

ВЛИЯНИЕ УГЛЕКИСЛОГО ГАЗА НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* И *DIPLOCOCCUS*

И.З. Коваль, В.Н. Кисленко, В.Л. Старчевский, Л.И. Шевчук

Национальный университет "Львівська політехніка",
г. Львов, Украина

Поступила 12.09.2011

*Изучено влияние объема углекислого газа, выделенного из водного раствора, на снижение числа вегетирующих микроорганизмов в единице объема системы. При объеме выделенного газа до 0,5 дм³/дм³ наблюдается линейная зависимость числа вегетирующих микроорганизмов от объема выделенного углекислого газа. Увеличение отношения количества спор к количеству вегетирующих бактерий рода *Bacillus* приводит к значительному снижению влияния объема выделенного углекислого газа на жизнедеятельность микроорганизмов.*

Ключевые слова: давление углекислого газа, жизнеспособность бактерий, увеличение объема газа.

Введение. Обработка воды ультразвуком является одним из эффективных методов дезактивации микроорганизмов в процессах водоочистки [1 – 5]. Насыщение воды газами, в частности аргоном, гелием, кислородом, углекислым газом, под действием ультразвуковой кавитации значительно повышает скорость разрушения микробов [6 – 10]. Предыдущими исследованиями [11] показано, что углекислый газ проявляет более низкую эффективность по сравнению с вышеупомянутыми газами при дезактивации бактерий рода *Bacillus* методом ультразвуковой обработки воды с одновременным барботированием углекислого газа [12].

Поскольку основным механизмом разрушающего действия ультразвука на микроорганизмы является образование микропузырьков газа, выделяющегося из раствора, необходимо было выяснить зависимость скорости дезактивации микроорганизмов от давления газа в микропузырьках или объема микропузырьков от концентрации растворенного в воде газа.

Цель данной работы – исследование влияния объема выделившегося из раствора углекислого газа на жизнеспособность микроорганизмов рода *Bacillus* и *Diplococcus*.

© И.З. КОВАЛЬ, В.Н. КИСЛЕНКО, В.Л. СТАРЧЕВСКИЙ, Л.И. ШЕВЧУК, 2012

Методика эксперимента. Для исследований использовали микробную дисперсию на основе дистиллированной воды, в которую микробиологической петлей вносили бактерии рода *Bacillus* и *Diplococcus*. Микробы культивировали при 35°C на мясо-пептонном агаре в течение одних суток для *Bacillus* и *Diplococcus* и 1,5; 2 и 3 суток только для *Bacillus*. Для бактерий рода *Bacillus* путем микроскопирования фиксированных образцов микробных клеток, окрашенных фуксином основным, установлено, что бактерии, выращенные в течение 18 ч, практически не содержали спор. При культивировании бактерий в течение 36 ч их культура содержала 40% спор, 48 ч – 70%, а через трое суток содержание спор превышало 95%. Начальное микробное число колебалось в диапазоне от 2300 до 71300 кл/см³.

Образцы воды, содержащей микроорганизмы, вносили в цилиндрический металлический реактор (объем – 10 см³, высота – 90, диаметр (внешний) – 20, диаметр (внутренний) – 15 мм), и подавали углекислый газ до достижения необходимого давления, измеренного с точностью ±10 кПа. Затем при этом давлении их выдерживали в течение 1–10 мин для достижения насыщения воды газом, после чего давление в течение 2–5 с снижали до атмосферного. Пробы воды для анализа отбирали непосредственно после достижения атмосферного давления. При исследовании жизнеспособности микроорганизмов под действием CO₂, полученного путем смешивания растворов гидрокарбоната натрия с уксусной кислотой, готовили несколько проб смешиванием заданного объема воды с заданным объемом 5%-ного раствора NaHCO₃ и 1 см³ микробной дисперсии. Смесь выдерживали в течение 30 мин, после чего в нее приливали аликвотный объем 5%-ной уксусной кислоты таким образом, чтобы общий объем смеси оказался равным 10 см³. После полного выделения пузырьков CO₂ (~ 0,5 ч) отбирали пробы для определения микробного числа.

Микробное число находили методом глубинного посева 1 см³ пробы дисперсии на мясо-пептонный агар в чашки Петри; рН проб определяли на рН-673 с точностью до 0,2.

Результаты и их обсуждение. Исследование влияния барботирования углекислого газа через воду, содержащую бактерии рода *Bacillus*, показало, что снижение числа микроорганизмов в единице объема жидкости при пропускании CO₂ через воду (рис. 1, символы кривой 1) значительно сильнее, чем в воде, не подвергшейся действию углекислого газа (кривая 2). Изменение количества микроорганизмов во времени описывается кинетическим уравнением первого порядка (кривая 3). Константа скорости процесса, рассчитанная по тангенсу угла наклона кривой в полулогарифмических координатах, оказалась равной $(4,2 \pm 0,6) \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$. Коэффициент корреляции – 0,872, что выше критического значения 0,632 для уровня значимости, равном 0,05 [13].

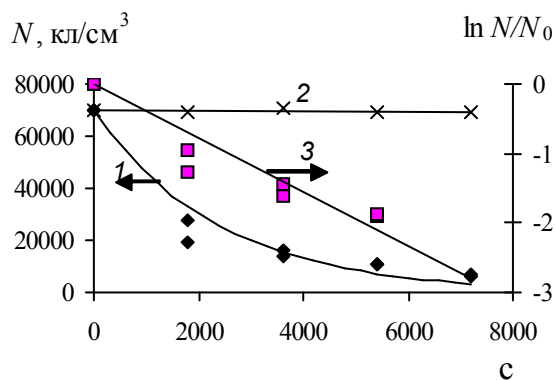


Рис. 1. Зависимость числа бактерий рода *Bacillus* в единице объема системы от времени барботирования углекислым газом воды (символы кривой 1) и без него (кривая 2); полулогарифмическая зависимость числа бактерий в единице объема от времени (кривая 3) и теоретическая кривая (1) при начальном количестве микроорганизмов в системе 70000 кл/см³ и 23°C.

Теоретическая кривая зависимости числа микроорганизмов в единице объема системы от времени (см. рис.1, кривая 1) рассчитана по уравнению первого порядка

$$N = N_0 \exp(-kt), \quad (1)$$

где N и N_0 – текущее и начальное числа микроорганизмов в единице объема системы, кл/см³; k – константа скорости процесса, с⁻¹; t – время, с.

С целью выяснения механизма влияния углекислого газа на процесс инактивации микроорганизмов в воде исследовали влияние давления углекислого газа на жизнеспособность бактерий. Как видно из табл.1, начальное число микроорганизмов в единице объема системы и продолжительность выдержки системы под давлением (200 кПа) от 1 до 10 мин практически не влияют на отношение числа микроорганизмов к их начальному числу в единице объема системы.

Повышение давления углекислого газа над водой, содержащей микроорганизмы, приводит к росту концентрации растворенного углекислого газа, снижению рН системы и дезактивации вегетирующих микроорганизмов после снижения давления в системе до атмосферного. Объем растворенного в единице объема системы CO_2 (V_p , дм³/дм³), в зависимости от его внешнего давления, рассчитывали по формуле, полученной путем экстраполяции табличных данных [14] полиномом третьего порядка:

$$V_p = (5,616 \cdot 10^{-6} P^3 - 6,594 \cdot 10^{-4} P^2 + 4,193 \cdot 10^{-2} P)22,4, \quad (2)$$

где P – внешнее давление, Па.

Таблица 1. Влияние начального числа микроорганизмов и продолжительности выдержки системы под давлением углекислого газа на отношение числа вегетирующих микроорганизмов рода Bacillus к их начальному числу при давлении CO_2 , равном 200 кПа

N_0 , кл/см ³	t , мин	N , кл/см ³	N/N_0
2300	1	550	0,24
16500	1	4600	0,28
71300	0	71800	1,0
69000	1	23500	0,34
70800	2	21900	0,31
70800	5	18500	0,26
71300	10	20700	0,29

Объем выделяющегося из жидкости газа в виде пузырьков при снижении давления рассчитывали по формуле

$$\Delta V = V_p - V_0, \quad (3)$$

где V_0 – объем CO_2 , растворенного в воздухе при нормальных условиях, дм³/дм³.

Как видно из рис. 2, увеличение объема выделившегося газа из единицы объема системы приводит к снижению количества вегетирующих бактерий в единице объема воды, причем на начальном участке наблюдается линейная зависимость этих величин:

$$N/N_0 = 1 - K \cdot \Delta V, \quad (4)$$

где K – коэффициент, учитывающий зависимость числа вегетирующих бактерий в единице объема системы от объема газа, выделившегося из единицы объема воды, 1/дм³.

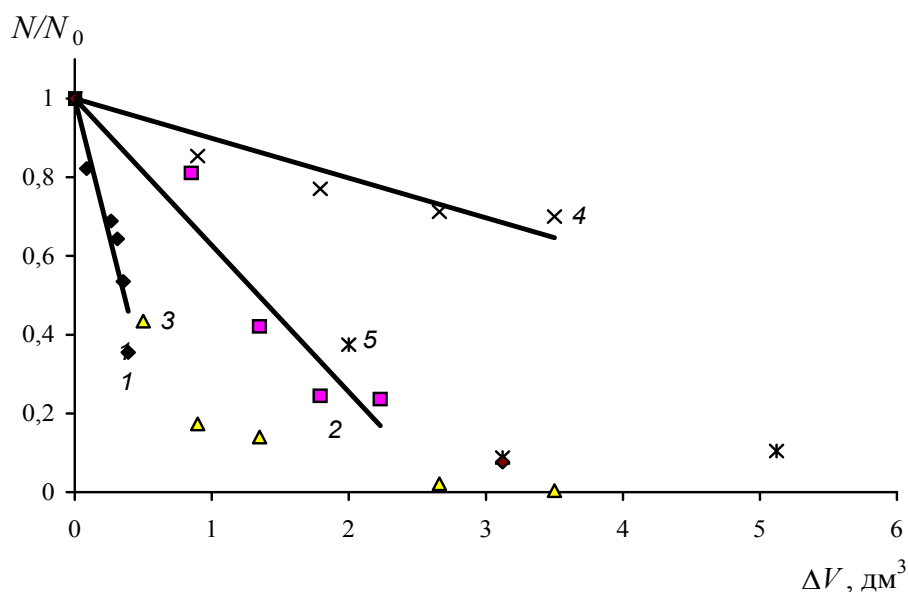


Рис. 2. Зависимость отношения количества вегетирующих микроорганизмов к начальному числу последних от объема выделившегося углекислого газа при обработке системы, содержащей бактерии рода *Diplococcus* (символы 1, 3) и *Bacillus* (содержащие 40% спор (символы 2) и 70% спор (символы 4)), гидрокарбонатом натрия и уксусной кислотой (символы 1,5), углекислым газом под давлением (символы 2 – 4).

Рассчитанные коэффициенты корреляции прямых, соответствующих уравнению (4), приведены в табл. 2.

Таблица 2. Коэффициенты корреляции прямых и коэффициенты зависимости числа вегетирующих микроорганизмов в единице объема системы от объема выделившегося углекислого газа из единицы объема раствора, содержащего микроорганизмы

Род микроорганизмов	Система получения пузырьков CO ₂	R	K, 1/дм ³
<i>Diplococcus</i>	NaHCO ₃ +CH ₃ COOH	0,908	1,36±0,25
То же	CO ₂ под давлением	0,923	1,53±0,22
<i>Bacillus</i> , 40% спор	То же	0,930	0,39±0,04
То же	NaHCO ₃ +CH ₃ COOH	0,916	0,44±0,06
<i>Bacillus</i> , 70% спор	CO ₂ под давлением	0,907	0,085±0,008

Увеличение объема углекислого газа, растворенного в системе, приводит к значительному снижению рН системы с 6,1 на воздухе до 3,4 при давлении углекислого газа над жидкостью 500 кПа. При изучении влияния рН системы на жизнеспособность микроорганизмов с целью получения CO_2 использовали систему, содержащую гидрокарбонат натрия и уксусную кислоту. Систему подбирали таким образом, чтобы конечное значение рН системы не было < 6 . При повышении концентрации гидрокарбоната натрия в растворе до 16 г/дм^3 не наблюдалось значительной дезактивации микроорганизмов в течение одного часа (рис. 3), тогда как добавление уксусной кислоты в систему и выделение пузырьков углекислого газа способствовало значительному снижению числа вегетирующих микроорганизмов в единице объема системы. При повышении начальной концентрации гидрокарбоната натрия и уксусной кислоты заметно снижалось число вегетирующих бактерий (см. рис. 3, кривая 2).

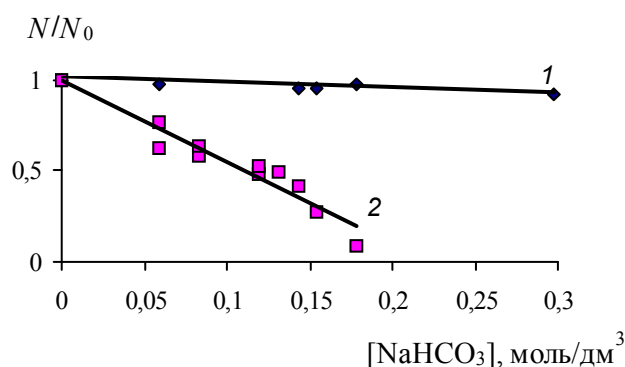


Рис. 3. Изменение отношения числа вегетирующих бактерий рода *Diplococcus* к начальному числу микроорганизмов в единице объема системы при изменении концентрации гидрокарбоната натрия (1) и выделении углекислого газа в результате взаимодействия NaHCO_3 с уксусной кислотой (2). Начальное количество микроорганизмов в системе – 64000 кл/см^3 ; значение рН системы изменялось в диапазоне $6,3 \div 7,8$.

Полученные данные (см. рис. 2) показывают, что независимо от способа получения пузырьков углекислого газа кривые дезактивации микроорганизмов рода *Diplococcus* (символы 1 и 3) и *Bacillus* (символы 2 и 5) совпадают между собой в пределах ошибки эксперимента. Рассчитанные коэффициенты дезактивации микробов при увеличении объема углекислого газа, выделенного из единицы объема системы, также достаточно близки (см. табл. 2).

Следует отметить, что для микроорганизмов рода *Bacillus* влияние объема выделенного газа на их дезактивацию зависит от стадии развития микроорганизмов. На ранней стадии развития, когда микроорганизмы почти не содержат спор, их дезактивация протекает почти полностью уже при давлении углекислого газа над системой 50 кПа. При содержании спор в бактериальной культуре более 95% углекислый газ почти не влияет на жизнеспособность микроорганизмов, даже при его давлении 500 кПа. Аналогичные данные наблюдаются и при получении CO_2 системой гидрокарбонат натрия – уксусная кислота. Повышение содержания спор в культуре микроорганизмов приводит к снижению зависимости их жизнеспособности от объема выделившегося из системы углекислого газа (см. рис.2, символы 2 и 4). Последнее, очевидно, свидетельствует о незначительном влиянии углекислого газа на жизнеспособность спор микроорганизмов.

Выводы. Таким образом, выделение пузырьков углекислого газа из раствора в системе, содержащей вегетирующие микроорганизмы, приводит к механическому разрушению бактерий или их инактивации и практически не влияет на жизнеспособность спор микроорганизмов.

Резюме. Збільшення об'єму вуглекислого газу, виділеного з водного розчину, приводить до зменшення числа вегетативних мікроорганізмів в одиниці об'єму системи. При об'ємі виділеного газу до $0,5 \text{ dm}^3/\text{dm}^3$ розчину спостерігається лінійна залежність числа вегетативних мікроорганізмів від об'єму виділеного вуглекислого газу. Збільшення відношення кількості спор до кількості вегетативних бактерій роду *Bacillus* приводить до значного зменшення впливу об'єму виділеного вуглекислого газу на життєдіяльність мікроорганізмів.

I.Z. Koval, V.M. Kislenko, V.L. Starchevskyy, L.I. Shevchuk

EFFECT OF CARBON DIOXIDE ON THE VIABILITY OF BACILLUS AND DIPLOCOCCUS BACTERIA TYPES

Summary

Increasing the volume of carbon dioxide, separated from the aqueous solution, resulting in fewer vegetative microorganisms per unit volume of the system. At the volume of the selected gas to $0.5 \text{ dm}^3/\text{dm}^3$ of solution has been observed linear dependence of the vegetative microorganisms number on the selected carbon dioxide amount. Increasing the ratio of spores to the number

of vegetative *Bacillus* bacteria type leads to the significant reduction impact of volume of the selected carbon dioxide on the microorganisms viability.

Список литературы

- [1] *Dehghani M.H., Mahvi A.H., Jahed G.R., Sheikhi R.* // J. Zhejiang. Univ. Sci. – 2007. – 7, N8. – P. 493 – 497.
- [2] *Mason T.J., Joyce E., Phull S.S., Lorimer J.P.* // Ultrason. Sonochem. – 2003. – 6, N10. – P. 319 – 323.
- [3] *Zhang G., Zhang P., Wang Bo, Liu H.* // Ibid. – 2006. – 13, N5. – P. 446 – 450.
- [4] *Stamper D.M., Holm E.R., Brizzolara R.A.* // J. Environ. Eng. Sci. – 2008. – 2, N7. – P. 139 – 146.
- [5] *Phull S.S., Newman A.P., Lorimer J.P. et al.* // Ultrason. Sonochem. – 1997. – 2, N4. – P. 157 – 164.
- [6] *Коваль І.З., Шевчук Л.І., Старчевський В.Л.* // Матеріали II Міжнарод. конф. молодих вчених "Geodesy, architecture & construction " (GAC – 2009) (Львів, 14 – 16 травня 2009). – Львів, 2009. – С. 69 – 70.
- [7] *Коваль І.З., Шевчук Л.І., Старчевський В.Л.* // Вопросы химии и хим. технологии. – 2009. – №6. – С. 133 – 135.
- [8] *Старчевский В.Л., Кисленко В.М., Максимив Н.Л., Коваль І.З.* // Химия и технология воды. – 2009. – 31, №4. – С. 469 – 477.
- [9] *Koval I., Shevchuk L., Starchevskyy V.* // Chem. Eng. Transact. – 2011. – 24, N3. – P. 1315 – 1320.
- [10] *Koval I.Z., Starchevskyy V.L., Shevchuk L.I.* // 12th Meeting of the Eur. Soc. of Sonochem. (Greece, Crete, 30 May – 03 June, 2010). – Crete, 2010. – P. 106.
- [11] *Starchevskyy V., Koval I., Shevchuk L., Maksymiv N., Nykulyshyn I.* // 11th Meeting of the Eur. Soc. of Sonochem. (France, La Grande-Motte, 1 – 5 June, 2008). – La Grande-Motte, 2008. – P. 159 – 160.
- [12] *Шевчук Л.І., Коваль І.З.* // Вісн. НУ "Львівська політехніка". – 2007. – №590. – С. 291 – 295.
- [13] *Справочник химика / Под ред. Б.П. Никольского и др.* – М.; Л.: Химия, 1965. – 1004 с.
- [14] *Фишер Р.А.* Статистические методы для исследователей. – М.: Гос. стат. изд-во, 1958. – 278 с.