки з тих мікроорганізмів, які існують у воді, що очищається, а іммобілізувати на завантаженнях фільтрів епідемічно безпечних, корисних для здоров'я людини пробіотичних бактерій [14].

У розвиток цієї ідеї ми іммобілізували на завантаженнях фільтрів для води саме пробіотичних бактерій, які до того ж здатні здійснювати процес денітрифікації — відновлення нітратів до молекулярного азоту з використанням етилового спирту як джерела електронів, енергії та вуглецю. Використовували ретельно перевірених штамів бактерій, які входять до складу медичних препаратів і продаються в аптечній мережі.

Завантажені носіями з іммобілізованими на них пробіотичними бактеріями лабораторні колонки-фільтри довелося спочатку промити протягом двох діб у режимі “повільного” фільтрування для остаточного їх “дозрівання” і запобігання вимиванню з них надлишкової кількості пробіотичних бактерій. Подальше пропускання води з підвищеним у декілька разів порівняно з гранично допустимою концентрацією (45 мг/дм³) вмістом нітратів (300–500 мг КNO₃/дм³ води) та етанолу (0,5–0,7 см³/дм³ води) зі швидкістю 0,1 м/год приводило до стабільного зниження концентрації нітратів до рівня менше 2,5 мг/дм³ (за методом трихвильової фотометрії в ультрафіолеті) і до їх відсутності (за паперовим нітрат-тестом).

Мікробіологічний аналіз очищеної води показав наявність бактерій (за культуральними ознаками та мікроскопією — практично тільки використовуваних пробіотиків) у кількостях 30–70 колоній утворюючих одиниць в 1 см³ води.

Однак згодом з'ясувалося, що газ, який утворюється в результаті денітрифікації безпосередньо в місцях, де знаходяться іммобілізовані бактерії, тобто в тілі фільтра, своєрідно кольматує завантаження, утруднює проходження води крізь піщані та вугільні фільтри. Збільшення гідростатичного тиску води, що подавалася на фільтрування, до 2,5 м не дало бажаних результатів. Перехід до колонок більшого діаметра (80 мм), періодичне обережне переміщення завантаження тонким металевим шпателем на деякий короткий час покращувало ситуацію, проте не вирішувало проблеми. Заповнення фільтра крупнозернистою

(розміром 3–5 мм) фракцією градіоритного піску з іммобілізованими на ньому пробіотиками продовжило нормальну безперебійну роботу фільтра до 10–12 діб, а тоді доводилося перезаряджати фільтр. Потрібно також звернути увагу на те, що висота шару завантаження (піску, вугілля) фільтра в лабораторних умовах була в декілька разів меншою від шару класичного “англійського” фільтра (100 см). Подальші дослідження проводили з подачею води, що очищається, на фільтри знизу вверх за допомогою перистальтичних насосів, підтримуючи швидкість фільтрування до 0,1 м/год. Концентрація нітратів у воді на виході з фільтра не перевищувала 2,5 мг/дм³, число мікроорганізмів в 1 см³ рідко сягало 100–110, рН зростало на 0,2–0,5 одиниць; окисно-відновний потенціал знижувався з –15...–21 до –50...–57 мВ.

Використання волокнистих носіїв ВІЯ з іммобілізованими на них пробіотиками в колонці з висотою шару 100 см не забезпечувало надійного утримування мікроорганізмів, їх кількість у воді на виході з колонки у декілька разів і навіть на порядки перевищувала норму, затверджену ГОСТ 2874–82 “Вода питна”, і тому довелося пропускати воду після цього фільтра через додатковий фільтр з шаром піску завтовшки 5 см для відділення мікробних клітин від позбавленої нітратів води. Місячна і навіть тримісячна перерва у фільтруванні води через завантаження з пробіотиками не спричинялася до втрати денітрифікуючої здатності іммобілізованих бактерій: вже через 18–24 год після відновлення повільного фільтрування забрудненої нітратами води концентрація нітратів знижувалася до 2 мг/дм³ і нижче. Як показав хроматографічний аналіз, газ, що утворювався в результаті пробіотичної денітрифікації в періодичних умовах культивування мікроорганізмів у 5,5 дм³ ПЕТ-пляшках, на 95–97% складається з N₂; у ньому міститься незначна (0,1–0,3%) кількість CO₂, іноді C₂H₄ (менше 1%), решта (2–3%) — H₂O; відсутні — водень, метан, сірководень. У процесі такої періодичної (без потоку води з нітратами) денітрифікації рН води збільшується з початкових 6,2 до 8,6 і навіть 9,5 одиниць; окисно-відновний потенціал знижується з +50 до –80...–130 мВ.

Таким чином, у результаті проведеної роботи показана можливість очищення питної води від небезпечного забруднення — нітратів — у надлишкових концентраціях за допомогою екологічно та гігієнічно безпечних, корисних для здоров’я людини пробіотичних бактерій.

Автори висловлюють подяку канд. хім. наук І. О. Калниченку за визначення нітратів у воді, канд. техн. наук Б. М. Борисову за надання градіоритного завантаження та громадській організації “МАМА-86” за паперові нітрат-тести.

1. Archana, Sharma S. K., Sobti R. Ch. Nitrate removal from ground water: a review // E-J. Chem. – 2012. – 9, No 4. – P. 1667–1675.
2. Burow K. R., Nolan B. T., Rupert M. G., Dubrovsky N. M. Nitrate in groundwater of the United States // Environ. Sci. and Technol. – 2010. – 44, No 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. академії. – 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 // Environ. and Health. – 2011. – No 4. – P. 23–25.
5. Гончарук В. В. SOS: Питьева вода // Химия и технология воды. – 2010. – 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 Res. – 2013. – 47, No 5. – P. 1827–1836.
7. Гончарук В. В., Клименко Н. А., Савчина Л. А. и др. Современные проблемы технологии подготовки питьевой воды // Химия и технология воды. – 2006. – 28, № 1. – С. 3–95.
8. Иванов В. Н., Уланов М. Н., Стабникова Е. В. Денитрификация питьевой воды клетками *Paracoccus denitrificans* в природной и искусственно сформированной биопленках // Там же. – 2001. – № 2. – С. 209–218.

9. Уланов М. М. Розробка технології денітрифікації підземної води у реакторі з фіксованою біоплівкою: Автореф. дис. ... канд. техн. наук / Національний університет харчових технологій. – Київ, 2003. – 26 с.
10. Ширококов В. П., Янковський Д. С., Димент Г. С. Мікробна екологія людини з кольоровим атласом: Навч. посібник. – Київ: ТОВ “Червона Рута-Турс”, 2009. – 312 с.
11. Пат. 30382 Україна, МПК В01 D 24/00. Спосіб очищення води / Б. М. Борисов, В. С. Гедз, В. В. Байранов. – 2001, Бюл. № 11.
12. Калиниченко И. Е., Демуцкая Л. Н. Определение нитратов в питьевой воде методом трехволновой фотометрии в ультрафиолете // Журн. аналит. химии. – 2004. – 59, № 3. – С. 240–244.
13. Хлопин Г. В. Курс общей гигиены. – Москва; Ленинград: Госиздат, 1930. – 556 с.
14. Пат. 98326 Україна, МПК С02F 3/34 (2006.01). Спосіб біологічного доочищення питної води / П. І. Гвоздяк // Промислова власність. – 2012, Бюл. № 9.

Інститут колоїдної хімії та хімії води
ім. А. В. Думанського НАН України, Київ
Інститут газу НАН України, Київ

Надійшло до редакції 25.06.2013

П. І. Гвоздяк, Е. В. Сапура, В. Ф. Коваленко, Е. С. Болгова,
В. П. Демчина

Освобождение питьевой воды от нитратов пробиотиками

*Изучали эффективность очистки питьевой воды от нитратов с помощью пробиотических бактерий *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, а также *Lactobacillus acidophilus*, *L. bifidus*, *L. bulgaricus* и *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, незначительного количества CO₂ (0,1–0,3%), иногда C₂H₄ (<1%), H₂O (2–3%) и не содержал H₂, CH₄, H₂S. Биотестирование (на дафниях, гидрах, зернах озимой пшеницы) подтвердило высокое качество и безопасность полученной в результате пробиотической денитрификации воды.*

P. I. Gvozdyak, E. V. Sapura, V. F. Kovalenko, E. S. Bolgova, V. P. Demchyna

Dismissal of potable water from nitrate by means of probiotics

*We have investigated the purification of potable water from nitrate by means of probiotic bacteria *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, as well as *Lactobacillus acidophilus*, *L. bifidus*, *L. bulgaricus*, and *Streptococcus thermophilus*, which form a part of corresponding medical preparations. It is shown that the slow (0.1 m · h⁻¹) filtration of water with contents 300–500 mg · l⁻¹ of nitrate through grains of sand and activated carbon or the chemical fiber under the pretext of carrier “VIYA” with immobilized probiotic bacteria on them led to a reduction of the nitrate concentration below 2.5 mg · l⁻¹. Ethanol (0.1 ml to each 100 mg KNO₃) was added to treated water to support the 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 contain H₂, CH₄, H₂S. The biotests showed a high quality and safety of obtained water.*