

# Formation of Actinobacteria biofilms during groundwater treatment



Litvinenko Z.N.\* , Kondratyeva L.M.

Institute of the Water and Ecology Problems, Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences, Khabarovsk Federal Research Center, Dikopoltsev Str., 56, Khabarovsk, 680000, Russia

**ABSTRACT.** The paper presents the results of a study of the reasons for the formation of biofilms during the purification of groundwater with use of natural sorbents. Analysis of the microbial complexes structure at different stages of water treatment showed that their numbers increased after filtration through a load with granular activated carbon. In some cases, it remained high in storage tanks containing purified water. In fact, at all stages of water treatment, representatives of *Actinobacteria* were found in the community structure, which formed biofilms in the technical system, as well as after 14 days of storage in bottled water. It was established that representatives of actinomycetes in the planktonic state formed flakes from mycelium, and on filter media they formed biofilms in the form of a complex structured community. *Actinobacteria* strains isolated from water and activated carbon biofilms differed in their cultural and morphological characteristics. However, they were characterized by a common ability to produce polymeric substances that formed a protective matrix and promoted cell adhesion to various substrates and surfaces. Scanning electron microscopy shown that sporulation promoted survival during all stages of groundwater treatment, including chlorination and ozonation.

**Keywords:** biofilms, *Actinobacteria*, mycelium, groundwater, water treatment

**For citation:** Litvinenko Z.N., Kondratyeva L.M. Formation of Actinobacteria biofilms during groundwater treatment // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 986-991. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-986

## 1. Introduction

In connection with anthropogenic pollution of natural waters, the issues of providing the population with high-quality drinking water by improving water treatment methods are especially pressing (Liu et al., 2017). However, sometimes the quality of water can deteriorate as it passes through a water treatment system or water distribution system. The main attention is paid to the formation of biofilms in distribution system pipes (Makris et al., 2014; Van der Wielen and Lut, 2016). Accumulated experience indicates that changes in the quality of water supplied to the population can cause physicochemical and microbiological problems, example – destruction of the pipe material (corrosion), the formation of biofilms and loose deposits in the distribution system (Liu et al., 2017). It is known that only 10% of the dry mass of biofilms is represented by microorganism cells, and more than 90% is the share of the polymer matrix (Flemming and Wingender, 2010), which plays the role of an accumulator of organic and mineral substances (Wang et al., 2012) and ensures the

stability of microbial community, increasing its adaptive potential (Oppenheimer-Shaanan et al., 2016).

Recently particular attention has been paid to the biostability of drinking groundwater. The term “biological stability” in this context refers to the concept of maintaining the microbiological quality of water from the moment of production of drinking water to the consumption (Favere, 2023). The issue of groundwater safety is a priority and, as a rule, depends on many natural and anthropogenic factors (Muhisen et al., 2019). Changes in microbiological parameters in the water treatment system can have a negative impact on the quality of drinking water and the health of consumers (Prest et al., 2016).

In this regard, studies of changes in the main microbiological characteristics of water at different stages of groundwater purification are relevant. The purpose of our work was to identify risk factors for the development of biofilms in the groundwater treatment system and the reasons for the formation of *Actinobacteria* mycelium aggregates in drinking water.

\*Corresponding author.

E-mail address: [zoyana2003@mail.ru](mailto:zoyana2003@mail.ru) (Z.N. Litvinenko)

**Received:** May 06, 2024; **Accepted:** May 27, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



## 2. Materials and methods

The objects of the study were microbial communities (MC) of natural groundwater and water purified with sorbents; biofilms and mycelium formed at various stages of water treatment in the technology line and in bottled water. Groundwater samples were taken from a production well (depth 45 m), which is actively used for pumping groundwater, its further water treatment and sale of drinking water in retail chains in bottled form. The well is located on the territory of the Tunguska groundwater field, which belongs to the Middle Amur Artesian Basin, in the area of the Sredneamurskaya Lowland.

Methods generally accepted in microbiology were used in the work: cultivation of microorganisms on agar and liquid nutrient media; isolation of microorganism strains and determination of their activity; experimental modeling with granular activated carbon (GAC). The content of organic substances in water was determined by the spectrophotometric method (SHIMADZU UV-3600) at different wavelengths (Shirshova et al., 2015). Biofilms were studied with use of scanning electron microscopy (SEM) (VEGA 3 LMH TESCAN, Czech Republic) at the Khabarovsk Innovation and Analytical Center for Collective Use at the Institute of Tectonics and Geophysics, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences.

## 3. Results and discussion

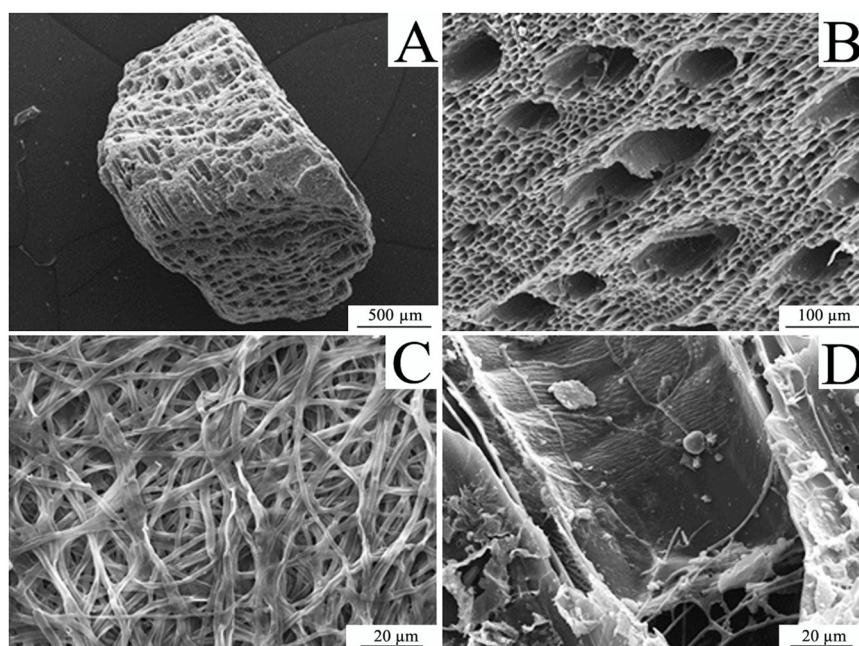
All types of groundwater contain structurally diverse classes of organic compounds (hydrocarbons, carboxylic acids, alcohols, aldehydes, ketones, amines), as well as humic substances. All these components are involved in complex biogeochemical processes and can act as risk factors, activating the development of complex microbial consortium in treated water in the form

of equipment fouling, biofilms and mycelial aggregates in bottled water. Research on changes in planktonic and biofilm communities, as well as the key factors influencing their behavior, is important for understanding and managing microbiological water quality (Ren et al., 2024).

As a result of studying the structure of groundwater microbial complexes at different stages of water treatment, a significant contribution of microorganisms producing mucous polymer substances was established. Large spores were regularly present; it germinated and formed mycelium in the form of loose, visually distinguishable aggregates when various carbon sources were added *in vitro*.

Studies of biofilms formed on GAC have shown that they are represented by complex microorganisms that are capable of producing polymer compounds and forming aggregates of mycelium. When glucose was added to the culture medium, the MC structure was dominated by bacterial cells synthesizing mucous capsules. SEM studies of the GAC surface showed high porosity of the particles; some retained fragments of the plant framework (Fig. A, B). Microorganisms in the attached state on GAC formed a mycelial rete (Fig. D). Biofilms which were founded in bottled water in immature state were represented by an accumulation of thin mycelium (Fig. B). According to cultural and morphological studies of mycelium formed on activated carbon *in vitro* and in bottled water, including at the sporulation stage, this group of chemoheterotrophic microorganisms was classified as representatives of the phylum *Actinobacteria* (class *Actinobacteria*).

It has been established that under favorable growth conditions, actinobacteria can release products of their metabolism that affect the taste and smell of water. They have one of the most complex cellular structures among microorganisms and are capable of forming filamentous mycelium. *Actinobacteria* often



**Fig.** Microstructure of granular activated carbon and *Actinobacteria* biofilm: A – GAC x 95; B – GAC x 500; C – young mycelium in bottled water, 14 days after purification (x 2000); D – surface of activated carbon *in vitro* with mycelium of actinobacteria (x 2000).

become a problem for water treatment plants, as mycelial fragments and spores enter water supplies, take root in technological systems and affect the organoleptic characteristics of water (Barka et al., 2016).

We noted that in the presence of humic substances (HS) and a lack of easy available carbon sources, the process of sporulation accelerates, and various bacterial forms develop on the collapsing mycelium. Some of them are characterized by sliding growth, which is accompanied by the formation of dendrite-like structures. Their biomass is represented by small oval cells immersed in a mucous matrix. SEM images also revealed microcolonies consisting of clusters of cells encrusted with oxides of various elements, including those normative values in drinking water. It is known that HS, by controlling environmental conditions, change the structure of MC and stimulate the processes of decomposition of organic substances (OS) and reduce the bioavailability of some metals (Kulikova and Perminova, 2021).

#### 4. Conclusions

As a result of studying the structure of microbial communities at different stages of water treatment, biofilms formed in an experiment on granular activated carbon in the presence of different carbon sources, the main risk factor for reducing the quality of purified water was established. Despite the use of various sorbents and disinfection methods (chlorination and ozonation), representatives of *Actinobacteria* included in biofilms retained their viability in tanks with clean water and influenced the organoleptic characteristics of bottled water. A hypothesis has been put forward about the negative role of activated carbon, which acts as an accumulator of organic substances, as well as a site of adhesion of *Actinobacteria* spores and bacterial cells that synthesize a polymer matrix. To prevent a decrease in the quality of treated water, it is necessary to control the regulations for the regeneration of sorbents or their replacement.

#### Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest.

#### References

- Barka E. A., Vatsa P., Sanchez L. et al. 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and molecular biology reviews* 80 (1): 1–43. DOI: [10.1128/mmlbr.00019-15](https://doi.org/10.1128/mmlbr.00019-15)
- Favere J. 2023. Biostability of drinking water systems: from online monitoring to microbial quality management. Ghent University. Faculty of Bioscience Engineering: 219. URL: <http://hdl.handle.net/1854/LU-01GVJKHN3DVVY9P68JARE18B5S>
- Flemming H.-C., Wingender J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8 (9): 623–633.
- Kulikova N.A., Perminova I.V. 2021. Interactions between humic substances and microorganisms and their implications for nature-like bioremediation technologies. *Molecules* 26: e 2706. DOI: [10.3390/molecules26092706](https://doi.org/10.3390/molecules26092706)
- Liu G., Zhang Y., Knibbe W.J. et al. 2017. Potential impacts of changing supply-water quality on drinking water distribution: A review. *Water Research* 116: 135–148
- Makris K.C., Andra S.S., Botsaris G. 2014. Pipe scales and biofilms in drinking-water distribution systems: undermining finished water quality. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 44 (13): 1477–1523.
- Muhisen M. AL, Gokcekus H., Ozsahin D.U. 2019. The most common factors effecting ground water quality. *International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering* 8 (3): C2586018319 URL: [www.ijitee.org](http://www.ijitee.org)
- Oppenheimer-Shaanan Y., Sibony-Nevo O., Bloom-Ackermann Z. et al. 2016. Spatio-temporal assembly of functional mineral scaffolds within microbial biofilms. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2: e 15031. DOI: [10.1038/npjbiofilms.2015.31](https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2015.31)
- Prest E.I., Hammes F., van Loosdrecht M. et al. 2016. Biological Stability of drinking water: controlling factors, methods, and challenges. *Frontiers in Microbiology* 7: 45. DOI: [10.3389/fmicb.2016.00045](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00045)
- Ren A., Yao M., Fang J. et al. 2024. Bacterial communities of planktonic bacteria and mature biofilm in service lines and premise plumbing of a megacity: composition, diversity, and influencing factors. *Environment International* 185 (3): e 108538 DOI: [10.1016/j.envint.2024.108538](https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.108538)
- Shirshova L.T., Gilichinsky D.A., Ostroumova N.V. et al. 2015. Application of spectrophotometry for quantification of humic substances in the permafrost sediments. *Earth's cryosphere* 19 (4): 94–106. (in Russian)
- Van der Wielen P.W., Lut M.C. 2016. Distribution of microbial activity and specific microorganisms across sediment size fractions and pipe wall biofilm in a drinking water distribution system. *Water Science and Technology: Water Supply* 16 (4): 896–904.
- Wang Z., Hessler C.M., Xue Z. et al. 2012. The role of extracellular polymeric substances on the sorption of natural organic matter. *Water Research* 46 (4): 1052–1060



# Формирование биопленок *Actinobacteria* при очистке подземных вод

Краткое сообщение

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Литвиненко З.Н.\*, Кондратьева Л.М.

Институт водных и экологических проблем Дальневосточного отделения Российской Академии наук, Хабаровского федерального исследовательского центра, Дикопольцева, 56, Хабаровск, 680000, Россия

**АННОТАЦИЯ.** В работе представлены результаты исследования причин формирования биопленок в процессе очистки подземных вод с использованием природных сорбентов. Анализ структуры микробных комплексов на разных этапах водоподготовки показал, что их численность увеличивалась после фильтрации через загрузку с гранулированным активированным углем. В некоторых случаях она сохранялась высокой в накопительных резервуарах с очищенной водой. Фактически, на всех этапах водоподготовки в структуре сообщества встречались представители класса *Actinobacteria*, которые формировали биопленки в технической системе, а также через 14 суток хранения в бутилированной воде. Установлено, что представители актиномицетов в планктонном состоянии образовывали хлопья из мицелия, а на фильтрующих загрузках формировали биопленки в виде сложно структурированного сообщества. Штаммы *Actinobacteria*, выделенные из воды и биопленок с активированного угля, отличались по своим культуральным и морфологическим характеристикам. Однако для них была характерна общая способность к продуцированию полимерных веществ, которые формировали защитный матрикс и усиливали адгезию клеток к различным субстратам и поверхностям. С помощью сканирующей электронной микроскопии показано, что спорообразование способствовало выживанию микроорганизмов на всех этапах очистки подземных вод, включая хлорирование и озонирование.

**Ключевые слова:** биопленки, *Actinobacteria*, мицелий, подземные воды, водоподготовка

Для цитирования: Литвиненко З.Н., Кондратьева Л.М. Формирование биопленок *Actinobacteria* при очистке подземных вод // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 986-991. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-986

## 1. Введение

В связи с антропогенным загрязнением природных вод особенно актуальными являются вопросы обеспечения населения качественной питьевой водой путем совершенствования методов водоподготовки (Liu et al., 2017). Однако, иногда качество воды может ухудшаться при ее прохождении через систему водоочистки или при ее распределении по водопроводным сетям. Основное внимание уделяется формированию биопленок в трубах распределительной системы (Makris et al., 2014; Van der Wielen and Lut, 2016). Накопленный опыт свидетельствует о том, что изменения качества подаваемой воды населению могут вызвать физико-химическое и микробиологическое разрушение материала труб (коррозия), формирование биопленок и рыхлых отложений в распределительной системе (Liu et al., 2017). Известно, что только 10 % сухой массы

биопленок представлено клетками микроорганизмов, а более 90% приходится на долю полимерного матрикса (Flemming and Wingender, 2010), который играет роль аккумулятора органических и минеральных веществ (Wang et al., 2012) и обеспечивает устойчивость микробного сообщества, повышая его адаптационный потенциал (Oppenheimer-Shaanan et al., 2016).

Особое внимание в последнее время уделяется показателям биостабильности питьевых подземных вод. Термин “биологическая стабильность” в данном контексте относится к концепции поддержания микробиологического качества воды от момента производства питьевой воды до момента ее потребления (Favere, 2023). Вопрос безопасности подземных вод является приоритетным и, как правило, зависит от множества природных и антропогенных факторов (Muhisen et al., 2019). Изменения микробиологических показателей в системе водо-

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [zoyana2003@mail.ru](mailto:zoyana2003@mail.ru) (З.Н. Литвиненко)

Поступила: 06 мая 2024; Принята: 27 мая 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



подготовки могут оказать негативное воздействие на качество питьевой воды и здоровье потребителей (Prest et al., 2016).

Поэтому наиболее значимыми являются исследования изменений основных микробиологических характеристик воды на разных этапах очистки подземных вод. Цель нашей работы заключалась в выявлении факторов риска развития биопленок в системе водоподготовки подземных вод и причин формирования агрегатов мицелия *Actinobacteria* в питьевой воде.

## 2. Материалы и методы

Объектом исследования являлись микробные сообщества (МС) природных подземных вод, и вода, прошедшая очистку с помощью сорбентов; биопленки и мицелий, формирующиеся на различных этапах водоподготовки в технологической линии и бутилированной воде. Пробы подземной воды были отобраны из эксплуатационной скважины, (глубина 45 м), которая активно используется для откачки подземных вод, их дальнейшей водоподготовки и реализации питьевой воды в розничных сетях в бутилированной форме. Скважина расположена на территории Тунгусского месторождения, принадлежащего Средне-Амурскому артезианскому бассейну, на участке Среднеамурской низменности.

В работе были использованы общепринятые в микробиологии методы: культивирование микроорганизмов на агаризованных и жидких питательных средах; выделение штаммов микроорганизмов и определение их активности; экспериментальное моделирование с гранулированным активированным углем (ГАУ). Содержание органических веществ в воде определяли спектрофотометрическим методом (SHIMADZU UV-3600) при разных длинах волн (Shirshova et al., 2015). Биопленки

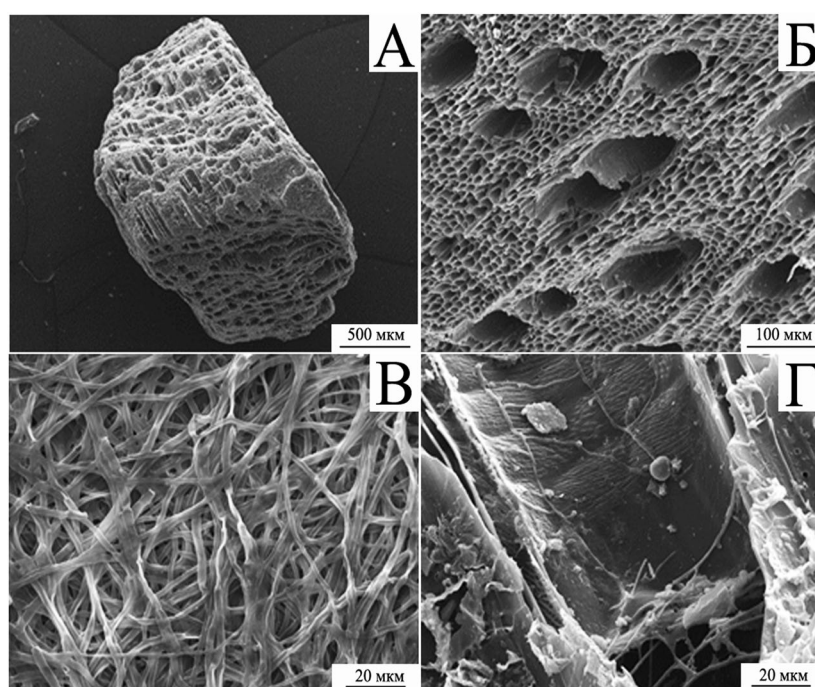
исследовали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (VEGA 3 LMH TESCAN, Чехия) в Хабаровском инновационно-аналитическом центре коллективного пользования на базе Института тектоники и геофизики ДВО РАН.

## 3. Результаты и обсуждение

Во всех типах подземных вод содержатся разнообразные по строению классы органических соединений (углеводороды, карбоновые кислоты, спирты, альдегиды, кетоны, амины), а также гумусовые вещества. Все эти компоненты вовлекаются в сложные биогеохимические процессы и могут выступать факторами риска, активизируя развитие сложных микробных комплексов в очищаемой воде в виде обрастаний оборудования, биопленок и мицелиальных агрегатов в бутилированной воде. Исследования изменений в сообществах планктонных бактерий и биопленок, а также ключевых факторов, влияющих на их поведение, важно для понимания и управления микробиологическим качеством воды (Ren et al., 2024).

В результате исследования структуры МС подземных вод на разных этапах водоподготовки установлен существенный вклад микроорганизмов, продуцирующих слизистые полимерные вещества. Регулярно присутствовали крупные споры, которые при внесении разных источников углерода *in vitro* прорастали и формировали мицелий в виде рыхлых, визуально различимых агрегатов.

Исследования биопленок, сформированных на ГАУ показали, что они представлены сложными МС, которые способны продуцировать полимерные соединения и формировать агрегаты из мицелия. Отмечено, что при внесении глюкозы в питательную среду в структуре МС доминировали бактериальные клетки, синтезирующие слизистые



**Рис.** Микроструктура гранулированного угля и биопленки *Actinobacteria*: А – ГАУ x 95; Б – ГАУ x 500; В – молодой мицелий в бутилированной воде через 14 суток после ее очистки (x 2000); Г – поверхность активированного угля *in vitro* с мицелием актинобактерий (x 2000).

капсулы. Исследования поверхности ГАУ с помощью СЭМ показали высокую пористость частиц, в некоторых сохранялись фрагменты растительного каркаса (Рис. А,Б). Микроорганизмы в прикрепленном состоянии на ГАУ формировали мицелиальную сеть (Рис. Г). Обнаруженные в бутилированной воде биопленки в молодом возрасте были представлены скоплением тонкого мицелия (Рис. В). Согласно культурально-морфологическим исследованиям мицелия, образованного на активированном угле *in vitro* и в бутилированной воде, в том числе на стадии спорообразования, эта группа хемогетеротрофных микроорганизмов была отнесена к представителям филума *Actinobacteria* (класс *Actinobacteria*).

Установлено, что при благоприятных условиях роста, актинобактерии могут выделять продукты своего метаболизма, влияющие на вкус и запах воды. Они обладают одной из самых сложных клеточных структур среди микроорганизмов и способны формировать нитчатый мицелий. *Actinobacteria* часто становятся проблемой для предприятий по водоподготовке, так как фрагменты мицелия и споры попадают в источники водоснабжения, приживаются в технологических системах и влияют на органолептические показатели воды (Barka et al., 2016).

Нами отмечено, что в присутствии гуминовых веществ (ГВ) и недостатке легкодоступных источников углерода, ускоряется процесс спорообразования, а на разрушающемся мицелии развиваются различные бактериальные формы. Некоторые из них отличаются скользящим ростом, который сопровождается образованием дендритоподобных структур. Их биомасса представлена мелкими овальными клетками, погруженными в слизистый матрикс. На СЭМ изображениях также были обнаружены микроколонии из скопления клеток, инкрустированных оксидами разных элементов, включая нормируемые в питьевой воде. Известно, что ГВ контролируя окружающие условия, изменяют структуру МС и стимулируют процессы разложения органических веществ (ОВ) и снижают биодоступность некоторых металлов (Kulikova and Perminova, 2021).

#### 4. Выводы

В результате исследования структуры микробных сообществ на разных этапах водоподготовки, биопленок, формирующихся в эксперименте на гранулированном активированном угле в присутствии разных источников углерода, установлен основной фактор риска снижения качества очищенной воды – развитие актинобактерий. Несмотря на использование различных сорбентов, методов дезинфекции (хлорирование и озонирование) представители *Actinobacteria*, входящие в состав биопленок, сохраняли свою жизнеспособность в резервуарах с чистой водой и влияли на органолептические показатели бутилированной воды. Высказана гипотеза о негативной роли активированного угля, выступающего аккумулятором органических веществ, а

также местом адгезии спор актинобактерий и бактериальных клеток, синтезирующих полимерный матрикс. Для предотвращения снижения качества очищаемой воды требуется контролировать регламент регенерации сорбентов или их замены.

#### Конфликт интересов

Авторы декларируют об отсутствии конфликта интересов.

#### Список литературы

- Barka E. A, Vatsa P., Sanchez L. et al. 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and molecular biology reviews* 80 (1): 1–43. DOI: [10.1128/membr.00019-15](https://doi.org/10.1128/membr.00019-15)
- Favere J. 2023. Biostability of drinking water systems: from online monitoring to microbial quality management. Ghent University. Faculty of Bioscience Engineering: 219. URL: <http://hdl.handle.net/1854/LU-01GVJKHN3DVVY9P68JARE18B5S>
- Flemming H.-C., Wingender J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8 (9): 623–633.
- Kulikova N.A., Perminova I.V. 2021. Interactions between humic substances and microorganisms and their implications for nature-like bioremediation technologies. *Molecules* 26: e 2706. DOI: [10.3390/molecules26092706](https://doi.org/10.3390/molecules26092706)
- Liu G., Zhang Y., Knibbe W.J. et al. 2017. Potential impacts of changing supply-water quality on drinking water distribution: A review. *Water Research* 116: 135–148
- Makris K.C., Andra S.S., Botsaris G. 2014. Pipe scales and biofilms in drinking-water distribution systems: undermining finished water quality. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 44 (13): 1477–1523.
- Muhisen M. AL, Gokcekus H., Ozsahin D.U. 2019. The most common factors effecting ground water quality. *International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering* 8 (3): C2586018319 URL: [www.ijitee.org](http://www.ijitee.org)
- Oppenheimer-Shaanan Y., Sibony-Nevo O., Bloom-Ackermann Z. et al. 2016. Spatio-temporal assembly of functional mineral scaffolds within microbial biofilms. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2: e 15031. DOI: [10.1038/npjbiofilms.2015.31](https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2015.31)
- Prest E.I., Hammes F., van Loosdrecht M. et al. 2016. Biological Stability of drinking water: controlling factors, methods, and challenges. *Frontiers in Microbiology* 7: 45. DOI: [10.3389/fmicb.2016.00045](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00045)
- Ren A., Yao M., Fang J. et al. 2024. Bacterial communities of planktonic bacteria and mature biofilm in service lines and premise plumbing of a megacity: composition, diversity, and influencing factors. *Environment International* 185 (3): e 108538 DOI: [10.1016/j.envint.2024.108538](https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.108538)
- Shirshova L.T., Gilichinsky D.A., Ostroumova N.V. et al. 2015. Application of spectrophotometry for quantification of humic substances in the permafrost sediments. *Earth's cryosphere* 19 (4): 94–106. (in Russian)
- Van der Wielen P.W., Lut M.C. 2016. Distribution of microbial activity and specific microorganisms across sediment size fractions and pipe wall biofilm in a drinking water distribution system. *Water Science and Technology: Water Supply* 16 (4): 896–904.
- Wang Z., Hessler C.M., Xue Z. et al. 2012. The role of extracellular polymeric substances on the sorption of natural organic matter. *Water Research* 46 (4): 1052–1060