

УДК 574

МИКРОКОЛОНИИ БАКТЕРИЙ В БИОЭСТИМАЦИИ — БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКЕ ПРОЦЕССА ОЧИСТКИ ВОДЫ

О.Г. Никитина, Г.А. Семенова, В.Н. Максимов, Н.Е. Никитин

(ПУ "Зеленоградводоканал", Ин-т теоретической и экспериментальной биофизики РАН г. Пущино, кафедра общей экологии биологического факультета МГУ, ПУ Мосочиствод)

До последнего времени основное внимание при контроле водных объектов уделялось качеству воды в них. Но качество — это результат длительного процесса очищения загрязненной природной воды. Важно вмешаться в процесс на стадии формирования качества, не допустить его снижения, а для этого нужно иметь возможность контролировать этот процесс. При разработке нового метода контроля процесса биологической очистки и самоочищения воды — биоэстимации (от лат. aestimatio — оценка) мы столкнулись со многими трудностями, в частности с тем, что биоэстиматоры — биологические показатели изменения процесса — отличаются от биоиндикаторов — показателей качества прежде всего тем, что биоиндикаторы — это количественные показатели, т.е. отображают количество определенных загрязнений, а биоэстиматоры — функциональные показатели, т.е. отображают влияние основных факторов, нарушающих процесс самоочищения. В частности, биоиндикаторы — это виды, а биоэстиматоры — это экологические группы, в которые входят различные по систематическому положению организмы со сходной реакцией на изменения среды. Так, одним из биоэстиматоров является экологическая группа, в которую входят различные бентосные раковинные амёбы и похожие на них образования, которые мы сначала считали также раковинными амёбами, но не могли идентифицировать, так как их размеры — 2—8 мкм — находятся за пределами размеров известных раковинных амёб.

Подсчитывая эти структуры на протяжении более 25 лет, мы установили, что вспышки их численности наблюдались в тех же случаях, что и вспышки численности бентосных раковинных амёб, а именно при нарушении процесса очистки воды за счет перегрузки деструкторов трудноокисляемыми органическими веществами, например водным гумусом. Поэтому мы широко использовали их в контроле процесса очистки сточных вод и процесса самоочищения воды в различных водоемах вместе с раковинными амёбами без идентификации. Тем более что и те, и другие имеют ярко окрашенную раковинку (или капсулу), хорошо различаются и подсчитываются даже при малом увеличении микроскопа, что делает их удобной группой для оценки процесса. Биоэстимация позволяет устано-

вить: нормально протекает процесс самоочищения воды или он нарушен, по какой причине нарушен, какие следует предпринять восстановительные меры. В системе биоэстимации всего десять показательных групп-биоэстиматоров; описываемые ярко окрашенные структуры вместе с бентосными раковинными амёбами представляют собой шестой биоэстиматор (Никитина и др., 1987; Никитина, 2004). Для усовершенствования этого метода требуется идентификация организмов, входящих в состав биоэстиматоров.

Методика

В качестве материала для исследования использовали пробы природной и сточной воды, а также активного ила. Подсчет проводили по собственной методике (Никитина, Свешников, 1976). Выделить в культуру интересующие нас организмы не удалось, однако обогащенную ими пробу можно получить путем фильтрования воды через мембранные фильтры. Соскоб с фильтра исследовали с помощью светового микроскопа по общепринятой методике. Для изучения в электронном микроскопе соскоб фиксировали 2,5%-м глутаровым альдегидом на фосфатном буфере (рН 7,4) в течение 2 ч с постфиксацией в 1%-м растворе тетраоксида осмия, обезвоживали, заливали в эпоксидную смолу, затем делали срезы, которые контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по общепринятой методике, и просматривали препараты в электронном микроскопе Jem-100 В.

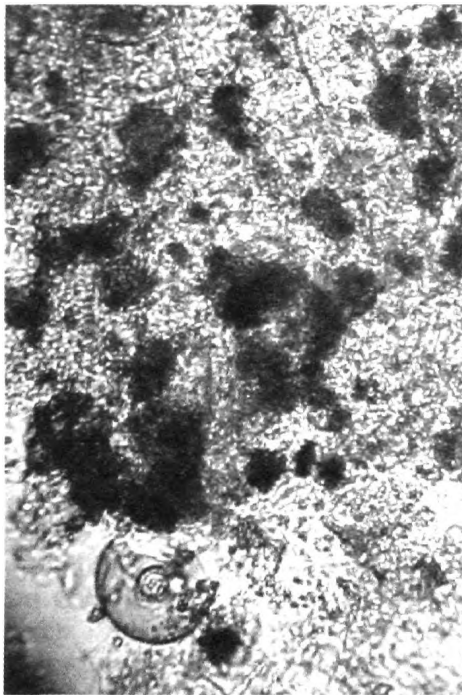
Описание микроколоний

При изучении с помощью светового микроскопа проб воды из различных водных объектов, таких как биологические очистные сооружения, каналы, реки, озера, участки морей, а также водных вытяжек из отходов производства, почвы, песка встречаются мелкие округлые или слегка угловатые структуры. Мы безуспешно обращались ко многим гидробиологам с просьбой идентифицировать эти организмы. Несмотря на то что они встречаются повсеместно, а следовательно, играют существенную роль в функционировании акваэкосистем, тем не менее большинству гидробиологов они незнако-

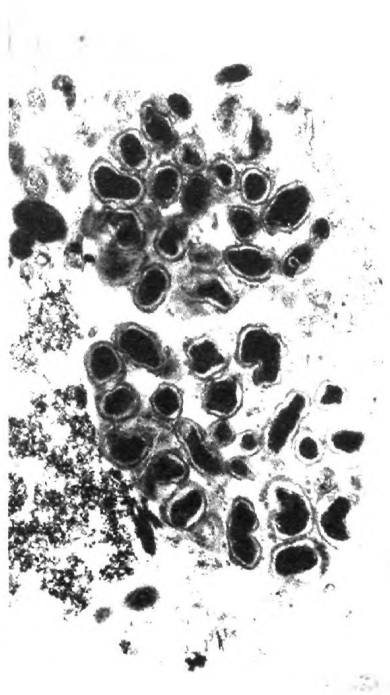
мы, что послужило дополнительным стимулом для их изучения.

Эти структуры, окрашенные в различные тона цвета ржавчины, при содержании в воде большого количества растворенного кислорода имеют светлые оттенки, при отсутствии кислорода — темные, черные, что наводит на мысль о том, что их наружный слой пропитан железом, в различной степени окисленным или восстановленным. Обычно мы их подсчитывали при увеличении в 200–250 раз.

а



б



в

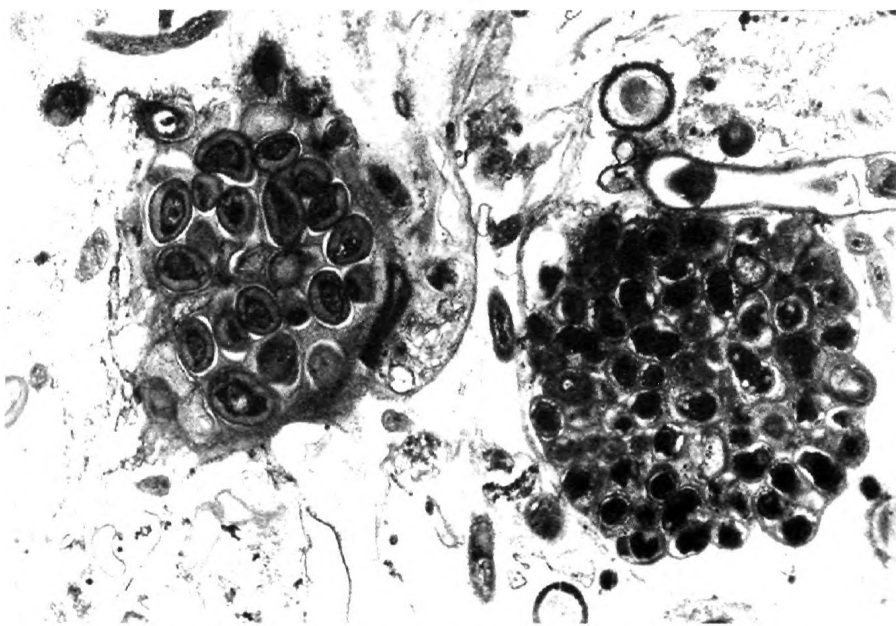


Рис. 1. Микроколонины в активном иле.

а — “Сидеротеки”, видимые в световой микроскоп; здесь — отдельные, разделившиеся и агрегированные микроколонины (200×). Морфотипы при таком увеличении различить невозможно. Внизу видна типичная раковинная амeba *Arcella*. б — Ультратонкий срез только что разделившейся микроколонины второго морфотипа, внутри половинок которой не прекращается деление бактериальных клеток (18 000×). в — Ультратонкие срезы двух микроколонины; здесь — явно два разных морфотипа бактерий (9000×)

На рис. 1, а они изображены в виде серых и черных глыбок, а в цвете — они, как сказано выше, имеют яркое ржавое окрашивание. Внизу справа видна типичная раковинная амeba — *Arcella*.

Снаружи описываемые структуры имеют заметную скульптуру, как бы выпячивания и впадины. Это можно объяснить тем, что капсульное вещество обтекает неравномерно уплотненные глыбки бактерий, повторяя форму поверхности микроколонины. При быстром вращении микровинта можно увидеть просвет в покрове микроколонины, похожий на устье. Часто встречаются структуры, обращенные “устьями” друг к другу, как бы только что разделившиеся, причем одна из них сильно ожелезнена, другая — более прозрачна. Процесс разделения этих структур мы не наблюдали, но не исключаем его. На рис. 1, б показан срез, по-видимому, только что разделившейся структуры. Возможно, часть бактерий, находящихся внутри, выскальзывает через “устье” наружу вместе с частью матрикса, не разрушая материнского ожелезненного покрова. Затем и они пропитываются оксидами железа, создавая более надежную защиту для бактерий, наполняющих их, по аналогии с раковинкой, защищающей тело раковинной амобы. При резко подвижной водной среде разделившиеся структуры не расходятся, а остаются рядом. В одном агрегате мы наблюдали часто от 2 до 8, реже — до нескольких десятков таких структур. Агрегация особенно характерна для активного ила аэротенков, где производится интенсивное перемешивание среды техническими средствами. Здесь четко видны агрегаты, обнаруживаемые по яркой окраске, погруженные в бесцветные, характерные для активного ила бактериальные флоккулы, что делает защиту бактерий в микроколонины от неблагоприятных факторов среды более надежной.

При изучении ультратонких срезов описываемых структур с помощью электронного микроскопа видно, что микроколонины бактерий погружены в общий фибриллярный матрикс, причем его наружный слой неравномерно утолщен. Многие бактерии застигнуты фиксацией в процессе деления с четко различимыми генофорами (рис. 2, а). Бактерии внутри этих структур имеют клеточную стенку, характерную для грамотрицательных

бактерий. Иногда отчетливо различимы концентрически расположенные внутрицитоплазматические мембраны, примыкающие к клеточной стенке, и срез клетки имеет вид спила дерева с годовыми кольцами различной толщины (рис. 2, в).

На рис. 1, в — два различных морфотипа, видимых в одном поле зрения. У первого морфотипа различим тонкофибриллярный слизистый матрикс, в который погружены клетки. Он непосредственно переходит в слой, окружающий колонию. Наружный слой матрикса имеет неравномерную толщину: от 0,1 до 2 мкм и состоит из того же материала, что и общий матрикс. Этот слой хорошо обозначен благодаря электронно-плотным мелкодисперсным включениям по периферии, которые, возможно, и есть оксиды железа. Размеры первого морфотипа описываемых структур колеблются от 5 до 8 мкм, а бактерии внутри них имеют две размерные категории: 0,6–0,8 и 1–1,2 мкм. Число клеток, видимых на срезе микроколонию, варьирует от нескольких единиц до нескольких десятков.

Микроколония второго морфотипа хорошо видна на рис. 3. Можно отметить, что матрикс, в который погружены клетки, более электронно-плотный, чем у первого морфотипа. Размеры микроколонии составляют 3–6 мкм, и клетки внутри них мельче, чем у первого морфотипа: 0,4–0,6 мкм. Число бактерий внутри микроколонии второго морфотипа, видимых на срезе, достигает 60 штук (рис. 3, а). Цитоплазма и нуклеоид имеют очень высокую электронную плотность, выше, чем у первого морфотипа, и плохо различимы между собой. Многочисленные цепочки везикул, заполненные электронно-плотным веществом, наблюдаются в околоклеточном пространстве. Матрикс, в который погружены бактерии, и его наружный слой, покрывающий колонию, непрерывно переходят друг в друга и имеют идентичную структуру. Можно предположить, что химический состав и матрикса, и содержимого внеклеточных везикул, сходен (рис. 3, в). Возможно, именно для этого морфотипа характерно размножение путем разделения микроколонии на фрагменты (рис. 1, б).

Иногда часть наружного слоя фибриллярного матрикса, покрыва-

ющего микроколонию, разрушается, и в “пролом” выходит наружу масса бактерий (рис. 2, б). По-видимому, постоянно делящимся бактериям становится тесно внутри покрова, потерявшего эластичность из-за сильного ожелезнения. Можно предположить, что каждая бактерия, оказавшись за пределами материнской микроколонии, делится, образуя новую микроколонию, и процесс повторяется. Возможно, такой тип размножения более характерен для первого морфотипа из описываемых структур.

Как и описываемые микроколонии бактерий, представители одноклеточных животных — раковинные амёбы, в большом количестве встречающиеся

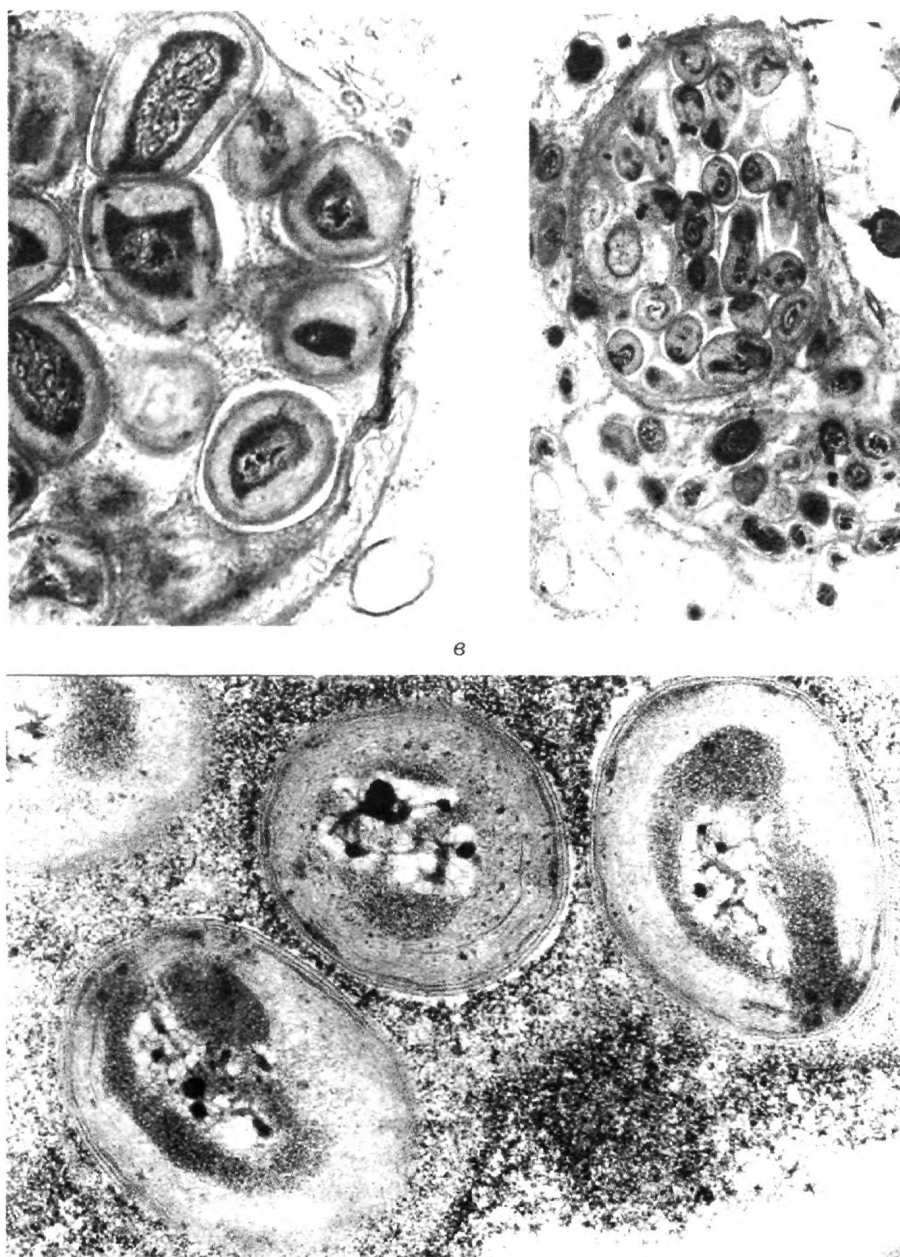


Рис. 2. “Сидеротски” первого морфотипа.

а — Ультраструктура фрагмента микроколонии первого морфотипа с делящимися бактериями. (60 000 ×). б — Ультратонкий срез микроколонии первого морфотипа с разрушенным наружным слоем матрикса и выходящими наружу бактериями (18 000 ×). в — Ультраструктура бактерий первого морфотипа с концентрически расположенными цитоплазматическими мембранами (60 000 ×)

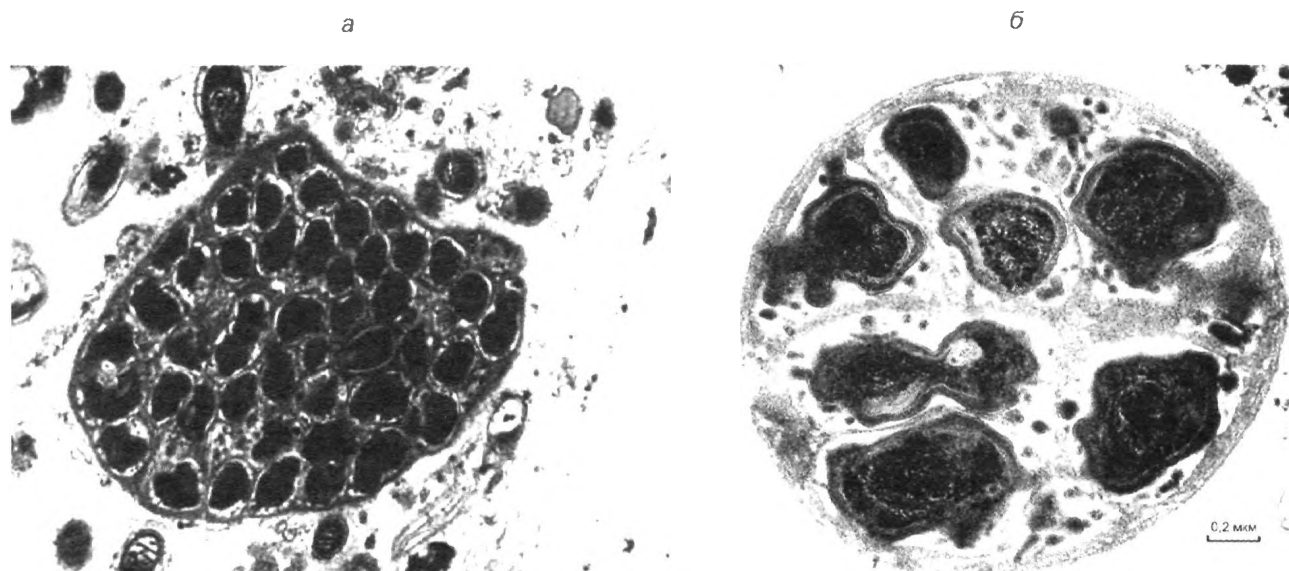


Рис. 3. “Сидеротеки” второго морфотипа.

а — Ультратонкий срез микроколонии второго морфотипа с многочисленными бактериями, позволяющими предположить, что в целой микроколонии их сотни (18 000 ×). *б* — Ультратонкий срез уголка микроколонии второго морфотипа с немногими бактериями. Четко видны цепочки везикул в околоклеточном пространстве и матрикс, непрерывно переходящий в слой, покрывающий колонию. Бактерии неправильной формы (60 000 ×)

при перегрузке деструкторов трудноокисляемыми органическими веществами, также имеют цвет ржавчины, и чем больше в воде кислорода, тем ярче окраска раковинок, чем меньше — тем она темнее. Электронограммы срезов раковинных амёб показывают, что и они заполнены бактериями, но каждая — в отдельной пищеварительной вакуоли, причем на разных стадиях переваривания (Никитина и др., 1981). Отличие в том, что внутри изучаемых нами структур — бактерии с признаками активной жизни, но это отличие обнаруживается только с помощью электронного микроскопа. Под световым микроскопом сходство этих структур с раковинными амёбами разительное. Это морфологическое подобие и сходная реакция на трудноокисляемые органические вещества позволили нам объединить столь различные по систематическому положению группы в один биологический показатель нарушения самоочищения воды (Никитина, 2004).

Идентификация

Согласно определителю бактерий Берджи (1997), описываемые микроколонии бактерий могут быть отнесены к 12-й группе “Аэробные хемолитотрофные бактерии и родственные организмы”, ко 2-й подгруппе “Железо- и марганцеокисляющие и/или осаждающие бактерии”: “Клетки разнообразной морфологии, большей частью в характерных агрегатах, образующих легко распознаваемые, окрашенные оксидами железа или марганца структуры”. Также отмечается, что в культуре эти бактерии не получены. Нам тоже не удалось их выделить в культуру. По ключу идентификации устанавливаем, что они относятся к семейству *Siderocapsaceae*: “Клетки существенно варьируют по морфологии и капсулиро-

ванию; аэробы и микроаэрофилы, органотрофы, планктеры и осаждающиеся на погруженные в воду предметы под микроскопом имеют вид окрашенных скоплений, от желтых до темно-коричневых или цвета ржавчины”. Их можно отнести к роду *Siderocapsa*: “От одной до нескольких сферических или овальных клеток окружены общей капсулой, пропитанной на поверхности оксидами железа и марганца”. Все эти морфологические особенности вполне соответствуют описываемым структурам. В определителе для дифференциации предложены 10 видов этого рода. Первый из морфотипов подходит под описание вида *Siderocapsa eusphaera*: диаметр клеток — 1–2 мкм, количество клеток в микроколонии — до 60. Другое предлагаемое здесь для этого вида название: *Arthrobacter siderocapsulatus*.

Описанный нами первый морфотип имеет сходство с метанотрофами, особенно если судить по их концентрически расположенным цитоплазматическим мембранам; поэтому можно предположить, что это — представитель рода *Methilocystis* (Гальченко, 2001). В то же время эти структуры подходят и под описание цианобактерий рода *Gleocapsa* (Определитель..., 1953). Но однозначно определить эти роды или виды без выделения в чистую культуру и проведения нуклеотидного анализа нельзя.

Второй морфотип описываемых нами структур не подходит ни под одно из описаний ключа. Так, даже на срезе капсул этого морфотипа мы видим около 60 бактерий, а внутри капсул они могут содержаться сотнями; в ключе оговорено, что клеток внутри микроколонии — не более 60. Именно богатое наполнение капсул бактериями у описываемого нами второго морфотипа мы считаем его главной особенностью. Другая особенность — бактериальные клетки этого морфотипа нельзя отнес-

ти ни к коккам, ни к палочкам, ни к овоидам, отмеченным в ключе. Они неправильной формы и на срезе имеют неровные очертания с выпуклостями и впадинками (рис. 3). Его можно было бы описать как новый вид, но, несмотря на то что Определитель бактерий Берджи был опубликован в 1997 г. и является переводом английского издания 1994 г., уже принято считать, что род *Siderocapsa* ошибочно объединяет различные по систематическому положению микроорганизмы. В соответствии с новым изданием Берджи (2001—2003) отнесение бактерий к той или иной систематической группе и тем более к определенному виду можно производить только с использованием белково-нуклеотидного анализа (Bergey's, 2003), но это осложняется тем, что данные организмы в культуру не выделяются.

Как было сказано выше, оба эти морфотипа бактерий входят в один (шестой) биоэстиматор — показатель нарушения процесса очищения воды, вызванного перегрузкой деструкторов трудноокисляемыми органическими веществами. Для целей диагностики и восстановления нормального хода очистки воды достаточно распознавать и подсчитывать соответствующие биологические показатели без точной идентификации входящих в них микроорганизмов, однако при этом необходимо их как-то именовать.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гальченко В.Ф. 2001. Метанотрофные бактерии. М. 500 с.
- Никитина О.Г., Догадаева О.С., Носов В.Н., Максимов В.Н. Способ контроля процесса очистки сточных вод с активным илом. АС № 1343746. М. 1987.
- Никитина О.Г. 2004. Оценка процесса самоочищения воды // Биотехнология охраны окружающей среды. М. С. 132.
- Никитина О.Г., Свешников В.Н. 1976. К методике подсчета микроорганизмов активного ила // Жилищное и коммунальное хозяйство. № 8. М. С. 35.
- Характерный, легко распознаваемый яркий внешний облик описываемых структур хорошо согласуется с наименованием рода "сидерокапса" (лат. *sidereus* — солнечный, блестящий + лат. *capsa* — ящик, ларчик). Но судя по неоднозначному определению их даже группой ученых Берджи (что обусловлено, как было сказано выше, прежде всего невозможностью проведения нуклеотидного анализа вследствие невыделения этих биологических структур в культуру), это — не систематическая, а экологическая группа. Поэтому нельзя использовать родовое название "сидерокапса". Вместо него мы предлагаем использовать сходный, созвучный термин: "сидеротека" (греч. *theca* — футляр, ящик, шкатулка).
- Таким образом, удалось описать и адекватно назвать повсеместно распространенные, но малоизученные биологические структуры, к тому же представляющие собой важный показатель в системе биологической оценки процесса очищения воды — биоэстимации.
- Свою искреннюю благодарность авторы выражают специалистам-микробиологам, оказавшим помощь и поддержку при подготовке данной статьи и сделавшим ценные замечания по ее тексту: В.Ф. Гальченко, Г.А. Дубининой, В.М. Горленко, Э.С. Никитиной и Д.И. Никитину.
- Никитина О.Г., Семенова Г.А., Чибисова О.И. 1981. Новый вид раковинной амебы и его использование в биоиндикации процесса очистки сточных вод // Биологические науки. № 5. 28—32.
- Определитель бактерий Берджи. Т. 2. 1997. М. С. 437—464.
- Определитель пресноводных водорослей СССР. Синезеленые водоросли. 1953. М. 651 с.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Edition. 2001—2003. / Ed. G. M. Garrity. New York.

Поступила в редакцию
9.11.05

MICROCOLONIES OF BACTERIA IN BIOESTIMATION — THE BIOLOGICAL ESTIMATION OF THE WATER TREATMENT PROCESS

O.G. Nikitina, G.A. Semenova, V.N. Maximov, N.E. Nikitin

Microcolonies of bacteria living in a common fibrous matrix and dyes rust color with precipitating iron oxides are described. They are isomorphous (identical at sight) but represent different systematic groups. These microcolonies live both in fresh water and also present in soil moisture and activated sludge in airtanks. Their populations becomes exceedingly large, when biological transformation of organic substances due to the saturation of water with poorly oxidizing substances like soluble humus fractions, becomes disordered.

Data on the dynamic of the population of the microcolonies is used in new hydrobiological control processes of wastewater treatment and self-purification natural water — bioestimate. For distinguishing the microcolony the term siderotheca is suggest.