

Міністерство освіти і науки України
Національний університет водного господарства
та природокористування

Навчально-науковий інститут агроекологій та
землеустрою
Кафедра водних біоресурсів

05-03-113М

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

до виконання лабораторних робіт
з навчальної дисципліни «Водна мікробіологія»
для здобувачів вищої освіти першого (бакалаврського) рівня
за освітньо-професійною програмою
«Водні біоресурси та аквакультура»
спеціальності 207 «Водні біоресурси та аквакультура»
денної та заочної форм навчання

Рекомендовано науково-
методичною радою з якості ННІ
агроекології та землеустрою
Протокол № 11 від 23.05.2023 р.

Рівне – 2023

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з навчальної дисципліни «Водна мікробіологія» для здобувачів вищої освіти першого (бакалаврського) рівня за освітньо-професійною програмою «Водні біоресурси та аквакультура» спеціальності 207 «Водні біоресурси та аквакультура» денної та заочної форм навчання [Електронне видання] / Гриб Й. В., Полтавченко Т. В. – Рівне : НУВГП, 2023. – 58 с.

Укладачі: Гриб Й. В., доктор біологічних наук, професор кафедри водних біоресурсів; Полтавченко Т. В., кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри водних біоресурсів.

Відповідальний за випуск: Полтавченко Т. В. – кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри водних біоресурсів, завідувачка кафедри водних біоресурсів.

Керівник групи забезпечення спеціальності

207 «Водні біоресурси та аквакультура»

Петрук А. М.

Зміст

Вступ	3
Лабораторна робота №1 Загальні правила роботи в лабораторії.	4
Будова мікроскопа і техніка мікроскопування.	
Лабораторна робота №2 Методи виявлення мікроорганізмів.	8
Лабораторна робота №3 Поживні середовища для вирощування мікроорганізмів	15
Лабораторна робота № 4 Методи стерилізації поживних середовищ, посуду та інструментів.	21
Лабораторна робота № 5 Культивування вірусів у лабораторних умовах.	25
Лабораторна робота № 6 Морфологія мікроорганізмів і структура бактеріальної клітини	27
Лабораторна робота № 7 Санітарно-мікробіологічні показники якості води	33
Лабораторна робота № 8 Біологічний аналіз активного мулу і біоплівки	45
Рекомендована література	58

© Й. В. Гриб, Т. В. Полтавченко, 2023

© НУВГП, 2023

Вступ

Водна мікробіологія спрямована на здобуття студентами глибоких теоретичних і практичних знань з загальної і спеціальної мікробіології. Формування уявлення про роль мікроорганізмів в процесах, що проходять у водному середовищі, вплив на життєдіяльність різних видів риб та вплив на ефективність рибного господарства і здоров'я людини.

Мета вивчення дисципліни полягає в одержанні студентами теоретичних і практичних знань з загальної і спеціальної мікробіології. Сформувані уявлення про роль мікроорганізмів в процесах, що проходять у водному середовищі.

Завдання навчальної дисципліни спрямоване формування уявлення про роль мікроорганізмів в процесах, що проходять у водному середовищі, вплив на життєдіяльність різних видів риб та вплив на ефективність рибного господарства і здоров'я людини.

У результаті вивчення навчальної дисципліни студент повинен

знати:

- основи морфології та фізіології мікроорганізмів;
- основи систематики та екології мікроорганізмів;

вміти:

- проводити мікробіологічне дослідження води повітря та ґрунту;
- оцінювати якість води за результатами мікробіологічних досліджень.

Дисципліна поєднує в собі інформацію про сучасні методи вивчення та використання мікроорганізмів для підвищення ефективності рибного господарства з методами боротьби з патогенною мікрофлорою.

Лабораторна робота № 1

Правила роботи в лабораторії.

Тема. Загальні правила роботи в лабораторії. Будова мікроскопа і техніка мікроскопування.

Загальні правила роботи в лабораторії

Приміщення лабораторії, де проводяться заняття з мікробіології, має бути сухим і світлим. У ньому треба дотримувати чистоти, оскільки в повітрі й на різних предметах завжди є велика кількість різних мікроорганізмів. Щоб приміщення лабораторії завжди було чистим, його необхідно провітрювати і щодня проводити в ньому вологе прибирання із використанням дезінфікуючих розчинів (найчастіше для цього використовують 3 %-й розчин соди) або опромінювання бактерицидними лампами, яке вбиває як вегетативні клітини бактерій, так і їх спори.

Робочі місця в лабораторіях перед початком і після роботи треба протирати ганчіркою, змоченою 0,5-1 %-м розчином хлораміну або 1 %-м розчином карболової кислоти. Лабораторний посуд також має бути стерильним. Для цього після занять його залипають на 1-2 год. теплою мильною водою, потім прополіскують, висушують і стерилізують. На робочих столах розміщують: мікроскопи, спиртівки або сучасні газові горілки, крапельниці і дистильованою водою, пінцети, бактеріологічні петлі, шпатели, предметні й накривні скельця та інші інструменти (рис. 1).

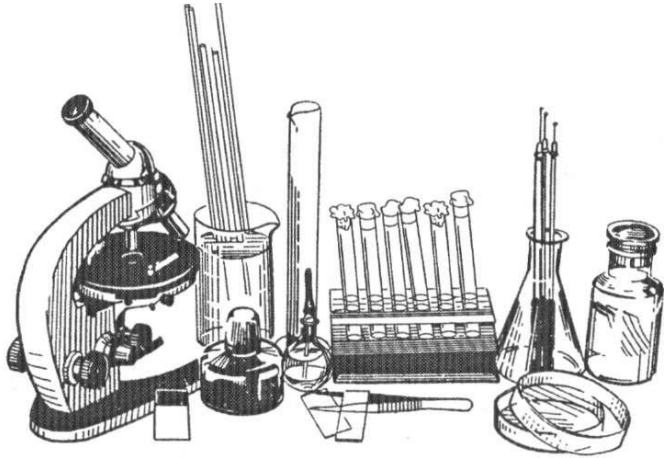


Рисунок 1

Інвентар, необхідний для проведення лабораторних робіт

Бактеріологічні голки, шпатель та петлі, за допомогою яких роблять посіви мікробів з колоній та суспензій досліджувальних культур, виготовляють із платинової дротини, яку закріплюють у спеціальних металевих держачках . (рис.2).

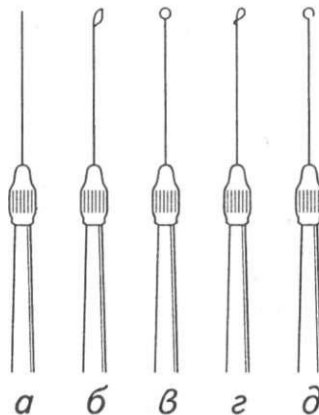


Рисунок 2. Бактеріологічні голка, шпатель та петлі:

а - голка; б - шпатель; в, д - петлі (в - правильно зроблені; г, д - неправильно зроблені)

У стерильних боксах проводять посів або пересів мікроорганізмів з одного середовища на інше, розливають середовища тощо.

Голки, петлі, шпатели та інші інструмент після роботи слід стерилізувати. Чисті знежирені предметні та накривні скельця необхідно закривати у банках з притертим корком

У мікробіологічних лабораторіях дозволяється працювати тільки в чистих халатах і шапочках. Забороняється швидко ходити, знімати спецодяг, їсти і курити. По закінченню занять поживні середовища з посівами вміщують у термостати, музейні культури у холодильники які закриваються і пломбуються, прибирають робочі місця, старанно миють руки, а при необхідності обробляють їх дезінфікуючим розчином.

Будова мікроскопа і техніки мікроскопування

Серед різноманітних приладів, що використовуються в практиці мікробіологічних досліджень, найважливіше місце належить мікроскопу.

Мікроскопом називається прилад з певним розташуванням лінз у ньому, за допомогою яких досліджуваний об'єкт збільшується в сотні й тисячі разів. Мікроскопи, які дають можливість вивчати різні прозорі об'єкти у світлі, що проходить через лінзи, називаються світловими або біологічними.

Промисловість випускає чимало різних моделей біологічних мікроскопів, які відрізняються лише за конструкцією деяких деталей. З навчальними цілями широко використовуються біологічні мікроскопи серії «Биолам», які виготовляються в різних варіантах. Мікроскоп цієї серії має механічну та оптичну системи. У механічній системі основними частинами є прямокутна основа (штатив), коробка з мікрометричним механізмом, предметний столик, тубусотримач з макрогвинтом, тубус, револьвер з отворами для об'єктивів (рис.3).

Рух системи забезпечується обертанням макрометричного і мікрометричного гвинтів.

Оптична система, складається з об'єтивів, окулярів та освітлювального пристрою (конденсор, дзеркало, відкидна лінза, світлофільтр, освітлювач). Основною частиною оптичної системи є об'єтив, що характеризує основні якості мікроскопа: власне збільшення, роздільну здатність і чіткість зображення.

Об'єтив — це система лінз у металевій оправі. Передня, найголовніша лінза об'єктива, називається фронтальною. Вона дає зображення об'єкта, що розглядається, із сферичною і хроматичною аберациями. Останні усуваються розміщеними вище в об'єктиві корегуючими лінзами. В об'єктивах планахроматах і планapoхроматах сферична і хроматична аберації є виправленими. При роботі з цими об'єктивами найкращий ефект досягається тільки при одночасному використанні компенсаційних окулярів.

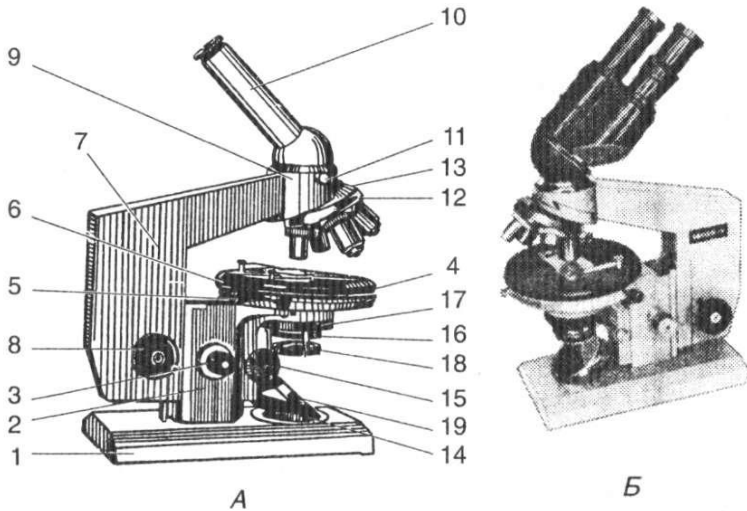


Рисунок 3 Біологічні мікроскопи серії «БИОЛАМ» (А - МБР-1; Б- МБР-3): 1 - основа; 2 - коробка з механізмом мікрометричного фокусування; 3 - рукоятка мікрогвинта; 4 - предметний столик; 5 - гвинт для фіксування диска предметного

столика; 6 - регулювальні гвинти; 7 - тубусотримач; 8 - рукоятка макроговинта; 9 - головка; 10 - насадка; 11 - гвинт для закріплення насадки; 12 - револьвер; 13 - гвинт фіксування револьвера; 14 - кронштейн конденсора; 15 - рукоятка конденсора; 16 - циліндрична гільза конденсора; 17 - гвинт; 18 - додаткова лінза (відкидна); 19 - дзеркало

Розрізняють сухі та імерсійні об'єктиви. У сухому об'єктиві між фронтальною лінзою і об'єктом міститься повітря. Найчастіше користуються сухими об'єктивами при збільшенні досліджуваного об'єкта від 56 до 600 разів. Імерсійні (ОИ-90 або МИ-90) об'єктиви застосовують при вивченні дуже дрібних об'єктів (бактерій, грибів тощо). В імерсійних об'єктивах між фронтальною лінзою і досліджуваним об'єктом міститься крапля імерсійної олії, найчастіше кедрової. У цій однорідній системі промені світла не заломлюються, а потрапляють в об'єктив, не змінюючи свого напрямку, оскільки показники заломлення скла і кедрової олії майже однакові: 1,52 і 1,515 відповідно. Часто використовують також синтетичні продукти, які за оптичними властивостями не поступаються кедровій олії (рис.4).

До оптичної системи мікроскопа також належить окуляр, який складається з двох плоско-опуклих лінз: верхньої очної і нижньої — збірної. Очна лінза збільшує дійсне зображення, одержане об'єктивом, подібно до звичайної лупи. Цифри на металевій оправі окуляра (5x, 7x, 10x, 15x, 20x) вказують на його власне збільшення, яке визначається за такою формулою:

Як і об'єктиви, окуляри також бувають різних типів. Вибір того чи іншого залежить від об'єктива.

Лабораторна робота № 2

Методи виявлення мікроорганізмів.

Тема: Основні методи виявлення мікроорганізмів. Морфологія бактерій, пліснявих грибів і дріжджів. Виготовлення препаратів мазків з культур мікроорганізмів грибів і дріжджів .

Мета: Вивчити основні методи виявлення мікроорганізмів. Морфологію бактерій, пліснявих грибів і дріжджів.

Виготовлення препаратів мазків з культур мікроорганізмів грибів і дріжджів .

Мікроскопічні методи включають приготування мазків і препаратів для мікроскопування. Найчастіше результати мікроскопічних досліджень носять орієнтовний характер, оскільки багато мікроорганізмів позбавлені морфологічних і тинкторіальних особливостей.

Мікробіологічні (бактеріологічні) методи дозволяють точно встановити наявність збудника в досліджуваному матеріалі: включає культивування, виділення чистої культури та ідентифікацію мікроорганізмів з урахуванням морфологічних, тинкторіальних, культуральних, біохімічних, токсигенних і антигенних властивостей.

Біологічні методи спрямовані визначення наявності токсинів збудника в досліджуваному матеріалі і виявлення збудника, включають зараження лабораторних тварин із наступним дослідженням їх.

Серологічні (імунологічні) методи виявлення специфічних антитіл і антигенів збудника - важливий інструмент у діагностиці інфекційних захворювань.

Метод алергічної реакції. Антигени багатьох збудників мають сенсibiliзуючу дію, які використовують для діагностики інфекційних захворювань (шкірно-алергічна проба).

2. Мікроскопічні методи дослідження морфології бактерій і грибів Приготування препаратів для мікроскопічного дослідження

Для приготування препарату досліджуваній матеріал (найпростіший харчові дріжджі додають цукор і через 10 – 15 хв. досліджують) беруть з пробірки, колби чи чашки Петрі бактеріологічної петлею чи стерильною піпеткою.

Приготування препарату вивчення мікроорганізмів в нативном вигляді.

Метод "висячої краплі". Невелику краплю мікробної суспензії наносять на середину покривного скла. Предметне скло з поглибленням ("лункою"), краї якого змазані вазеліном, обережно накладають на покривне скло так, щоб крапля досліджуваної рідини виявилася в центрі поглиблення, щільно

притискають до скла і швидко перевертають догори. Для дослідження препарату використовують іммерсійний об'єктив, який занурюють у іммерсійну олію на покривному склі.

Метод "розчавленої" краплі. На поверхню знежиреного предметного скла наносять краплю приготовленої суспензії слід нанести на предметне скло, а зверху на предметне скло покласти покривне скло.

3. Дріжджі, розміри, форми та будова, розмноження, класифікація.

Дріжджі - більш високоорганізовані організми, ніж бактерії. Вони, як і бактерії, є одноклітинними організмами, але дріжджові клітини більші, ніж бактеріальні. Середній розмір 10-15 мк (проти 1-5 мк у бактерій).

Форма дріжджів завжди заокруглена. Найчастіше вони мають кулясту або овальну форму, рідше - циліндричну або іншу.

Будова дріжджової клітини відрізняється від бактеріальної тим, що в цитоплазмі дріжджової клітини є повністю диференційоване (відокремлене) ядро. В цитоплазмі старих дріжджових клітин поряд з ядром видно вакуолі - порожнини, заповнені клітинним соком, у складі якого є запасні поживні речовини.

Найчастіше дріжджі розмножуються брунькуванням. Коли дріжджова клітина виростає до нормального розміру, на її поверхні утворюється спочатку маленьке набрякання у вигляді бруньки. Ядро материнської клітини (клітини, яка брунькується) ділиться, і частина ядра спрямовується в бруньку. Брунька поступово збільшується, і коли досягає величини материнської клітини, відділяється від неї. Інколи дочірні клітини (клітини, які утворилися із бруньок) залишаються з'єднаними з материнською і в такому стані самі починають брунькуватися. Утворюється сполучення кількох, зв'язаних між собою, дріжджових клітин.

Багато дріжджів здатні також до спороутворення. Такі дріжджі називають справжніми (типовими). Дріжджі, які не здатні до спороутворення, називають аспорогенними (несправжніми, нетиповими). На відміну від бактерій, у

дріжджовій клітині утворюється декілька спор (від 2 до 12), які в сприятливих умовах проростають у нормальні вегетативні клітини. Таким чином, спороутворення у дріжджів є способом самозахисту й одночасно способом розмноження.

Класифікація дріжджів ґрунтується на способах їх розмноження. Усі дріжджі за здатністю утворювати спори поділяють на дві родини:

- перша родина - сахароміцетів (*Sacharomycetaceae*);
- друга родина - несахароміцетів (*Non-sacharomycetaceae*). До родини сахароміцетів належать усі справжні дріжджі, які викликають процес спиртового бродіння і можуть утворювати спори. Сахароміцети - у перекладі цукрові гриби.

До родини несахароміцетів належать усі несправжні дріжджі, тобто дріжджі, які не здатні до спороутворення.

Родина сахароміцетів у залежності від способів розмноження ділиться на 3 роди: *Sacharomyces*, *Schizosacharomyces*, *Zigosacharomyces*.

Рід *Sacharomyces*. Цей рід об'єднує дріжджі, які не здатні до статевого розмноження. Вони розмножуються тільки брунькуванням або утворенням спор вегетативним шляхом (велика роль в промисловості-культурні).

Особливо велике значення із дріжджів роду *Baspaгatусез* мають такі види: *Sach. cerevisiae* та *Sach. ellipsoideus*. Дріжджі *Sach. cerevisiae* мають кулясту форму. Окремі раси цього виду дріжджів використовуються при виготовленні спирту, пива та у випічці хліба.

Дріжджі виду *Sachellipsoideus* мають витягнену еліпсоїдну форму та використовуються у виноробстві. Рід *Schizosachatrmyces*. - дріжджі, що розмножуються діленням та брунькуванням. Дріжджі цього роду в промислових масштабах використовуються тільки в країнах зі спекотним кліматом. Дріжджі *Schizosach. Pombe* використовуються для виготовлення пива в Африці. *Schizosach. malacai* використовуються для виробництва роуму із патоки. Рід *Zigosacharomyces*.- розмножуються брунькуванням та утворенням спор, але останнє відбувається тільки після злиття двох клітин, тобто статевим шляхом. Вегетативним способом спор не утворюють. Технічне

значення - здатність деяких видів розвиватися в середовищах з високою концентрацією цукру. Так, наприклад, *Zigosach. Prigianus* є найбільш поширеним збудником бродіння варення та меду, що часто призводить до значних втрат продуктів. У складі цих продуктів біля 70% цукру. Друга родина дріжджів - родина несхароміцетів - об'єднує дріжджі, які не здатні утворювати спори і розмножуються тільки брунькуванням. Вона складається з декількох родів, із яких виділимо два: Рід *Torula*. Дріжджі цього роду є збудниками дуже слабого спиртового бродіння і нагромаджують не більше 3% спирту. Один із видів цього роду *T. kefir* використовується для виготовлення кефіру та кумису. Усі дріжджі роду *Torula* дуже дрібні і мають кулясту форму. Рід *Mycoderma*. - мають циліндричну форму. При брунькуванні дочірні клітини не відходять від материнської, тому із дріжджових клітин утворюються довгі ланцюги. В процесі розвитку на продуктах *Mycoderma* утворює щільні плюсклі плівки. Розвиток дріжджів цього роду завдає великої шкоди виробництву спиртних напоїв, тому що вони викликають окиснення спирту до вуглекислого газу і води. Тобто, *Mycoderma* належить до дріжджів-шкідників і зменшує вихід спирту. Вона розвивається також на поверхні квашених огірків та капусти у вигляді плюсклої плівки і викликає псування цих продуктів з утворенням молочної кислоти. Деякі представники родів *Candida* та *Cryptococcus* (родина несхароміцетів) викликають у людей небезпечні захворювання - кандидози і кріптококози. Дріжджі використовують також для отримання білково-вітамінних домішок у тваринництві та як природні біокоректори (біологічно активні добавки) при виробництві харчових продуктів спеціального призначення. Дріжджову біомасу вирощують на різних відходах сільського господарства та переробних галузей. Клітини дріжджів є багатим джерелом ліпідів та вітамінів групи В.

Гриби: будова, розмноження і класифікація.

Плісневі гриби (цвілі) за своїм розвитком стоять вище не тільки бактерій, але й дріжджів. Серед плісневих грибів зустрічаються одноклітинні та багатоклітинні організми. Чимало представників грибів можуть поселятись на харчових

продуктах і викликати їх псування. Плісневі гриби можуть бути також причиною руйнування деревини, псування текстильних товарів, паперу, шкіри тощо. Плісені розвиваються тільки за наявності повітря, тому цвіллю покривається поверхня продуктів. В середині продукту плісень з'являється тільки в тих випадках, коли в ньому є порожнини, заповнені повітрям. Деякі плісневі гриби використовують при виробництві цитринової кислоти, різних сичугових сирів, а також для отримання лікувальних препаратів, так званих антибіотиків, наприклад, пеніциліну. Будова грибів. Тіло грибів - це товстоподібне сплетення тонких розгалужених ниток-гіфів, яке називається міцелієм або грибноцею. У багатоклітинних грибів гіфи розділені поперечними перегородками. У одноклітинних перегородки відсутні, і міцелій є однією дуже розгалуженою клітиною. Клітини плісневих грибів, подібно до дріжджових клітин, мають відокремлене від цитоплазми ядро. Інколи в одній клітині буває декілька ядер. В цитоплазмі клітин знаходяться вакуолі і різні вкраплення запасних поживних речовин.

Розмноження грибів. Гриби можуть розмножуватися вегетативним та статевим шляхами. Вегетативним шляхом гриби розмножуються таким способом: будь-який шматок міцелію, що потрапляє на сприятливе середовище, може розростатися. Таким шляхом, тобто шляхом росту та розгалуження гіф, можуть розмножуватись всі плісневі гриби.

Гриби можуть розмножуватись також утворенням спор. Спори утворюються на певній стадії розвитку грибів.

У одноклітинних грибів при цьому утворюються спорангії зі спорами. Спорангії - це особливі клітини, що мають достатньо великі розміри і кулясту форму. Спорангії утворюються на особливих довгих плодонесучих гіфах міцелію - спорангіеносцях. Спорангіеносці завжди піднімаються догори, тоді як міцелій стелиться по поверхні субстрату. У середині спорангіїв, які утворюються на вершині спорангіеносців, з'являється безліч спор, що називаються спорангіє спорами. Спорангіє спори утворюються шляхом розпаду багатоядерної цитоплазми на окремі частини. Попадаючи на поживне середовище, спора спочатку набрякає, а потім в одному чи

кількох місяцях на її поверхні утворюються нарости, які, розростаючись, починають розгалужуватись і дають початок новому міцелію.

В основу класифікації грибів покладено спосіб їх розмноження та будову міцелію.

Перший клас - хитридіоміцети (*Chytridiomycetes*). Це гриби, в яких дуже слабо розвинутий міцелій. Розмножуються вони утворенням зооспор (До цього класу грибів належить гриб *Synchytrium endobioticum*, який викликає захворювання бульбоплодів картоплі - картопляний рак. На пошкоджених бульбах біля вічок утворюються м'ясисті нарости різного розміру з нерівною горбкуватою поверхнею).

Другий клас - зигоміцети (*Zigomycetes*) - з одноклітинним міцелієм. Вегетативне розмноження проходить шляхом утворення спорангіеспор, а при статевому утворюються зигоспори (фітофтора (*Phytophthora*), Мукорові гриби (*Mucor*)-пошкоджують продукти, багаті на крохмаль, утворюючи на них пухнасту повстину сірого кольору.).

Третій клас - аскоміцети (*Ascomycetes*) - з багатоклітинним міцелієм. Вегетативне розмноження здійснюється за допомогою конідій. При статевому розмноженні утворюються аскоспори (Розвиваючись на товарах, гриби утворюють зелений, чорний, брунатний або жовтий порошокоподібний наліт. Один із видів аспергілових грибів (*Aspergillus niger*) використовується для отримання лимонної кислоти. Один із видів пеніцилових грибів (*Penicillium roqueforti*) відіграє важливу роль при виробництві сиру "Рокфор". Важливе значення мають ті види пеніцилових грибів, які використовуються для виробництва пеніциліну. Один із видів пеніцилових грибів (*Penicillium album*) є збудником голубої плісені цитрусових, до цієї групи належать також ріжки-паразити на злаках, пшениці, житі).

Четвертий клас - базидіоміцети (*Basidiomycetes*), розмножуються переважно статевим шляхом – базидіоспорами (до цього класу належать всі шапинкові гриби (як їстівні, так і неїстівні), а також домові гриби та трутовики, що пошкоджують деревину. До цього ж класу грибів належить головня злаків.

Вона уражає пшеницю, жито та кукурудзу. Уражені колоски виглядають обвугленими.).

П'ятий клас - недосконалі гриби (Fungi imperfecti Deitromycety) з багатоклітинним міцелієм, розмножуються виключно вегетативним шляхом – *оїдіуми* або *борошниста роса* (до цього класу грибів належить фузаріум (Fusarium) - збудник захворювання картоплі - суха гниль, а також гриб оїдіум (Oidium), який часто зустрічається на поверхні квашених і кисломолочних продуктів. Гриб має вигляд оксамитної білої плівки. Вона надає продуктам неприємного запаху і смаку).

Лабораторна робота № 3

Поживні середовища для вирощування мікроорганізмів
Тема: Поживні середовища для вирощування мікроорганізмів. Техніка посіву та культивування мікроорганізмів на живильних середовищах в аеробних та анаеробних умовах

Поживні середовища

Для нагромадження, вирощування, виділення і зберігання мікроорганізмів у лабораторних умовах використовують різні поживні середовища. Виготовляють такі середовища з продуктів рослинного і тваринного походження.

Для нормального росту і розвитку мікроорганізмів поживні середовища повинні містити всі необхідні елементи: макро- і мікроелементи, вітаміни, стимулятори росту тощо. Вони також мусять мати певні фізико-хімічні властивості: рН середовища, вологість, температуру, осмотичні властивості, окисно-відновний потенціал. Крім цього, обов'язковою рисою поживних середовищ повинна бути стерильність.

За складом поживні середовища поділяють на природні та штучні. Природні поживні середовища можуть містити такі натуральні продукти: молоко, відвар м'яса, овочі, картоплю, пивне сусло, хліб тощо. Штучні поживні середовища виготовляють або з хімічних речовин і натуральних продуктів (напівсинтетичні), або тільки з різних хімічних сполук (синтетичні).

За призначенням розрізняють прості, або звичайні, спеціальні та диференціально-діагностичні поживні середовища. До звичайних середовищ належать м'ясо-пептонний бульйон, м'ясо-пептонний агар, м'ясо-пептонний желатин та інші, на яких вирощують більшість сапрофітних і патогенних мікробів. На спеціальних середовищах (агар з кров'ю, агар із сироваткою, кров'яний телуритовий агар, жовткові середовища тощо) вирощують ті види мікроорганізмів, які не ростуть на простих поживних середовищах. До спеціальних належать також і елективні середовища, на яких створюються сприятливі умови для росту якого-небудь одного виду мікробів (бобовий агар, картопляний агар, сінна настоянка та інші).

Диференціально-діагностичні поживні середовища (наприклад, середовища Ендо для кишкової палички, середовище Штерна для сальмонел та інші) дають змогу швидко відрізнити одні види мікроорганізмів від інших.

За консистенцією середовища бувають рідкі, напіврідкі та тверді. Для вивчення фізіолого-біохімічних особливостей, а також для нагромадження мікробної біомаси (або продуктів її обміну) доцільно використовувати рідкі поживні середовища. Тверді середовища найчастіше застосовують для виділення чистих культур, підрахунку кількості бактерій та інших діагностичних цілей. Тверді поживні середовища виготовляють з рідких, додаючи до останніх 1,5-2,5 %-го агар-агару (виготовляється з морських водоростей) або 10-15 % желатину (суміш білкових речовин тваринного походження).

У мікробіологічній практиці широко застосовують також сухі поживні середовища, які випускаються у вигляді порошоків (наприклад, сухий агар, сухий поживний агар, сухий агар Ендо, середовище Плоскірева тощо), і якщо їх правильно зберігати, то вони довгий час не втрачтимуть своїх властивостей. Використання таких середовищ в навчальних лабораторіях є доцільним, бо заощаджує час при підготовці лабораторних занять.

Методи виділення і культивування мікроорганізмів

Основні відомості. Серед мікробних культур розрізняють чисті та елективні. Чистою називають культуру одного виду

мікробів, що походить з однієї клітини або спори. Елективні культури (культури нагромадження) одержують на елективних середовищах при певних умовах культивування. Для цих культур використовують середовища, склад яких найкраще задовольняє потреби певної групи мікроорганізмів. Наприклад, у середовищах для культивування хемо- і фотоавтотрофних бактерій не повинно бути органічних речовин.

Вивчення властивостей бактерій та інших мікроорганізмів, як правило, проводять на чистих культурах. Найчастіше отримують чисті культури з попередньо виготовлених елективних культур. З цією метою використовують різні методи, залежно від мети досліджень і властивостей вихідного матеріалу.

Якщо в досліджуваному матеріалі містяться різні види мікроорганізмів, то основним завданням є одержання ізольованих колоній цих мікробів шляхом пересівання їх на поверхні твердого поживного середовища. Для цього застосовують: метод розведень, метод виділення чистої культури з окремої колонії, метод виділення чистої культури з однієї клітини та інші.

Метод розведень ввів у практику Л. Пастер. Згідно з цим методом досліджуваний матеріал, який містить мікроорганізми, за допомогою петлі переносять у пробірку з рідким стерильним поживним середовищем і старанно розмішують. Потім з цієї пробірки петлею переносять матеріал у нову, і так повторюють, змінюючи 5—6 пробірок, доти, поки не одержать розведення, в якому буде тільки одна клітина. Проте цей метод зараз майже не застосовують, оскільки він має ряд недоліків.

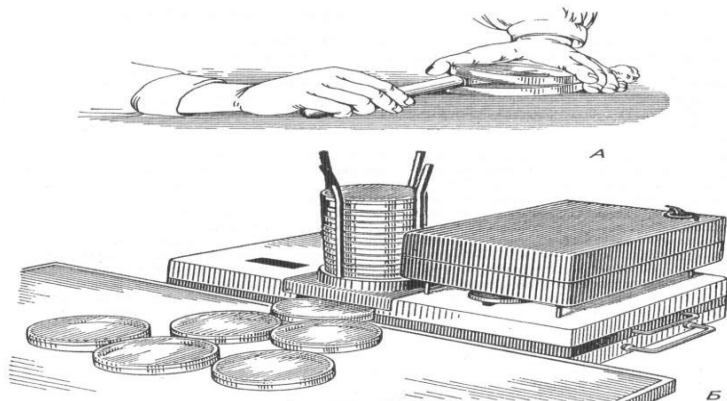


Рисунок 1. Розливка поживного середовища в чашки Петрі:
 А - ручна; Б - автоматична за допомогою універсального приладу-автомата конструкції Ю. Е. Бартошевича і А. І. Чепурного

При виділенні чистих культур і культивуванні мікробів часто проводять їх посіви і пересіви. Техніка посіву є простою. Наприклад, невеличку кількість досліджуваного матеріалу петлею вносять у посудину з рідким поживним середовищем.

Тверде поживне середовище треба спочатку приготувати: розлити розплавлений і охолоджений до 50°C МПА чи інше середовище. Стерильні чашки Петрі виставляють на рівну поверхню, обпалюють на спиртівці отвір пробірки з середовищем, піднявши кришку чашки з одного боку, наливають поживне середовище, обережно закривають чашку кришкою і заливають до застигання агару (рис.21).

Посів у чашки Петрі. Піднявши край чашки, проводять посів петлею або шпателем (рис. 22) і закривають чашку. Позначають і розміщують її у термостаті догори дном, щоб крапельки води, які утворюються з пари на кришці чашки, не потрапили на поверхню середовища і не розмивали ізольовані колонії.

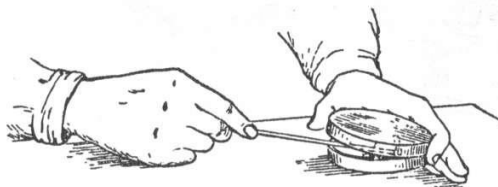


Рисунок 1. Посів на пластину МПА в чашку Петрі

Посів на косий агар у пробірках. Лівою рукою горизонтально тримають пробірку з середовищем. Правою рукою беруть петлю, обпалюють її на полум'ї спиртівки, охолоджують і вводять у посудину з досліджуваним матеріалом. Виймають пробку з пробірки, обпалюють отвір пробірки на спиртівці, вводять петлю в пробірку і зигзагоподібними рухами розсівають культуру по поверхні косоного агару. Виймають петлю, знову обпалюють край пробірки (і пробку), закривають пробірку і ставлять у термостат.

Посів уколом у стовпчик МПА застосовують для вирощування анаеробів, для виявлення характерних ознак бактерій або з метою тривалого зберігання культур (рис. 3).

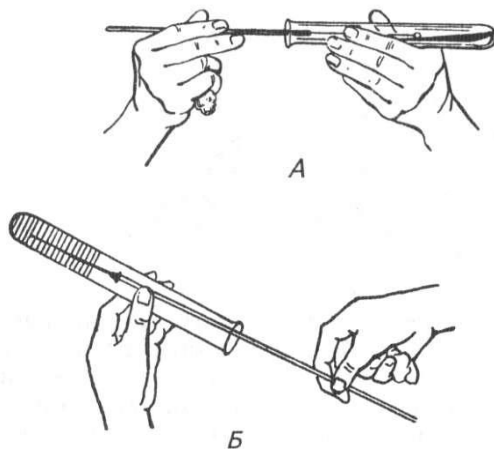


Рисунок 3. Методи посіву мікроорганізмів: **А** - на косий агар у пробірках; **Б** - уколом у стовпчик МПА

Отже, у дослідженнях по виділенню чистих культур різних організмів (бактерій тощо) входять такі основні операції: 1) посів досліджуваного матеріалу; 2) виділення чистої культури; 3) ідентифікація цієї культури.

Одержання елективних культур (на прикладі сінної палички). Вперше термін сінна паличка був введений К. Ернбергом у 1838 р. Ф. Кон у 1875 р. виділив її з настоєм сіна і докладно описав як дрібну спороносну паличку. Вона належить до аеробних (дуже поширених у природі) амоніфікуючих бактерій, які викликають розпад білкових речовин рештків рослинних і тваринних організмів.

Проведення роботи. Для одержання елективної культури сінної палички у конічну колбу (об'ємом 0,3-0,5 л) вміщують 10 г свіжого сіна, наливають 200 мл води, додають грудочку крейди (для нейтралізації) і кип'ятять протягом 20-30 хв. За цей час з сіна в розчин переходять поживні речовини і водночас гинуть майже всі неспороносні та переважна більшість спороносних бактерій. Спори сінної палички витримують кип'ятіння протягом 2 год. Одержаний сінний настій розливають у стерильні колби шаром 1-2 см, щоб краще відбувалась аерація, колби закривають ватою і розміщують у термостаті за температури 30 °С на 2-3 доби. Якщо сінний настій перед цим стерилізували, то для зараження бактеріями в колбу опускають кілька стебелець сухого сіна.

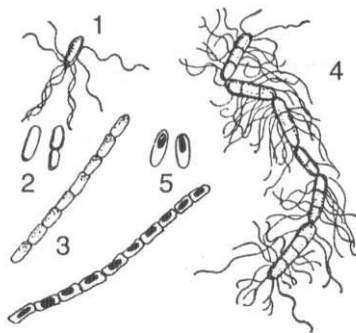


Рисунок 4. Розвиток сінної палички. 1- молода клітина, 2 –

клітина без джутиків, 3 – поділ клітини, 4 – утворення джутиків к ланцюжку, 5 – утворення спор у клітиннах.

На поверхні настою, який витримували в термостаті 2-3 доби, утворюється добре помітна тоненька бактерійна плівка. З неї виготовляють препарати «роздавлена» або «висяча» крапля і вивчають їх під мікроскопом з сухим або імерсійним об'єктивом. У полі зору добре видно поодинокі та з'єднані в нитки (стрептобактерії) клітини сінної палички (рис. 4).

Лабораторна робота № 4

Методи стерилізації поживних середовищ, посуду та інструментів.

Тема: Методи стерилізації поживних середовищ, посуду та інструментів. Вивчення мікроорганізмів у живому стані. Рух бактерій. Метод «роздушеної краплі» та метод «висячої краплі».

Стерилізацією називається повне знищення мікробів та їхніх спор у поживних середовищах, посуді, на інструментах тощо. Серед методів стерилізації розрізняють фізичні, хімічні, механічні. Фізичні ґрунтуються на дії високої температури і ультрафіолетового опромінювання, хімічні — на використанні хімічних антисептичних речовин. Фільтрування рідин через бактеріальні фільтри належить до механічних методів стерилізації. У мікробіологічній практиці найчастіше застосовують стерилізацію за допомогою високої температури (так звана термічна стерилізація).

Прожарювання на полум'ї. Цей метод дає добрі результати при стерилізації невеличких за розмірами лабораторних інструментів. Обпалюванням або прожарюванням на полум'ї спиртівки стерилізують бактеріологічні петлі, препарувальні голки, ланцети, пінцети, предметні та накривні скельця, скляні палички, ножиці, шпателі тощо.

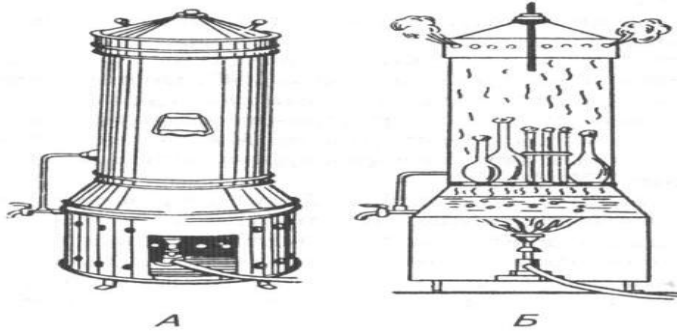


Рис. 1 Апарат Коха: А - зовнішній вигляд; Б - внутрішня будова

Стерилізація сухим жаром. Чисті колби, чашки Петрі, пробірки, піпетки, різний скляний посуд, загорнутий в папір, стерилізують у спеціальній сушильній шафі при температурі 160-170 °С протягом 2 год. Стерильні предмети виймають з сушильної шафи, коли температура знизиться до кімнатної.

Стерилізація кип'ятінням. Шприци, голки, гумові предмети, хірургічні інструменти стерилізують кип'ятінням у спеціальних стерилізаторах протягом 30 хв. Для зменшення жорсткості води та підвищення температури кипіння у стерилізатори додають 1-2 %-й розчин NaHCO_3 .

Стерилізація текучою парою, або тиндалізація. Цей метод застосовується для стерилізації речовин, що руйнуються або змінюють властивості при нагріванні (деякі поживні середовища, сироватки, вітаміни тощо). Стерилізацію текучою парою проводять в автоклаві з відкритим паровідвідним краном або використовують апарат Коха (рис. 1). Вона проводиться при температурі 56-58°C по 30 хв протягом 5-6 днів поспіль.

Стерилізація парою під тиском. Найбільш надійним способом стерилізації поживних середовищ, посуду і матеріалів є стерилізація парою під тиском в автоклавах" (рис. 2). При звичайному атмосферному тиску температура водяної пари дорівнює 100°C. При підвищенні тиску пари температура її значно підвищується (табл.1). Спільна дія високої температури і тиску пари спричинюють швидку загибель не тільки вегетативних клітин мікробів, а й їхніх спор.

Таблиця 1

Співвідношення між температурою, тиском і часом стерилізації
в автоклаві

Тиск пари, атм	Температура, °С	Час стерилізації, хв
0	100	30-60
0,5	111	20-30
1,0	121	15-20
1,5	127	15-20

Пастеризація. Метод, запропонований Л. Пастером, застосовується для знезараження харчових продуктів: молока, соків, пива, вина тощо. При цьому матеріал нагрівається при температурі 50-65°С протягом 15-30хв або при 70-80°С - 5-10хв. Цей метод використовують для знищення неспороносних мікробів. Він може проводитися в термостаті або на водяній бані.

При роботі з автоклавом треба дотримуватися правил техніки безпеки.

Стерилізація ультрафіолетовими променями. З цією метою використовують бактерицидні лампи. Метод застосовується для стерилізації повітря в мікробіологічних лабораторіях, боксах, операційних, а також деяких предметів і матеріалів. Час опромінення — 20 хв.

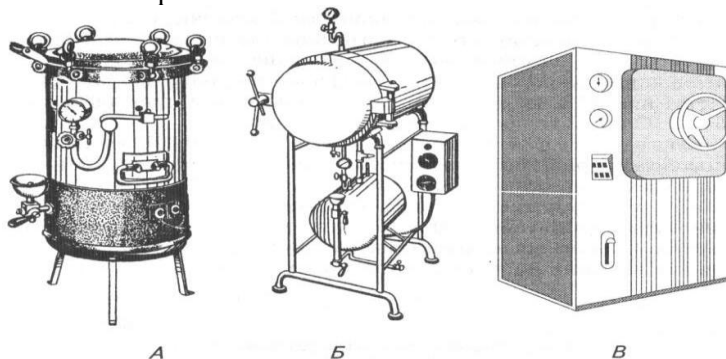


Рис. 2 Автоклави: А - вертикальний АВ-1; Б - горизонтальний АГ-1; В - автоматичний АШ-250

Під хімічною стерилізацією, або дезінфекцією розуміють знезаражування матеріалів, предметів тощо за допомогою хімічних речовин. У мікробіологічних лабораторіях найчастіше використовують розчин карболової кислоти (3—5 %), лізолу (1—3 %), формаліну (4 %), хлораміну (1—5 %), хлорного вапна (10—20 %) та інші. Борну кислоту, гліцерин, фенол та деякі інші хімічні речовини часто використовують як консерванти при виготовленні лікувальних і діагностичних сироваток, вакцин тощо.

До механічної стерилізації належить фільтрування. Найчастіше стерилізацію фільтруванням застосовують для рідин, що змінюють свої властивості при нагріванні (сироватки, деякі поживні середовища, що містять білки тощо). Фільтрування рідин проводять через спеціальні дрібнопористі фільтри (свічки Шамберлана, що їх виготовляють із каоліну, піску і кварцу, фільтри Беркефельда — з інфузорної землі, фільтри Зейтца — із азбесту, а також мембранні фільтри, виготовлені з нітроклітковини). Пори таких фільтрів пропускають рідину, а бактерії затримують (рис. 3).

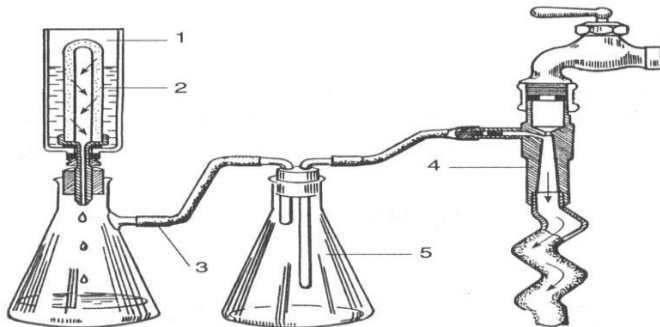


Рис. 3 Фільтр Зейтца, приєднаний до насоса: 1 - посудина з рідиною, що фільтрується; 2 - свічка Шамберлана; 3 - гумова трубка; 4 - водоструминний насос; 5 - проміжна посудина

Лабораторна робота № 5
Культивування вірусів у лабораторних умовах.
Тема: Культивування вірусів у лабораторних умовах.

Культивування вірусів тварин. У 1932 р. Е. Гудпасчером зі співавторами було запропоновано метод культивування вірусів в ембріонах курчат. Цей метод економічний і зручний. Його й нині широко застосовують для культивування багатьох вірусів тварин. Матеріал, що містить вірус, вводять за допомогою шприца або іншим шляхом у курячий ембріон на 8-12-й день його розвитку (рис. 1).

Розроблено 4 методи експериментального зараження курячих ембріонів (рис. 1): 1) в алантоїсну порожнину; 2) на ХАО (судини хоріон-алантоїсна оболонка); 3) у жовтковий мішок; 4) в амніотичну порожнину.

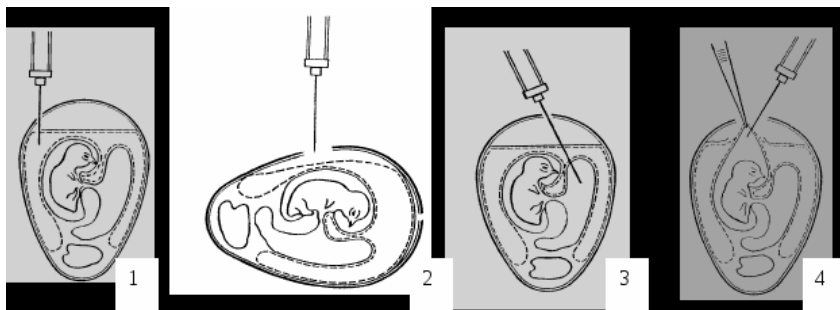


Рисунок 1. Методи експериментального зараження курячих ембріонів: 1) в алантоїсну порожнину; 2) на ХАО (судини хоріон-алантоїсна оболонка); 3) у жовтковий мішок; 4) в амніотичну порожнину.

Результати дослідів показали, що більшість видів вірусів добре розвивається в амніоні, жовтковому мішку, хоріоналантоїсній оболонці та інших частинах ембріона.

У 50-х роках у практику було впроваджено методи культивування клітинних культур, які істотно вплинули на розвиток вірусології. Тепер віруси успішно культивуються в культурах одношарових трипсинозованих клітин, які

виготовляють з ембріональних тканин курей, кроликів, морських свинок, мишей, а також нирок мавп і ембріонів людини. Широко культивуються віруси і в так званих перещеплюваних культурах клітин — штамах тканин (СОЦ-серце мавп ціномольгус, R, K-нирки кролика та ін.), злякисних пухлин (Hela, Нер-2, KB) тощо. Велика перевага перещеплюваних клітинних ліній, в порівнянні з первинними культурами, полягає в тому, що їх можна розмножувати послідовним пасажуванням протягом тривалого часу.

Культури клітин використовуються не тільки для первинного виділення вірусу, але й для виробництва вакцин, коли необхідно одержати чималу масу вірусного матеріалу. Вирощування вірусів у клітинних культурах широко застосовується і для біохімічних досліджень.

Культивування вірусів проводять також в організмі чутливих лабораторних тварин, зокрема тих вірусів, які не вирощуються в клітинних культурах і ембріонах курчат. Так, для вивчення онкогенних вірусів використовують хом'ячків, агента куру і вірусу гепатиту — приматів, вірусів Коксакі та арбовірусів — мишей. За допомогою кроликів одержують антисироватки. Експерименти з вивчення механізмів патогенезу і ролі імунної відповіді можуть бути проведені тільки на лабораторних тваринах.

Культивування вірусів рослин. Для культивування фітопатогенних вірусів використовують сприйнятливі до них рослини, які вирощують у природних умовах або в теплицях і оранжереях.

Рослина, призначена для культивування певного вірусу, повинна бути:

1. придатною для нагромадження вірусу у великій кількості;
2. стійкою проти заражений іншими близькими вірусами;
3. не містити речовин, які здатні інактивувати або осаджувати вірус в екстракті;
4. стійкою проти обробки інсектофунгіцидами;
5. стійкою проти бактеріальних та грибкових захворювань.

Для культивування фітопатогенних вірусів найчастіше використовують молоді рослини, які добре ростуть, не мають будь-яких патологічних ознак і не містять у своїх клітинах високих концентрацій фенолів, слизів і камедей, рибонуклеази тощо, а також можуть інгібувати або не зворотно осаджувати віруси. Такими рослинами, наприклад, можуть бути тютюн сорту Самсун для культивування вірусу тютюнової мозаїки, дурман для вирощування Х-вірусу картоплі. Тепер відома велика кількість рослин-індикаторів з різних ботанічних родин, що їх застосовують для культивування вірусів.

Рослини-індикатори, умови, в яких вони вирощуються, і час, коли рослини можна використовувати для виділення вірусів, треба вибирати так, щоб вихідна концентрація вірусних частинок була якомога найвищою. За даними Р. Метьюза (1973), концентрація багатьох вірусів досягає максимуму через кілька днів або тижнів, а потім дуже швидко знижується.

Лабораторна робота № 6 **Морфологія мікроорганізмів і структура бактеріальної клітини**

Тема: Морфологія мікроорганізмів і структура бактеріальної клітини

Об'єктами досліджень у мікробіології є еубактерії, ціанобактерії, актиноміцети, дріжджі, цвільові гриби, деякі найпростіші тощо. Найчисленнішу й різноманітну, як за розмірами, так і за фізіологічними властивостями групу мікробів становлять бактерії. Це прокаріотні переважно одноклітинні організми. За формою клітин серед них розрізняють кулясті (коки), паличкоподібні, звивисті, нитчасті, а також незвичайні форми бактерії (рис. 1).

Вивчення основних форм еубактерій, актиноміцетів, цвільових грибів (рис. 2), дріжджів (рис. 3) та інших мікроорганізмів проводиться на живих і фіксованих мікропрепаратах, які виготовляють з настоїв м'яса, овочів, сіна, ґрунту, гною, молочнокислих продуктів тощо, а також з колекції чистих культур.

1. Використання імерсійної системи мікроскопа для

дослідження мікробів (на вбитих і живих мікропрепаратах)

Матеріали та обладнання: 1) мікроскопи; 2) предметні та накривні скельця; 3) бактеріологічні петлі; 4) скляні палички; 5) спиртівки; 6) препарувальні голки; 7) кедрова олія; 8) розчин фарб метиленової синьки, фуксину тощо; 9) сінна настоянка та інші мікробні культури.

Основні відомості. Морфологію і структуру мікробної клітини на фіксованих (вбитих) або живих препаратах вивчають за допомогою імерсійної системи мікроскопа.

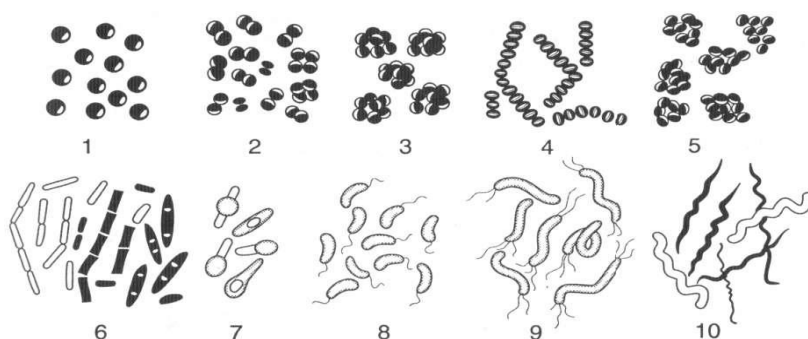


Рисунок 1



Рисунок Основні (А) та нові (>) форми бактерій:

А: 1 - монококи; 2 - дипло- та тетракоки; 3 — сарцини; 4 - стрептококи; 5 - стафілококи; 6, 7 - паличкоподібні бактерії; 8 - вібріони; 9 - спірили; 10 - спірохети; *Б:* 1 - бактерії, подібні до шестикутної зірки; 2 - бактерії, які утворюють вирости (простеки); 3 - бактерії, які галузяться; 4 - пластинчасті клітини архебактерій; 5 - тороїди; 6 - трикутні; 7 - гантелеподібні бактерії; 8 - стебельцеві бактерії; 9- трихоми нециліндричні; 10- червоподібні бактерії; 11 - клітини, з'єднані в пластинки

Для виготовлення фіксованих, а також живих мікропрепаратів («висяча крапля»), («роздавлена крапля» тощо) зазвичай користуються культурами сінної і картопляної паличок, які **ВИГОТОВЛЯЮТЬ** за кілька днів до занять.

Проведення роботи. Вивчення мікроорганізмів у живому стані найчастіше проводять на мікроскопічних препаратах («роздавлена крапля»). Для цього на стерильне предметне скло наносять бактеріологічною петлею крапельку суспензії досліджуваної культури. Зверху накривають препарат накривним скельцем, розміщують на предметному. столику мікроскопа і на поверхню накривного скельця наносять 1—2 краплини кедрової олії. У разі дослідження вбитих мікроорганізмів кедрову олію наносять безпосередньо на виготовлений і зафіксований мазок. Потім обережно знижують імерсійний об'єктив до стикання з препаратом, дивляться в окуляр і, повільно обертаючи макрогвинт на себе, піднімають тубус до появи в полі зору зображення. Після цього, користуючись тільки мікрогвинтом, старанно вивчають досліджуваний об'єкт і зарисовують його. По закінченні роботи піднімають тубус, знімають препарат і обережно витирають фронтальну лінзу об'єктива ганчіркою, змоченою чистим бензином. Відпрацьовані препарати складають у посудину з дезінфікуючим розчином.

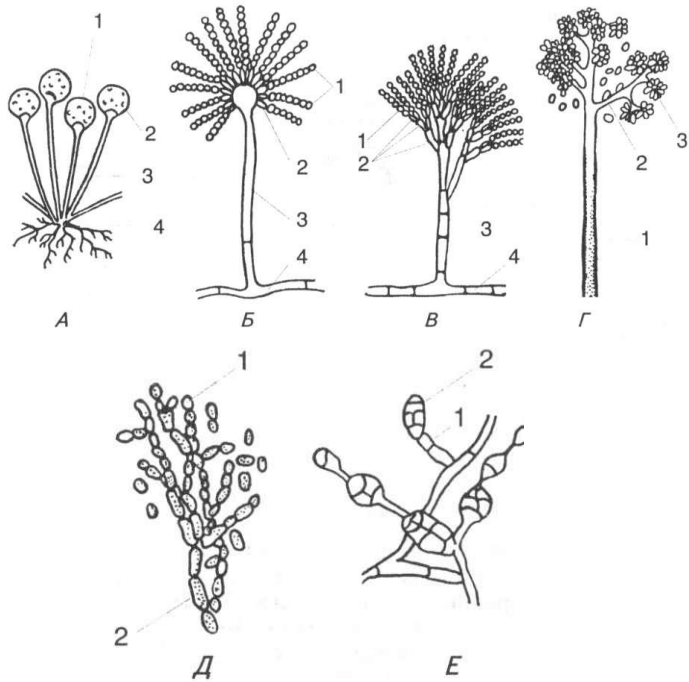


Рис. 2 Міцеліальні мікроскопічні гриби: *A* - ризопус: 1 - спорангій; 2 - спори; 3 - спорангійносець; 4 - ризоци; *Б* - аспергіл, конідії; 2 - стеригми; 3 - конідійносець; 4- вегетативні гіфи; *В* - пеніцил: конідії; 2 - стеригми; 3 - конідійносець; 4 — вегетативні гіфи; *Г* - ботритіс: 1, 2 - конідійносець; 3 - конідії; *Д*- ооспора молочна (оїдіум): 1 - оїдії; 2 - гіфа; *Е* - альтернарія: 1 - конідійносець; 2 - конідії.



Рис. 3 Актиноміцети (за М. О. Красильниковим, 1974): А - міцелій; Б - спороносіці

2. Мікроскопічне вивчення основних форм бактерій

Основні відомості. Для вивчення морфології бактерій використовують різні настої, а також чисті культури, які зберігаються в колекції лабораторії. З цією метою виготовляють препарати живих і вбитих мікроорганізмів. Для вивчення мікрококів використовують препарати з настоїв і чистих культур, які на поживному агарі утворюють червонувато-жовті колонії.

Кулясті бактерії, з'єднані попарно (диплококи), добре вивчати на препаратах, виготовлених з елективної культури азотобактера. Типових представників найчисленнішої групи паличкоподібних бактерій найкраще вивчати на препаратах з культур сінної палички або картопляної палички, вирощених на твердих поживних середовищах. На препаратах сінної палички можна спостерігати не тільки поодинокі бактерії, а й дипло- та стрептобактерії.

У настоях з гною або ґрунту, а також у зубному нальоті часто трапляються зігнуті та звивисті форми бактерій: вібріони, спірили і спірохети. Щоб ознайомитися з нитчастими формами бактерій, можна вивчати воду з водойм, де є вохристий осад.

3 Фарбування мікроорганізмів

Основні відомості. Мікроорганізми фарбують при вивченні внутрішньої будови клітини, а також з діагностичною метою. Фарбування мікробів — це складний фізико-хімічний процес, обумовлений механізмами електроадсорбції,

капілярності, хімічної спорідненості між барвником і об'єктом. Просте фарбування мікробів здійснюється за допомогою якогось одного барвника: метиленового синього, фуксину тощо. При складних методах фарбування на препарат послідовно наносять барвники, які відрізняються як за хімічним складом, так і за кольором, що дозволяє виявляти певні структури клітин і диференціювати види мікробів один від одного.

До складних методів належить фарбування мікроорганізмів за Грамом. Цей метод застосовується переважно з діагностичною метою. За цим методом фарбування всі мікроби поділяються на дві групи: г р а м п о з и т и в н і, які набувають синьо-фіолетового кольору, і грамнегативні, які внаслідок того ж фарбування знебарвлюються при додаванні спирту, а при дофарбовуванні фуксином отримують рожевий колір.

Вважають, що здатність бактерій фарбуватися за Грамом пов'язана з молекулярною організацією і хімічним складом їхньої клітинної оболонки. Проте результати фарбування за Грамом теж залежать і від техніки виготовлення мазка (він повинен бути тонким), віку досліджуваної культури і тривалості фарбування.

Для фарбування за Грамом доцільно на одному предметному склі поряд з мазком із досліджуваної культури робити мазок із відомих грампозитивних або грамнегативних мікробів (для контролю). До найпоширеніших грампозитивних мікроорганізмів належать майже всі кулясті бактерії, молочнокислі бактерії, спорозносні бацили, дріжджі та багато інших. До грамнегативних - азотобактер, оцтовокислі бактерії, кишкова паличка, протей, чудесна паличка, спірохети тощо.

Лабораторна робота № 7

Санітарно-мікробіологічні показники якості води

Тема: Санітарно-мікробіологічні показники якості води

Мета роботи: провести санітарно-бактеріологічне дослідження проб води з різних джерел і оцінити можливість її використання для питних цілей.

Теоретичні відомості

Цілі і завдання санітарно-мікробіологічного дослідження води. Оскільки вода використовується під час виробництва будь-якого виду продукції, а також безпосередньо для їжі, відповідність її якості санітарно-мікробіологічних показників надзвичайно важлива. Водним шляхом можуть передаватися кишкові інфекції - холера, черевний тиф і паратифи, сальмонельоз, дизентерія, гепатит А, поліомієліт, а також лептоспірози, сибірка, туляремія, туберкульоз, сап, Кулихоманка, різні грибові захворювання. У зв'язку з цим основною метою санітарно-мікробіологічного дослідження води є визначення наявності в ній патогенної і умовно патогенної мікрофлори, і, отже, джерела цього попадання, а також попередження поширення інфекційних захворювань серед населення.

Санітарно-мікробіологічне дослідження води проводиться в таких випадках:

1. під час вибору джерела централізованого господарсько-питного водопостачання і періодичного контролю цього джерела;
2. під час контролю ефективності знезараження питної води централізованого водопостачання;
3. під час спостереження за підземними джерелами централізованого водопостачання (артезіанські свердловини, ґрунтові води тощо);
4. під час визначення стану і ступеня придатності води джерел індивідуального водокористування (колодязів, джерел тощо);
5. під час спостереження за санітарно-епідеміологічним станом води відкритих водойм: водосховищ, ставків, озер, річок;

6. під час контролю ефективності знезараження води плавальних басейнів;
7. під час перевірки якості та ступеня очищення стічних вод;
8. під час визначення вогнища водних спалахів інфекційних хвороб.

Усі санітарно-мікробіологічні дослідження води регламентуються відповідною нормативно-технічною документацією (НТД) (табл. 7.1).

Таблиця 7.1

Перелік нормативно-технічної документації посанітарно-мікробіологічному контролю води

Назва документів	НТД
1	2
Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною	СанПіН 2.2.4-171-10
Джерела централізованого господарсько-питного водопостачання. Гігієнічні, технічні вимоги та правила вибору	ГОСТ 2761-84
Вода питна. Методи санітарно-бактеріологічного аналізу	ГОСТ 18963-73
Охорона природи. Гідросфера. Гігієнічні вимоги до зон рекреації водних об'єктів	ГОСТ 17.1.5.02-80
Охорона природи. Гідросфера. Правила контролю якості морських вод	ГОСТ 17.1.3.08-82
Вода питна. Польові методи санітарно-мікробіологічного аналізу	ГОСТ 24849-81
Вимоги до якості води нецентралізованого водопостачання. Санітарна охорона джерел	СанПіН 2.1.4.544-96

Таблиця 7.2

Перелік нормативно-технічної документації по санітарно-мікробіологічному контролю води

Об'єкти дослідження	Обов'язкові дослідження	Додатково рекомендовані
1	2	3
Вода питна централізованого господарсько-питного водопостачання	Число колоній сапрофітів БГКП	E. coli
Вода питна при нецентралізованому використанні місцевих джерел	БГКП	
Вода підземних джерел централізованого водопостачання	Число колоній сапрофітів БГКП	E. coli
Вода поверхневих джерел централізованого господарсько-питного водопостачання в межах населених пунктів	ЛКП	Число колоній сапрофітів E. coli; ентерококи; колифаги; сальмонели; шигели; ентеровіруси
Вода у водних об'єктах у рекреації	ЛКП	Число колоній сапрофітів E. coli; ентерококи; колифаги; стафілококи; сальмонели; шигели; ентеровіруси
Вода купально-плавальних і спортивних басейнів із прісною та морською водою	БГКП Число колоній сапрофітів. Стафілококи	Ентеровіруси; E. coli
Господарсько-побутові стічні води після очищення тазнезараження	ЛКП	Сальмонели; шигели; ентеровіруси
Вода питна при	БГКП	

нецентралізованому використанні місцевих джерел		
Вода підземних джерел централізованого водопостачання	Число колоній сапрофітів БГКП	E. coli

Методи санітарно-мікробіологічного дослідження води

Відбір проб води

Важливим правилом є дотримання стерильності: забір води роблять у стерильний посуд стерильними приладами і обов'язково продезінфікованими (денатурованим етиловим спиртом або іншим дезінфікуючим засобом) руками.

Відбір проб води виконує санітарний лікар, його помічник або спеціально проінструктований співробітник лабораторії. Достовірність отриманих результатів і висновків залежать від правильності забору проб. Вода для санітарно-бактеріологічного аналізу забирається в обсязі 0,5 л у скляні бутлі або флакони, закриті ватно-марлевими пробками і зав'язані зверху паперовими ковпачками. За необхідності

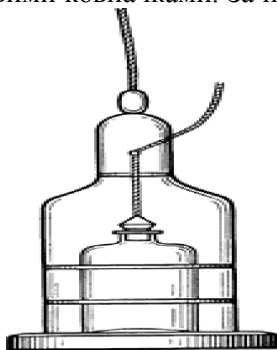


Рисунок 7.1– батометр дослідження води на наявність збудників кишкових інфекцій кількість води збільшують до 2,5 л.

Для взяття проб води з глибини (відкритих водойм, колодязів, басейнів тощо) використовують спеціальні прилади: батометр, прилади Ісаченко, Рутнер та ін. Батометр являє

собою металевий каркас довжиною 0,5-1 м (рис. 7.1). Каркас виготовляється з металу, що не піддається корозії, і може компактно складатися, оскільки складається з окремих кілець. Дно каркаса свинцеве і служить грузилом. В середину встановлюють стерильну бутель, закриту стерильною гумовою або корковою пробкою з кільцем, до якого прив'язана мотузка.

При зануренні у воду на необхідну глибину, потягуючи за мотузку, пробку відкривають, посудина заповнюється водою, про що свідчить припинення появи бульбашок повітря на поверхні води. Мотузку опускають, бутель автоматично закривається. Після вилучення батометра притерту пробку замінюють стерильною ватною (яка повинна бути загорнута в папір і перебувати в комплекті з батометром). Для взяття проб з великої глибини (понад 30 м) можна використовувати прилади Ісаченко, Рутнер, Романенко-Младова.

Для взяття проб питної води використовують склянки ємністю 0,5-1 л. Для взяття проб води з кранів, їх попередньо обпалюють полум'ям палаючого ватного тампону, змоченого спиртом, потім повністю відкривають і протягом 10 хв воду спускають. Воду наливають у бутлі з дотриманням стерильності, не змочуючи шийку, щоб не допустити замочування пробки. Джерельну воду беруть безпосередньо зі струменя або із середини поточного джерела, на відстані 10–15 см від поверхні і дна. Артезіанську й колодязну воду забирають на глибині 10–15 см від поверхні води. З ополонки проби відбирають на глибині 10–15 см від нижнього краю льоду. Із відкритих водойм, як правило, беруть серію проб на різній відстані від берега на різній глибині з урахуванням місця водозабору та руху води.

Проби стічних вод також забирають у стерильні бутлі. Проте обсяг кожної проби може коливатися від 500 до 10 мл залежно від місця взяття (під час перевірки окремих етапів очищення, після обробки, перед скиданням у водойму) і від завдань аналізу.

Зберігання та транспортування проб води

Всі взяті для дослідження проби води нумеруються, в

супровідному документі має бути зазначено найменування водойми, вододжерела, його місцезнаходження; опис місця відбору проб (для водойм – відстань від берега і глибина), близькість джерел забруднення; швидкість течії; метеорологічні умови – температура води, повітря, наявність опадів, вітру, хвиль тощо; дата взяття проби (час, число, місяць, рік); мета дослідження. Супровідний документ підписується особою, яка брала пробу, із зазначенням посади.

Транспортувати воду слід у сумках-холодильниках або в ящиках з термоізоляційною прокладкою (температура в яких не більше 1-2 °С), запобігати різким поштовхам (щоб не замочити пробки), замерзанню, дісонячних променів.

Дослідження води повинно бути проведено не пізніше 2 год із моменту відбору проби, лише як виняток допускається зберігання проби до 6 годин за температури 4-5 °С. За більш тривалого і неправильного зберігання може відбутися розмноження або загибель мікрофлори.

Доставлені проби води реєструють у спеціальному журналі з пронумерованими і прошитими сторінками.

Визначення числа сапрофітних мікроорганізмів

До сапрофітних мікроорганізмів, що населяють водойми, належать мезофільні та факультативні анаероби, здатні на живильному середовищі утворювати колонії, видимі при збільшенні в 2-5 разів. Кількість мікроорганізмів, що виростають у вигляді колоній, відповідає ступеню забруднення води органічними речовинами, що характеризує стан води. Тому загальну кількість сапрофітних бактерій слід розглядати як суттєвий непрямий показник санітарного стану води.

Визначення загального мікробного числа води можна проводити методом серійних десятикратних розведень із посівом на м'ясопептонний агар (МПА) і методом прямого мікроскопічного підрахунку мікроорганізмів у досліджуваній воді.

Визначення бактерій групи кишкових паличок

Поняття «*бактерії групи кишкових паличок*» включає

різних представників сімейства Enterobacteriaceae: родів *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* та ін. За нормативною документацією до БГКП відносяться грамнегативні, що не утворюють спор палички, що мають оксидазної активності, ферментують лактозу з утворенням кислоти і газу за температури 37 °С протягом 5–24 год (дод. Б, табл. 1). За міжнародною класифікацією такі мікроорганізми належать до загальних колиформних бактерій (ЗКБ). Вони потрапляють у навколишнє середовище, в тому числі і у воду, з випорожненнями людини і тварин, тому виявлення їх свідчить про фекальне забруднення та епідемічної небезпеки щодо кишкових інфекцій.

БГКП (ЗКБ) можна визначати двома способами: методом мембранних фільтрів і титраційним (бродильним) методом.

Визначення термотолерантних колиформних бактерій (ТКБ)

З усіх бактерій, що входять до складу БГКП, найбільше санітарно-показове значення мають мікроорганізми роду *Escherichia*. За здатністю розщеплювати лактозу за температури 37 °С з БГКП (ОКБ) прийнято виділяти Гр (-) бактерії, які здатні ферментувати лактозу за температури 44,5 °С. До них належать *E. coli*, що не росте на цитратному середовищі. Відповідно до міжнародної класифікації цю групу бактерій називають термотолерантні колиформні бактерії – ТКБ.

Число ТКБ характеризує ступінь фекального забруднення води водних об'єктів і побічно визначає епідемічну небезпеку щодо збудників кишкових інфекцій. ТКБ визначають тими ж методами, що і БГКП (ОКБ), крім останнього етапу ідентифікації, який проводиться за ферментацією лактози на напіврідкому живильному середовищі за 44,5 °С.

Визначення *E. coli*

Визначення *E. coli* є додатковим показником для розшифрування походження біологічної контамінації, визначення свіжості фекального забруднення під час оцінювання якості води в разі перевищення нормативу. Таке

дослідження проводиться під час періодичних аналізів води, а також у разі несподіваних змін основних показників – індексу ОКБ, ТКБ.

Група бактерій, умовно позначених як *E.coli*, включає лактозопозитивні кишкові палички, які ферментують лактозу до кислоти і газу за температури 43–44,5 °С в присутності інгібіторів сторонньої мікрофлори та утворюють індол за тієї ж температури. Переважно це бактерії роду *Escherichia*, але можуть бути віднесені до цієї групи і представники інших родів, що мають такі ж властивості (наприклад, *Citrobacter* та ін.). *E. coli* визначають тими ж методами: мембранних фільтрів, прямого посіву і титраційним.

Різниця – на етапі дослідження властивостей мікроорганізмів, які вирости на середовищі Ендо. Результат дослідження висловлюють кількістю *E. coli* в 1 л (Coli-індекс).

Метод прямого посіву застосовується під час визначення *E. coli* в стічних водах і сильно забруднених водоймах. На чашки із середовищем Ендо засівають по 0,1–0,5 мл проби води (по 4 дози з кожної проби), ретельно втирають шпателем і інкубують протягом 16–18 год при температурі 37 °С. Ураховують зростання характерних колоній, визначають біохімічні властивості бактерій і визначають колі-індекс, орієнтуючись за таблицею.

Визначення ентерококів

Ентерококи в останні роки привертають до себе увагу як мікроорганізми – показники фекального забруднення. Вони виявляються в навколишньому середовищі, куди потрапляють із випорожненнями людини, тварин, птахів, комах, будучи постійними мешканцями кишечника. У ґрунті та воді вони зберігаються до 6 тижнів, але не розмножуються і не змінюють свої основні біологічні властивості. Виживання ентерококів у воді наближається до виживання патогенних ентеробактерій. Вони стійкі до підвищення температури (нагрівання до 55-60 °С витримують протягом 1 год), добре переносять низьку температуру, мають значну стійкість до хлору. Все це дає право вважати ентерококи другим після кишкової палички санітарно-

показовим мікроорганізмом під час дослідження води.

Визначення ентерококів проводять методом мембранних фільтрів, титраційним, а за великого забруднення води (понад 30 бактерій на 1 мл) – методом прямого посіву.

Суть методу мембранних фільтрів полягає в концентрації ентерококів із певного обсягу води на мембранних фільтрах із наступним підрощуванням мікробів на спеціальних середовищах, ідентифікації та визначенні індексу ентерококів.

Визначення спорових сульфїтредукуючих клостридій

Сульфїтредукуючі клостридії (представник цієї групи мікроорганізмів – *Clostridium perfringens*) – спороутворювальні анаеробні паличкоподібні мікроорганізми, редукуючі сульфїт натрію на залізо-сульфїтному агарі за температури 44 °С протягом 16–18 год. Метод заснований на вирощуванні посівів у залізо-сульфїтному агарі в умовах, наближених до анаеробних, і підрахунку числа чорних колоній.

Кількісно ці мікроорганізми у воді можна визначити методом мембранної фільтрації або прямим посівом. В якості поживного середовища для виділення та підрахунку сульфїтредукуючих клостридій зазвичай використовують середовище Вільсона-Блера (залізосульфїтний агар).

Перед посівом пробу води прогрівають на водяній бані за температури (75 ± 5) °С протягом 15 хв. для виключення вегетативних форм. Досліджувану хлоровану воду можна не прогрівати. Застосовуючи метод мембранної фільтрації, пробу води певного обсягу пропускають через фільтр, який потім поміщається в пробірку з підготовленим розплавленим живильним середовищем верхньою стороною всередину (пробірка з живильним середовищем після посіву повинна бути негайно охолоджена у холодній воді, щоб уникнути попадання повітря) або у чашку Петрі на поверхню живильного середовища, яка потім заливається товстим шаром того ж живильного середовища.

Метод прямого посіву передбачає посів у стерильні пробірки 20 мл води таким чином: по 10 мл у 2 пробірки

(обсягом не менше 30 мл), або по 5 мл у 4 пробірки (обсягом не менше 15 мл).

Зверху посіви води заливають гарячим (75-80 °С) залізосульфітним агаром у кількості, що перевищує обсяг води в 2 рази. Середовище заливають по стінці пробірки, намагаючись не допустити утворення бульбашок повітря. Пробірки з посівами швидко охолоджують у склянці з холодною водою, інкубують за 44 °С протягом 24 год.

Кількісному обліку підлягають тільки ті посіви, де отримані ізольовані колонії. Підраховують чорні колонії, що виростили як на фільтрі, так і в товщі живильного середовища. Результат аналізу виражають числом колонієутворювальних одиниць (КУО) спор сульфїтредукуючих клостридій у певному обсязі води (підданій аналізу).

Визначення бактеріофагів

Присутність бактеріофагів у воді свідчить про фекальне забруднення і є індикатором або сигналом можливої присутності ентеровірусів. Тому методи визначення бактеріофагів (в т. ч. і коліфагів) включені в методичні вказівки МОЗ України та регламентовані Міжнародними стандартами (ISO 10705-1: 1995; 10705-2: 2000; 10705-3; 10705-4).

Існує кілька методів кількісного і якісного визначення бактеріофагів в воді.

Всі методи засновані на чутливості музейних культур мікроорганізмів і припускають використання таких тест-організмів (за міжнародними стандартами): мутант *Salmonella typhimurium*, непатогенний для людини; штам *Escherichia coli* K-12 Hfr з відповідної колекції культур ATCC 23631 або NTCT12486; штам *E.coli* роду CN, званий WG5; а також бактеріофаги MS2, NCTC12487 або ATCC 15597 для контролю чутливості тест-організмів.

Міжнародним стандартом регламентуються методи визначення бактріофагов РНК типу F і соматичних бактріофагів, які дозволяють визначити присутність відсутність бактеріофагів, а також дати їх кількісну оцінку (ISO 10705-1).

Бактеріофаги РНК типу F – це бактеріальні віруси, здатні інфікувати певний штам господаря за допомогою F-фімбрій або статевих фімбрій. Соматичні бактеріофаги є непатогенними для людини, проте стійкими до зовнішніх чинників, особливо до висушування.

Прямий метод виявлення бактеріофагів

Цей метод застосовується під час визначення досліджень за епідпоказаннями або в разі необхідності отримання результатів у короткі терміни.

Хід визначення. За 18-24 години перед проведенням аналізу необхідно зробити посів тест-культури *E. coli* K12 F + (Рос. гос. ін-т мед. біол. препаратів ім. Л. А. Тарасевича) на скло з поживним агаром (МПА). Перед проведенням аналізу зробити змив зі скла 5 мл стерильної водопровідної води і за стандартом мутності приготувати суспензію тест-організму в концентрації 109 бакт. клітин/мл.

Розплавити й остудити до 45 °С 2 %-й живильний агар. Досліджувану воду 100 мл внести в 5 стерильних чашок Петрі (по 20 мл в кожную). У живильне середовище додати змив *E. coli* (з розрахунку 1,5 мл на 150 мл агару) і добре перемішати. Отриманою сумішшю залити по 30 мл спочатку порожню чашку Петрі (контроль), а потім все чашки, що містять досліджувану воду. Вміст чашок перемішують обертальними рухами. Після застигання живильного середовища чашки перевертають догори дном і ставлять для інкубації в термостат за 37 °С на 18-24 год.

Облік результатів проводять шляхом підрахунку і підсумовування бляшок, які вирости на 5-ти чашках Петрі. Результати виражають у бляшко-утворювальних одиницях (БОЮ) на 100 мл. води.

У контрольній пробі бляшки мають бути відсутні.

Санітарно-мікробіологічна оцінка води

Оцінка якості води проводиться комплексно: за санітарно-мікробіологічними показниками з урахуванням органолептичних, гельмінтологічних і хімічних даних і

регламентується відповідними ГОСТами, Санітарними правилами і методичними вказівками. Безумовним показником забрудненості води є виявлення патогенних мікроорганізмів. У цьому випадку вода вважається непридатною для будь-яких цілей.

Критерії оцінки якості води розроблені диференційно залежно від категорії води і її призначення та представлені в додатку В.

Під час оцінювання питної води керуються основною вимогою: вона не повинна містити патогенні бактерії і віруси. При санітарно-бактеріологічній оцінці води колодязів виходять з того, щоб у 1 л БГКП містилося не більше 10.

Показником фекального забруднення води криниць є виявлення ентерококів. Відсутність знезараження колодязної води, можливість біологічної контамінації (опаді, просочування забруднених зливових і ґрунтових вод тощо) роблять її епідемічно небезпечною, і тому потрібен постійний контроль. У разі виявлення у воді ентерококів вона вважається непридатною до вживання, і колодязь підлягає очищенню.

Якщо під час вибору нового джерела водокористування коли-індекс води водойми перевищує 100 00 в 1 л, то проводиться додаткове дослідження на присутність *E. coli* і ентерококів як показників свіжого фекального забруднення і безпосереднє виявлення патогенних бактерій – сальмонел і шигел.

За індексом *E. coli*, ентерококів більше 1 000 в 1 л води водойми розцінюється як забруднена, причому контамінація вважається свіжою, а вода – небезпечної в епідемічною відношенні. В останні роки розроблено та запропоновано [Л. В. Григор'єва, 1975] додаткові критерії оцінки санітарного стану водойм, в які включені показники титру ентерококів, перфрингенститри індекс бактеріофагів.

Лабораторна робота № 8

Біологічний аналіз активного мулу і біоплівки

Тема: Біологічний аналіз активного мулу і біоплівки

Активний мул і біоплівка є сформованим біоценозом. До його складу входять бактерії, найпростіші, черв'яки і деякі членистоногі. Головна роль у переробці органічних сполук належить бактеріям. Найпростіші з'їдають бактерії і тонкодисперсну суспензію, чим сприяють проясненню рідини. Інші представники біоценозу також беруть участь у проясненні рідини. Постійні спостереження за ходом біологічного очищення стічних вод показали, що склад активного мулу й біоплівки свідчить про якість роботи очисних споруд.

Аеробний активний мул являє собою темно-коричневі пластівці, розміром до декількох сотень мікрометрів (70 % – живі організми і близько 30 % – тверді частинки неорганічної природи).

Зооглей – симбіоз популяцій організмів, покритий загальною слизуватою оболонкою.

Муловий індекс (MI) – це об'єм, який займає один грам активного мулу за 30 хвилин відстоювання у літровому циліндрі (оптимальне значення мулового індексу від 80 до 120 см³/г; діапазон припустимих значень – від 60 до 150 см³/г).

Характеристика мікроорганізмів активного мулу

Бактерії.

Морфологічні особливості представлені трьома основними формами: палички, коки і спірілі;

- *видовий склад* - належать переважно до родів *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Desulfotomaculum*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Sarcina* тощо. Широко представлені в активному мулі і бактерії родів *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Mycobacterium*;

- *функції* - провідна роль у процесах вилучення зі стічної рідини розчинених, колоїдних і великих органічних забруднень, адаптація біоценозу до нових умов, підтримання життєздатності активного мулу.

Водорості

Синьо-зелені (різні види *Oscillatoria*) колоніальні й одноклітинні форми – часто викликають евтрофікацію (цвітіння) водойм;

Зелені водорості (*Spirogyra crassa*, *Cladophora crispata*, *Pediastrum borianum*, *Scenedesmus quadricauda*) – відіграють значну роль у процесах як цвітіння, так і самоочищення водойм;

Діатомові водорості (*Navicula*, *Diatoma vulgare*) клітинні стінки містять кремній – служать їжею для водяних тварин, за присутності великої кількості органічних речовин переходять до гетеротрофного типу живлення й безпосередньо беруть участь у мінералізації органічних сполук.

Гриби. Зустрічаються переважно цвілеві вищі гриби, такі як *Fusarium*, *Nematosporangium* тощо, іноді нижчі гриби (*Mucor*) і дріжджі.

Масовий розвиток грибів у біофільтрі ускладнює проходження рідини через нього, а в аеротенку викликає спухання активного мулу.

Найпростіші (Protozoa) зустрічаються: саркодові (*Sarcodia*) джгутикові (*Mastigophora*), війчасті інфузорії (*Ciliata*), інфузорії, сисні (*Suctoria*) тощо.

Функції найпростіших: не беруть особистої участі у споживанні органічних речовин, але регулюють видовий і віковий склад мікроорганізмів в активному мулі, підтримуючи його на оптимальному рівні. Поглинаючи велику кількість бактерій, найпростіші сприяють виходу значної кількості бактеріальних екзоферментів, які можуть концентруватися в слизовому шарі мулу і брати участь у деструкції забруднень.

Саркодові (*Sarcodina*)

Найчастіше зустрічаються кореніжки (голі та мушлеві). Пересуваються за допомогою псевдоподій, живляться бактеріями, а також найпростішими. Виконують регуляторну та індикаторну функції. Із голих кореніжок до індикаторних організмів належать представники роду *Amoeba* і роду *Pelomyxa*.

Мушлеві коренніжки характеризуються наявністю будиночка, що складається тільки з органічної речовини або просоченого залізом, кремнієм, кальцієм. Із мушлевих амеб найчастіше зустрічаються *Arcella*, *Centropyxis* і *Pamphagus*.

Джгутикові (*Mastigophora*)

Безбарвні дрібні одноклітинні організми, на відміну від голих амеб, мають тонку оболонку. Розміри більшості з них не перевищують 10–20 мкм. Живляться бактеріями і деякими розчиненими органічними речовинами. Розвиваються у великих кількостях лише в сильно забрудненій воді. В очисних спорудах масовий їх розвиток спостерігається у пусковий період.

Інфузорії (*Ciliata*)

Мають найскладнішу будову з усіх найпростіших (мають оболонку і більш-менш постійну форму тіла; на передньому кінці розташований ротовий отвір). Характерна ознака організмів цього класу – наявність війок.

Живляться переважно бактеріями, засвоюють також колоїдні та дрібнодисперсні органічні забруднення.

Є індикаторами роботи очисних споруд (зміни концентрації органічних забруднень, рівня рН, розчиненого кисню, температури води)

Хробаки (*Vermes*)

Зазвичай присутні щетинкові (*Oligochaeta* і *Polychaeta*), круглі (*Nematoda*) і коловертки (*Rotatoria*). Коловертки – це мікроскопічні багатоклітинні тварини довжиною від 0,04 мм до 2,5 мм. Тіло їх складається з трьох відділів: голови, тулуба, ноги, але в деяких коловерток провести цей розподіл неможливо.

Коловертки дуже чутливі до зміни умов середовища, тому більшість з них можуть бути віднесені до індикаторних організмів. Масовий розвиток кожного з видів коловерток небажаний, тому що приводить до збіднення біоплівки на

живильні речовини й обмежує розвиток інших видів мікроорганізмів.

Малощетинкові хробаки (найчастіше *Aelosoma*). Це досить великий хробак, довжиною тіла від 0,1 мм до 4,5 мм (іноді до 10 мм), тіло його розділено на сегменти, між якими розташовуються щетинки. У тілі *Aelosoma* зазвичай добре помітні жовті крапельки жирових включень. Очі у вигляді досить великих червоних плям. Розвиваються в спорудах зі стійкою нітрифікацією.

Круглі хробаки (*Nematoda*) мають кругле з загостреними кінцями тіло довжиною 5–10 мм, покрите щільною оболонкою (кутикулою). Надмірний розвиток круглих хробаків відбувається за порушень режиму аерації (наявність застійних зон у біофільтрі, нерівномірна аерація із зонами відкладень у аеротенку). Одиначні екземпляри зустрічаються і за нормальної роботи споруджень.

Водяні кліщі (*Hydracarina*). Дрібні тварини довжиною менше 1 см. Тіло кулястої чи яйцеподібної форми не розділено ні на відділи, ні на сегменти. На передньому кінці тіла – очі і дві пари ротових жвал. На черевному боці 6 пар кінцівок. Щупики витягнуті вперед у вигляді хоботка з ротовим отвором на кінці. Зустрічаються в значній кількості в біоплівці. Сприяють більш повній мінералізації органічних речовин (мінералізують рештки відмерлої біоплівки, живляться найпростішими). Розпушують плівку біофільтрів, охороняючи її від ущільнення. Забезпечують більш тісний контакт плівки зі стічною рідиною. Сприяють переміщенню й виносу плівки з тіла біофільтра, мінералізуючи її.

Найважливіші фактори, що впливають на розвиток і життєздатність активного мулу і якість біологічного очищення:

- температура;
- наявність поживних речовин;
- вміст розчиненого кисню у муловій суміші;
- значення рН;
- присутність токсинів.

Технологічні характеристика активного мулу

Технологічний режим експлуатації очисних споруд залежить від:

- оптимального співвідношення між концентрацією забруднень у воді, що надходить, і робочою дозою активного мулу (за зменшення дози мулу виникає ефект підвищення навантаження і зниження якості очищення, за збільшення ускладнюється ефективність відокремлення мулу від очищеної води у вторинних відстійниках);
- необхідного часу контакту забруднень з активним мулом;
- достатньої аеробності системи.

Реакції активного мулу на зміну умов середовища Надлишкові навантаження органічними забрудненнями

- мала розмаїтість видів найпростіших за значної якісної переваги двох-трьох із них;
- зооглейні скупчення бактерій зникають, з'являється багато окремих бактеріальних клітин, як у період пуску споруд;
- іноді розвиваються в значних кількостях нитчасті бактерії *Cladotrix*, *Sphaerotilus*, *Beggiatoa*;
- пластівці мулу пухкі, окремі з них з'єднані між собою нитчастими бактеріями.

Такий мул дуже погано осідає чи взагалі не осідає, а спливає на поверхню. Вода над мулом каламутна.

Недостатній рівень концентрації розчиненого кисню

- коловертки нерухомі у витягнутому відмираючому стані;
- з'являється багато дрібних жгутикових амеб, можуть у значній кількості розвиватися сисні інфузорії;
- серед інших інфузорій майже виняткове панування одержує

Paramecium caudatum

- пластівці мулу розпадаються, колір стає білястим, він погано осідає, вода над мулом каламутна за наявності застійних зон у аеротенках і вторинних відстійниках мул набуває темного кольору, у ньому розвиваються круглі хробаки *Nematoda*.

Вплив відхилень рН середовища від норми

- зміна структури активного мулу: пластівці мулу витягуються в тяжі, мул подрібнюється, забарвлення його змінюється на більш світлі тони;

- зміна властивостей мулу: осідає погано, МІ може підвищуватися до 200-500 см³/дм³;

- зміна складу мулу: значно скорочується кількість найпростіших, при сильному закисанні середовища вони зникають зовсім, можливий інтенсивний розвиток гриба *Fusarium* (рН нижче 6,5), що викликає спухання активного мулу, інтенсивний розвиток дріжджів (рН нижче 5), що приводить до зниження ефекту очищення стічних вод.

Надлишкові навантаження органічними забрудненнями - мала розмаїтість видів найпростіших за значної якісної переваги двох-трьох з них;

Бактеріями.

Такий - зооглейні скупчення бактерій зникають, з'являється багато окремих бактеріальних клітин, як у період пуску споруджень;

- іноді розвиваються в значних кількостях нитчасті бактерії *Cladothrix*, *Sphaerotilus*, *Beggiatoa*;

- пластівці мулу пухкі, окремі пластівці з'єднані між собою нитчастими мул дуже погано осідає чи взагалі не осідає, а спливає на поверхню. Вода над мулом каламутна.

Скидання токсичних промислових стоків

- зменшення розмаїтості видів найпростіших (переважають один-два види), дрібні розміри найпростіших;

- нерухомий стан війок інфузорій;

- коловертки нерухомі, у стиснутому відмираючому стані;

- мул дрібний, забруднений включеннями промислових стоків, може мати кольорові частинки, осідає погано, вода над мулом каламутна.

Нестача поживних речовин

- дрібні розміри найпростіших і коловерток, мікроорганізми стають прозорими, травні вакуолі у них зникають;

- інфузорії і коловертки частково перетворюються на цисти;

- нестача фосфору веде до спухання активного мулу внаслідок розвитку частих бактерій;

- зооглей і пластівці мулу прозорі, вода над мулом має дрібну суспензію, що не осідає.

Вік та доза активного мулу

Зменшення середнього віку активного мулу приводить до зростання ефективності очищення: «молодий» активний мул більш пухкий, він має пластівці меншого розміру, більш низький вміст найпростіших; здатність до осідання «молодого» активного мулу в системах вторинних відстійників гірша.

У міру старіння мулу, пластівці збільшуються в розмірі, краще сорбують забруднення, більше захищені полісахаридним гелем від токсикантів, краще відокремлюються від очищеної води під час відстоювання, проте у старіючому активному мулі знижується відносна чисельність активних живих клітин і, відповідно, сила окиснення забруднень, тобто скорочується швидкість розкладання субстрату.

Високонавантажені споруди працюють на неповне очищення з віком мулу не більш 2-3 доби.

Вік мулу більш 8 діб забезпечує глибоку мінералізацію органічних речовин із наступною нітрифікацією. У низьконавантажених діяльність мулу пов'язана з нітрифікацією і великим віком мулу (6–12 діб).

Чим складнішим є склад стічних вод, тим більший вік мулу потрібний для задовільного окиснення забруднюючих речовин. Так, для обробки стічних вод виробництва

синтетичного каучуку необхідний вік мулу складає 20–30 діб, а полівінілового спирту – більш 50 діб.

У зимовий період, коли потужність біологічного окиснення знижується, аеротенкам необхідно працювати з більш високою дозою мулу. Так якщо в літній період доза мулу складала 1,2–1,5 г/дм³, то в зимовий її варто підтримувати в інтервалі від 1,6 до 2,0 г/дм³.

Якщо аеротенки працюють з регенераторами, то в них необхідно підтримувати дозу в 2-3 рази більшу, ніж у аеротенках для забезпечення глибокого доокиснення важкоокиснюваних сполук.

Навантаження на активний мул. Домогтися того чи іншого необхідного ступеня очищення води й мінералізації мулу можна шляхом зміни співвідношення кількостей забруднюючих речовин у стічній воді і працюючого в системі мулу. Величина навантаження на 1 г активного мулу за БСК різна для різних споруджень. Низькі навантаження – менше 150 мг на 1 г беззольної сухої речовини мулу; середні – 200–350 мг/г, високі – більш 400–900 мг/г.

За навантажень за БСК₅ 200–250 мг/г аеротенки працюють стабільно, забезпечуючи високу якість очищених стічних вод, за навантажень більш 400 мг/г робота споруд стає нестабільною (підвищується муловий індекс, погіршується якість очищених стічних вод), за навантажень 50–150 мг/г відбувається повна нітрифікація азоту амонійних солей до нітритів.

Розглянемо характеристику активного мулу в різних умовах.

Мул, що працює задовільно

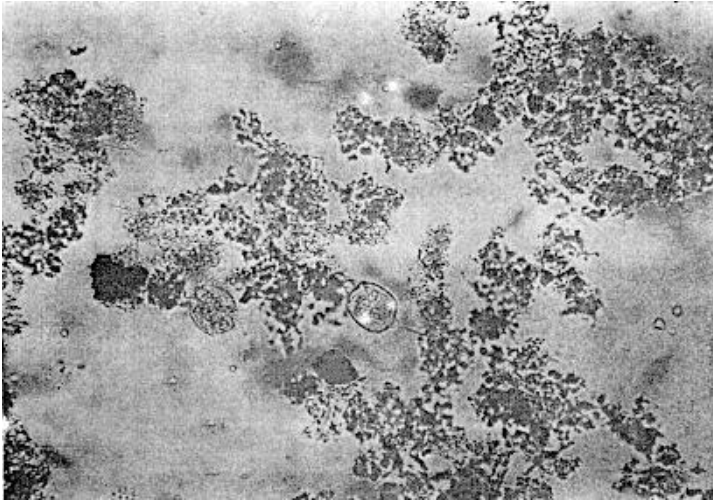


Рисунок 1. Активний мул, що працює задовільно.

Помітні *Euplotes*

У мулі, що задовільно працює, знаходяться різні найпростіші з деякою перевагою одного з видів. Іноді зустрічаються *Lionotus*, *Podophrya*, *Vorticella microstoma*, джгутикові і дрібні амеби. Постійно присутні черевовійкові та коловійкові інфузорії. Бактерії – переважно в зооглейних скупченнях. Всі організми рухливі, у жвавому стані. Пластівці мулу компактні. Мул швидко осідає, вода над ним прозора.

Голодуючий мул

У разі низької концентрації органічних речовин у стічній рідині активний мул відчуває «голодування». При цьому найпростіші поступово дрібніють, вони стають прозорими, їх харчові вакуолі зникають, інфузорії перетворюються на цисти. Коловертки утворюють цисти пізніше, ніж інфузорії. Сірка в клітинах нитчастих сіркобактерій зникає. Зооглей і пластівці мулу стають прозорими. Вода над мулом каламутна.

Нітрифікуючий мул

У разі нестачі органічного харчування і надлишку мінерального азоту, в рідині, яка очищується, може утворюватися значна кількість нітритів і нітратів. При цьому у воді у помітній кількості коловертки (*Callidina*, *Rotatoria* та інші); переважають *Peritricha* (*V.convallaria*, *Carchesium*), *Arcella*, великі амеби, буйно розвиваються *Zoogloea ramigera*. Можлива присутність у великій кількості малоцетинкових хробаків *Aelosoma*. Відсутні *Chilodon*, дрібні амеби, безбарвні джгутикові. Пластівці мулу пухкі, після осідання спливають.

Перевантажений мул

Мул містять механічні включення. Коловертки стискаються. Вортіцела має замкнутий війковий диск. У тому випадку, коли активний мул не справляється із забрудненням, що надходить, для біоценозу мулу характерна мала різноманітність видів за чисельної переваги двох-трьох із них.

Зазвичай спостерігається велика кількість безбарвних джгутикових, дрібних амеб, *Lionotus* або дрібних інфузорій. Іноді в помітній кількості присутні *Podophrya*, *Chilodon*, *Nematodes*, *V.microstoma*, *Opercularia* і нитчасті бактерії. Іл забруднений різними вкрапленнями: органічними аморфними частинками, сміттям. Пластівці мулу темні, густі. Вода над мулом із опалесценцією.

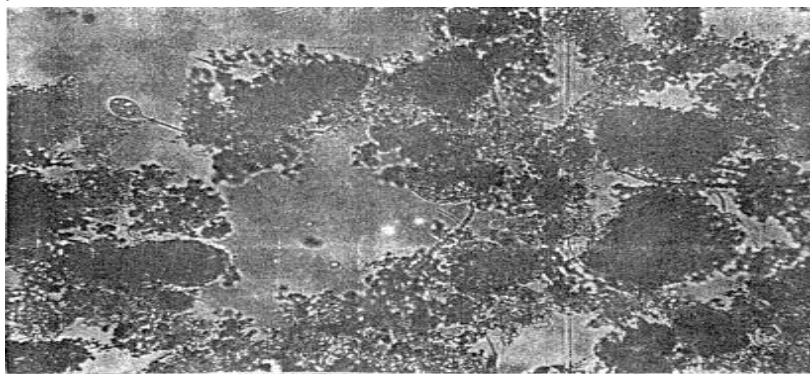


Рисунок 6.2 – Активний мул за значного перевантаження

Мул за зміни складу стічної води

Спостерігається збільшення кількості джгутикових; перетворення найпростіших на цисти; загибель коловерток у стислому стані; зменшується кількість нитчастих, які в подальшому можуть знову з'являтися.

Мул неадаптований

Зменшується кількість видів, один-два мають перевагу. Гідробіонти дрібнішають, особливо *Vorticella convallaria*, *Opercularia*, *Carchesium*. Загальна кількість зростає, або значно зменшується залежно від ступеня токсичності води. Війки інфузорій нерухомі, війковий диск оперкулярій замкнутий. Мул подрібнений, забруднений вкрапленнями промислових стоків, має пофарбовані частинки, погано осідає. Вода над мулом каламутна.

Мул за нестачі кисню

У разі нестачі кисню вортицели відриваються від стебла й утворюють особливу форму, що вільно плаває, з вінцем війок на задньому кінці. За подальшого зниження концентрації кисню з'являються особини вортицел, роздуті до круглої форми, які потім лопаються. *Opercularia* із замкнутим війковим диском, дрібні, нерухомі. Коловертки – задубілі у витягнутому стані або відмирають. У великій кількості з'являються джгутикові; з інфузорій переважають *Paramecium caudatum*, тому що вони більш стійкі до нестачі кисню і здатні розвиватися навіть у мулі, що гниє, його пластівці при цьому розпадаються. Вода над мулом стає каламутною.

Мул, що спухає

Масовий розвиток нитчастих бактерій і грибів витісняє зооглейні скупчення, що призводить до поганого осідання активного мулу й виносу його з вторинного відстійника. Очищення при цьому погіршується. Незважаючи на те, що нитчасті бактерії і гриби є гарними мінералізаторами, побічні явища, викликані їх масовим розвитком, знижують ефект очищення.



Рисунок 6.3 – Активний мул, що спухає

Мул із регенератора

За умови задовільної регенерації спостерігається кількісна перевага *Peritricha* (*Carchesium*, *Vorticella convallaria*, *Opercularia*) перед інфузоріями, що вільно плавають. Збільшення кількості організмів *Peritricha* і зооглею порівняно з мулом у аеротенках. Організми рухливі. Пластівці мулу великі, добре осідають. Вода над мулом прозора.

За глибокої регенерації переважають великі інфузорії, що вільно плавають. Збільшуються розміри *Vorticella* і *Opercularia*. Пластівці мулу розпадаються на більш дрібні частинки. Вода над мулом каламутна, частинки не осідають.

Біоплівка

На відміну від активного мулу біоценоз біоплівки має значно більшу різноманітність форм гідробіонтів. За постійного очищення води в біофільтрі змінюється біоценоз біоплівки і спостерігається зміна зон сапробності.

У верхньому горизонті біофільтра створюються умови для полісапробної або альфа-мезосапробної зон. У біоплівці переважають гриби, різні бактерії, особливо багато нитчастих. Із найпростіших переважають безбарвні джгутикові (роди *Oicomonas* і *Vodo*) й інфузорії, що вільно плавають, загони

рівновійкових, особливо *Paramecium*, із коловійкових інфузорій тільки *Opercularia*. У біофільтрі іноді спостерігаються представники зелених водоростей і джгутикових: *Selensastrum* і *Peranema*. Із черв'яків у незначній кількості зустрічаються коловертки і круглі.

Під час проходження рідини через біофільтр у біоплівці зменшується кількість бактерій, грибів і безбарвних джгутикових.

Збільшується кількість великих черевовійчастих інфузорій, що вільно плавають, з'являються різноманітні прикріплені інфузорії, збільшується кількість коловерток і круглих хробаків. У біоплівці переважають форми, властиві мезосапробній зоні.

Експериментальна частина

Відбір проб для мікроскопування:

1. Активний мул.
2. З аеротенків відбирається мулова рідина в пробірку в кількості 7–10 мл. Мул відстоюванням відділяється від рідини (2-3 хвилини) і потім піпеткою із широким отвором відбирається для мікроскопування;
3. Біоплівка.

Із різних горизонтів біофільтра відбирається засипний матеріал (шлак, щебінь, керамзит тощо), поміщається в порцелянову чашку і заливається невеликою кількістю дистильованої води. Із засипного матеріалу плівку необхідно зчищати препарувальними голками. Для мікроскопування біоплівку відбирають піпеткою з широким отвором.

Послідовність опису активного мулу і біоплівки

1. Швидкість осідання мулу (швидко, повільно).
 2. Колір мулу (бурий, чорний, білуватий тощо).
 3. Вода над мулом (прозора, каламутна, пофарбована).
 4. Подальший опис ведуть при мікроскопуванні. Необхідно переглянути не менше 10 полів зору. Щільність і розмір пластівців (щільні, подрібнені, великі, дрібні).
1. Присутність сторонніх краплень.
 2. Склад гідробіонтів. Кількість гідробіонтів за

п'ятибальною системою(див. нижче).

3. Наявність грибів і нитчастих бактерій.
4. Наявність бактерій, що вільно плавають (багато, мало).
5. Форми бактерій, які переважають (дрібні палички, великі палички, спірили тощо).
6. Пункти 4–7 описуються за малого збільшення (об'єktiv 8 x 10), а 8 і 9 – при великому збільшенні (об'єktiv x 40).
7. Кількість організмів оцінюється за п'ятибальною системою хрестиками: 1 – одиничне знаходження, 2 – мало, 3 – порядно, 4 – багато, 5 – масовий розвиток. Відзначається також стан організмів, їх рухливість.

Рекомендована література

1. Антипчук А. Ф., Кіреєва І. Ю. Водна мікробіологія : навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів. К. : Кондор, 2005. 256 с.
2. Антипчук А. Ф. Микробиология рыбоводных прудов. М. : Легкая и пищевая промышленность, 1983.
3. Антипчук А. Ф. Микробиологический контроль в прудовых хозяйствах. М. : Пищевая промышленность, 1979.
4. Вербина Н. М. Гидромикробиология с основами общей микробиологии. М. : Пищевая промышленность, 1980.
5. Бондар І. В., Гуляєв В. М. Промислова мікробіологія. Харчова і агро-біотехнологія : навчальний посібник. Дніпродзержинськ : Дніпродзержинський державний технічний університет, 2004. 280 с.
6. Рудавська Г. Б., Демкевич Л. І. Мікробіологія : підручник. К. : Київський національний торгорово-економічний університет, 2005. 406 с.
7. Гудзь С. П., Гнатуш С. О., Яворська Г. В. Практикум з мікробіології : підручник для студентів вищих навчальних закладів. Львів : ЛНУ імені Івана Франка, 2014. 436 с.