

**Міністерство освіти і науки, молоді та спорту України**  
**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ**  
**«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ»**

# **ОСНОВИ МІКРОБІОЛОГІЇ**

**МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ**

до проведення практичних (семінарських) занять

та до виконання самостійної роботи

**Київ–2012**

**Міністерство освіти і науки, молоді та спорту України**  
**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ**  
**«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ»**

**Інженерно-хімічний факультет**

Кафедра екології та технології рослинних полімерів

**МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ**

**до проведення практичних (семінарських) занять**

**та виконання самостійної роботи з курсу**

**„ОСНОВИ МІКРОБІОЛОГІЇ”**

для студентів напряму підготовки: 6.040106

«Екологія, охорона навколишнього середовища

та збалансоване природокористування»

*Рекомендовано Вченою радою  
інженерно-хімічного факультету НТУУ «КПІ»*

Протокол № 10 від 24 грудня 2012 р.

Київ  
НТУУ «КПІ»  
2012

Методичні вказівки до проведення практичних (семінарських) занять та до виконання самостійної роботи з курсу «Основи мікробіології» для студентів напряму підготовки 6.040106 «Екологія, охорона навколишнього середовища та збалансоване природокористування» / Укл. В.В. Вембер – 2012. – 85 с.

Укладач *В.В. Вембер, к.б.н., с.н.с.*

Відповідальний редактор *М.Д. Гомеля, д.т.н., проф.*

Рецензент *Т.С. Тодосійчук, к.т.н., доц.*

## Зміст

Вступ .....	4
Загальні методичні вказівки .....	5
Етапи самостійної підготовки студента до семінару.....	5
Тематика семінарських занять .....	8
<b>Практична 1.</b> Положення мікроорганізмів у природі.....	8
<b>Практична 2.</b> Відношення мікроорганізмів до екстремальних факторів середовища .....	16
<b>Практична 3.</b> Фізіологічні групи мікроорганізмів. Біотичні взаємодії мікроорганізмів.....	26
<b>Практична 4.</b> Ростові процеси мікроорганізмів.....	31
<b>Практична 5.</b> Мікрофлора води та її роль в процесах самоочищення .....	39
<b>Практична 6.</b> Мікрофлора ґрунту та її роль в процесах самоочищення .....	47
<b>Практична 7.</b> Мікробний розклад природних речовин та синтетичних сполук .....	59
<b>Практична 8.</b> Мікробні біотехнології.....	70
Методика проведення розрахунків при мікробіологічному аналізі та санітарному аналізі води.....	78
Список рекомендованої літератури .....	81
Додаток А.....	82
Додаток Б .....	85

## ВСТУП

Мікробіологія в наш час належить до ключових біологічних дисциплін, оскільки без знання особливостей мікроорганізмів та стратегій їхнього виживання неможливо зрозуміти усього різноманіття проявів життя на Землі, умов його розвитку та еволюції, структури біосфери та її функцій, кругообігів речовини та енергії. Велике значення мікробіологія відіграла для становлення та розвитку таких наук як біохімія, молекулярна біологія, генетика, біофізика та біотехнологія.

Особливого значення мікробіологія та мікробіологічні методи дослідження набувають при вирішенні саме екологічних проблем. На сьогоднішній день активно розробляються та впроваджуються способи раціонального використання біохімічної активності мікроорганізмів для підвищення родючості ґрунтів, використання корисних копалин, відновлення енергетичних ресурсів. Можливості ж мікроорганізмів щодо очистки оточуючого середовища від різноманітних забруднюючих речовин та ксенобіотиків широко використовуються та мають високий потенціал для екологізації існуючих процесів та технологій.

Таким чином, коло проблем, що потребує поглибленого вивчення властивостей мікроорганізмів та мікробіологічних методів є досить широким, саме тому знання основ мікробіології є обов'язковою умовою підготовки фахівців-екологів.

Дисципліна «Основи мікробіології» має забезпечити засвоєння студентами основ мікробіології як науки, що вивчає участь мікроорганізмів у процесах формування якості природного середовища, їх роль як деструкторів органічних сполук природного і антропогенного походження та участь у кругообігу елементів на Землі. Студенти мають ознайомитися з перспективами використання мікроорганізмів для захисту довкілля та господарських потреб.

## ЗАГАЛЬНІ МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

Однією з найважливіших і найбільш активних дійових форм засвоєння усіх предметів є семінарські і практичні заняття.

В сучасних умовах перед вищою школою України стоять великі і складні завдання щодо підвищення якості підготовки спеціалістів-екологів. В цьому плані роль семінарських і практичних занять, які вчать студентів самостійно працювати, творчо мислити, робити висновки, давати оцінку явищам і подіям, ще більше зростає.

План семінарського заняття включає тему, мету, ключові питання для розгляду і необхідну літературу. Основою для підготовки кожного семінару є не лише підручники, але й наукова та науково-популярна періодика, довідники та атласи і т.п. Не слід нехтувати також Інтернет-ресурсами, але до їх вибору слід підходити зважено, не користуючись сумнівною та неперевіреною інформацією, яка може виявитись недостовірною. Саме такий всебічний підхід до висвітлення теми заняття дає можливість опанувати зміст найважливіших мікробіологічних процесів та технік, засвоїти основні мікробіологічні терміни та вивчити родові (видові) назви мікроорганізмів, за допомогою яких можна вирішувати ті або інші проблеми прикладної екології.

### **Етапи самостійної підготовки студента до семінару:**

Прочитайте конспект лекції та теоретичні матеріали, які наведені у відповідному розділі методичних вказівок. Зверніть увагу на те, що в методичних вказівках не надається готової відповіді на поставлені в плані семінару запитання. Тут наводяться лише загальні теоретичні відомості та інформація, які можуть допомогти Вам в процесі самостійної підготовки. Вони уточнюють рамки кожної теми, суть поставлених питань і проблем, послідовність розгляду матеріалу. У них вказуються питання, на які слід

звернути особливу увагу, проблеми, що вимагають самостійного аналізу і оцінки і т.п.

У відповідності з планом семінару вивчіть необхідний теоретичний матеріал. Необхідно мати спеціальний зошит для підготовки до семінарських занять. У ньому слід робити стислий конспект вивченого матеріалу, тези виступів та доповідей, формулювати можливі запитання та заперечення, які можуть бути використані в дискусіях. Конспектувати підручник, переписувати повністю матеріал не вимагається. Корисно також навчитися групувати матеріали, що наводяться у відповіді (доповіді), за логічними ознаками, які в кожному конкретному випадку студент має визначити самостійно.

З багатьох тем семінарських занять передбачені завдання для самостійної роботи: відповіді на запитання, складання таблиць, схем і т.п. Приступати до їх виконання слід лише після завершення підготовки до семінарського заняття, коли повністю з'ясована як тема в цілому, так і її вузлові питання.

У процесі семінарського заняття можливі різноманітні форми роботи: міні-повідомлення, доповіді, дискусії і т.д., тобто кожна тема розкривається не одним доповідачем, а групою студентів. Після розгляду кожного питання підводяться підсумки, впродовж яких викладач аналізує якість підготованого студентами матеріалу, вказує на допущені у відповідях і виступах помилки, допомагає у правильному формулюванні окремих поставлених питань, вирішенні спірних проблем. Отже, семінар повинен бути активним, творчим заняттям, де студенти вчаться користуватися отриманими теоретичними знаннями, формулювати і обґрунтовувати свої думки, чітко аргументувати відповіді, захищати і відстоювати свою думку у науковій дискусії. Відповіді на основні питання, а також суттєві доповнення і виступи студентів оцінюються викладачем у відповідності до Рейтингової системи оцінювання.

Відповідь бажано розпочати з короткого вступу, в якому окреслити актуальність питання, що розглядається та сучасний стан його вирішення, тезово описати основні моменти, про які йтиме мова у виступі. В подальшому слід рухатись від «загального» до «конкретного», починаючи з теоретичних основ, фактів та визначень, та доповнюючи ці дані необхідними прикладами, порівняльним аналізом, поясненнями. Закінчувати виступ слід висновками. Бажано, проаналізувавши та порівнявши точки зору, які панують на сьогоднішній день в науці, висловити свою власну думку відносно даної проблеми.

Отже, в процесі семінарських занять студенти закріплюють знання термінів та понять, які використовуються в сучасній мікробіології, опановують видові та родові назви найбільш важливих з екологічної та біотехнологічної точки зору мікроорганізмів; розглядають шляхи перетворення мікроорганізмами стійких до біорозкладу органічних сполук і мікробну деградацію ксенобіотиків.

Програма курсу “Основи мікробіології” для студентів напряму підготовки 6.040106 “Екологія, охорона навколишнього середовища та збалансоване природокористування” відводить на практичні заняття 18 годин, а на самостійну роботу – 99 годин. Основними елементами даного виду активності є: читання наукової літератури та учбових посібників; аналіз біотехнологічних процесів та процесів, які відбуваються в очисних спорудах, з екологічних позицій та з врахуванням основ мікробіології; отримання практичних навичок при виконанні розрахунків, які необхідні для проведення санітарного аналізу води та ґрунтів; підготовка повідомлень, виступів, доповідей; участь в обговореннях дискусійних питань.



## ТЕМАТИКА СЕМІНАРСЬКИХ ЗАНЯТЬ

### **Практична 1**      **Положення мікроорганізмів у природі** (2 год.)

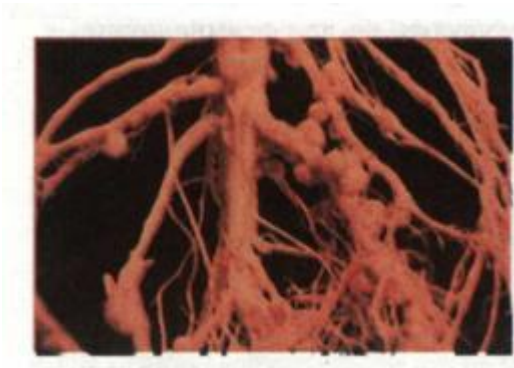
**Мета заняття:** ознайомитись з функціями, які мікроорганізми виконують в природних екосистемах та з можливостями використання останніх в сучасних біотехнологіях та технологіях, пов'язаних з охороною довкілля.

#### **План семінару:**

- ü Мікроорганізми в житті людини.
- ü Використання мікроорганізмів в народному господарстві.
- ü Зв'язок мікробіології та екології.

#### **Загальні теоретичні відомості**

Існування життя на нашій планеті багато в чому залежить від мікроорганізмів. Провідну роль у забезпеченні родючості ґрунту відіграють бактерії та мікроскопічні гриби. Вони розкладають органічні речовини до неорганічних, які споживають рослини. Бактерії також створюють органічну речовину ґрунту. Азотфіксуючі бактерії та ціанобактерії здатні фіксувати азот повітря. Тим самим вони повертають його в ґрунт. А одна з таких груп – бульбочкові бактерії – оселяється на коренях деяких рослин (рис. 1). Бактерії ґрунту та водойм слугують їжею дрібним тваринам. Споживаючи органічні речовини, бактерії забезпечують очищення водойм. Утворення нафти, природного газу, покладів залізних руд також відбувалося за участю певних бактерій.



***Рис. 1. Бульбочкові бактерії на коренях рослин***

### **Бактерії в житті людини: природний захист організму**

Бактерії та ціанобактерії можуть оселятися в організмах інших істот. Між ними та організмом хазяїна виникають різні типи взаємозв'язків. Взаємокорисні – мутуалістичні – зв'язки виникають між бульбочковими бактеріями та бобовими рослинами. А в кишечнику людини живуть бактерії (наприклад, кишкова паличка), які сприяють процесам травлення, синтезують деякі вітаміни та перешкоджають діяльності хвороботворних мікроорганізмів (рис. 2). У разі надмірного застосування антибіотиків ці корисні бактерії гинуть, що погано впливає на здоров'я. Сама ж кишкова паличка в кишечнику людини постійно забезпечена поживними речовинами.



***Рис. 2. Кишкова паличка – Escherichia coli***

У шлунку корів, овець, кіз, у кишечнику коней також живуть бактерії. Ці тварини споживають багату на клітковину рослинну їжу, але самостійно її перетравлювати не здатні. Цю функцію здійснюють бактерії. Отже, таке співжиття бактерій та травоядних тварин взаємовигідне: бактерії допомагають тваринам перетравлювати та засвоювати їжу. З іншого боку, вони самі забезпечені поживними речовинами та захищені від несприятливих впливів довкілля.

Проте не всі бактерії, які мешкають в організмі інших істот, приносять користь. Серед них є багато паразитичних видів. У людини бактерії спричиняють такі захворювання, як дифтерія, туберкульоз, ангіна, холера, дизентерія, тиф, чума, скарлатина, правець та багато інших. Свійські тварини можуть хворіти на сибірку, бруцельоз. Ці захворювання часто супроводжуються підвищенням температури, погіршенням самопочуття і потребують негайного лікування. Бактерії можуть спричинювати різноманітні захворювання рослин, на уражених органах яких з'являються плями, пухлини тощо, вони зрештою загнивають і відмирають.

В іншу істоту бактерії можуть проникати разом із їжею, водою, повітрям, через покриви тіла. Одним із найпоширеніших шляхів проникнення бактерій в організм людини є повітряно-краплинний. Під час кашлю та чхання хворих людей у повітря разом із дрібними краплинками рідини (слизу, слини) потрапляють мільйони бактеріальних клітин. Якщо поруч із хворою людиною перебуває здорова, клітини бактерій можуть потрапити до неї через органи дихання і спричинити захворювання. Деякі хвороботворні бактерії, наприклад лептоспіри, можуть потрапити в організм людини з водою. Це може статися під час купання у стоячих водоймах, забруднених органікою, або коли пити сиру воду з цих водойм. Лептоспіри з течією крові проникають у печінку, нирки та порушують роботу цих органів, спричинюючи крововиливи.

Хвороботворні бактерії можуть потрапляти в організм людини або тварини під час укусу кровосисних комах або кліщів. Так, збудника чуми переносять блохи, а висипного тифу – воші.

Щоб запобігти поширенню хвороботворних бактерій, хворих людей та тварин потрібно ізолювати від здорових до моменту одужання. Ці заходи мають назву карантин. Інші заходи – це профілактичні щеплення, наприклад проти дифтерії, правця. У такому разі в організм людини чи тварини вводять убитих або послаблених збудників захворювання. Унаслідок цього в організмі формуються захисні реакції, які забезпечують несприйнятність до збудників захворювання впродовж тривалого часу або навіть усього життя.

В організмі тварин існує кілька «ліній оборони» проти патогенних мікроорганізмів. Найголовніші з них утворюються завдяки активності лейкоцитів, а також інших ланок імунного захисту. Імунна система дуже складна і існує тільки у хребетних. Якщо в кров тварини проникає чужорідний білок або високомолекулярний вуглевод, то він стає антигеном, тобто речовиною, що стимулює вироблення організмом антитіл. Антитіло – це білок, який пов'язує, тобто інактивує, специфічний для нього антиген, часто викликаючи його преципітацію (осадження) та видалення з крові. Кожному антигену відповідає строго певне антитіло.

Бактерії, як правило, теж викликають утворення антитіл, які стимулюють лізис, тобто руйнування, їх клітин і роблять їх більш доступними для фагоцитозу. Часто можна заздалегідь імунізувати індивіда, підвищивши його природну опірність бактеріальній інфекції.

Крім «гуморального імунітету», що забезпечує кров антитілами, існує імунітет «клітинний», пов'язаний зі спеціалізованими білими кров'яними тільцями, так званими Т-клітинами, які вбивають бактерії при прямому контакті з ними і за допомогою токсичних речовин. Т-клітини потрібні і для активації макрофагів – білих кров'яних тілець, які також знищують бактерії.

Щоб підвищити стійкість організму до збудників захворювань, слід регулярно вживати вітаміни, загартовуватися, споживати лише кип'ячену воду, правильно кулінарно оброблені харчові продукти, дотримуватись особистої гігієни.

### **Бактерії в житті людини: промисловість**

Враховуючи різноманітність каталізованих бактеріями хімічних реакцій, не дивно, що вони широко використовуються у виробництві, в ряді випадків – з сивої давнини. Славу таких мікроскопічних помічників людини прокаріоти ділять з грибами, в першу чергу – дріжджами, які забезпечують більшу частину процесів спиртового бродіння, наприклад при виготовленні вина і пива; використовуються для випікання хліба.

### **Як людина використовує мікроорганізми у своєму господарстві?**

З давніх-давен людина використовує здатність деяких бактерій спричиняти бродіння. За участі таких бактерій отримують кисломолочні продукти (кефір, сири, йогурти тощо), оцтову, масляну кислоти тощо. Застосовують певні групи бактерій і в мікробіологічній промисловості для отримання антибіотиків, вітамінів та деяких інших речовин. У сільському господарстві їх використовують для силосування зелених кормів для тварин. Здатність бактерій розкласти органічні рештки людина використовує для очищення забруднених водойм, а також побутових і промислових стоків. Крім того, підраховуючи кількість бактерій у воді, людина може визначити ступінь забрудненості водойми. Цей метод називають біологічною індикацією.

За допомогою бактерій людина бореться зі шкідниками сільського та лісового господарств. Створені особливі бактеріальні препарати, які вражають лише певні шкідливі види і не зачіпають корисні.

Зараз, коли стало можливим вводити в бактерії корисні гени, примушуючи їх синтезувати цінні речовини, наприклад інсулін, промислове застосування цих живих лабораторій отримало новий потужний стимул.

### **Харчова промисловість**

В даний час бактерії застосовуються цією галуззю в основному для виробництва сирів, інших кисломолочних продуктів і оцту. Головні хімічні реакції тут – утворення кислот. Так, при отриманні оцту бактерії роду *Acetobacter* окислюють етиловий спирт, що міститься в сидрі або інших рідинах, до оцтової кислоти. Аналогічні процеси відбуваються при квашенні капусти: анаеробні бактерії зброджують цукор, що містяться в листках цієї рослини, до молочної кислоти, а також оцтової кислоти і різних спиртів.

### **Якої шкоди бактерії можуть завдавати людині?**

Багато бактерій можуть не лише бути корисними, а й завдавати людині значної шкоди: псувати продукти харчування, різноманітні вироби тощо. Оселяючись у харчових продуктах, бактерії виробляють шкідливі речовини, які можуть отруїти організм людини або тварини. Наприклад, паличка ботулізму може розмножуватись у м'ясних та рослинних консервах. Тому під час консервування необхідно суворо дотримуватися технології цього процесу.



**Рис. 3. «Цвітіння» води**

Улітку поверхня води неглибоких водойм, які добре прогріваються, часто вкрита зеленкувато-сизуватою плівкою (мал. 218). Це явище дістало назву «цвітіння» води. Воно зумовлене масовим розмноженням ціанобактерій. Виділяючи отруйні речовини, вони можуть спричинювати загибель мешканців водойм. Вода з таких водойм непридатна для пиття, а купання в ній може спричинити різні захворювання чи алергічні реакції.

### **Вилуговування руд**

Бактерії застосовуються для вилуговування бідних руд, тобто переведення з них у розчин солей цінних металів, в першу чергу міді (Cu) та урану (U). Приклад – переробка халькопіриту, або мідного колчедану ( $\text{CuFeS}_2$ ). Купи цієї руди періодично поливають водою, в якій присутні хемолітотрофні бактерії роду *Thiobacillus*. У процесі своєї життєдіяльності вони окислюють сірку (S), утворюючи розчинні сульфати міді і заліза:  $\text{CuFeS}_2 + 4\text{O}_2 = \text{CuSO}_4 + \text{FeSO}_4$ . Такі технології значно спрощують отримання з руд цінних металів, в принципі, вони еквівалентні процесам, що протікають в природі при вивітрюванні гірських порід.

### **Переробка відходів**

Бактерії служать також для перетворення відходів, наприклад стічних вод, в менш небезпечні або навіть корисні продукти. Стічні води – одна з гострих проблем сучасного людства. Їх повна мінералізація вимагає величезних кількостей кисню, і в звичайних водоймах, куди прийнято скидати ці відходи, його для їх «знешкодження» вже не вистачає. Рішення полягає в додатковій аерації стоків в спеціальних басейнах (аеротенках): в результаті бактеріям-мінералізатором вистачає кисню для повного розкладання органіки, і вода очищується до нормальних показників. Нерозчинний осад, що утворюється, можна піддати анаеробному бродінню.

## **Бактерії в житті людини: інші шляхи використання**

До інших важливих областей промислового застосування бактерій відноситься, наприклад, мочка льону, тобто відділення його прядильних волокон від інших частин рослини, а також виробництво антибіотиків, зокрема стрептоміцину (бактеріями роду *Streptomyces*).

## **Підсумки**

Важлива роль мікроорганізмів у природі полягає в забезпеченні родючості ґрунтів, очищенні водойм, утворенні покладів залізних руд, родовищ нафти, природного газу тощо. Оселяючись в тілах живих організмів, одні види бактерій спричиняють різноманітні захворювання, інші, навпаки, можуть приносити користь.

*Завдання для самостійної роботи:*

- 1) Опишіть роль бактерій у процесах ґрунтоутворення?
- 2) Які можливі варіанти взаємозв'язків бактерій з іншими організмами?
- 3) Які захворювання людини та тварин спричиняють бактерії?
- 4) Як убезпечити себе від бактеріальних захворювань?

*Поміркуйте:*

Чому життя на Землі без прокаріотів було б неможливе?



## **Практична 2    Відношення мікроорганізмів до екстремальних факторів середовища** (2 год.)

**Мета заняття:** визначити різноманітні аспекти впливу факторів зовнішнього середовища на мікроорганізми. З'ясувати значення окремих екологічних факторів для мікроорганізмів, їхньої метаболічної активності та охарактеризувати адаптації, які виникають внаслідок дії екстремальних факторів.

### **План семінару:**

- Ї Сійкість мікроорганізмів до фізичних факторів впливу:
  - a. Ріст мікроорганізмів в залежності від вмісту води. Сійкість культур до висушування. Ліофілізація.
  - b. Вплив температури на мікроорганізми. Психрофіли, мезофіли, термофіли. Термостійкість.
  - c. Вплив різних видів випромінювань на мікроорганізми. Сійкість культур до УФ-променів, іонізуючого випромінювання та ультразвуку. Фотореактивація.
  - d. Осмотичний тиск. Особливості галофілів та осмофілів. Слабкі, помірні та екстремальні галофіли. Галотолерантні форми.
  - e. Вплив гідростатичного тиску.
- Ї Сійкість мікроорганізмів до хімічних факторів:
  - a. Значення рН середовища та його вплив на культури. Алкалофільні, ацидофільні, кислотостійкі мікроорганізми,
  - b. окисно-відновний потенціал середовища,
  - c. різноманітні хімічні речовини. Мікробоцидний та мікробостатичний ефекти. Важливі хіміотерапевтичні препарати. Мутагени.

## **Загальні теоретичні відомості**

Умови довкілля мають велике значення для життєдіяльності мікроорганізмів. Чим сприятливіші вони, тим інтенсивніше розвиваються мікроби, і навпаки. Надлишок або брак вологи, низька або висока температура, освітлення, радіоактивне випромінювання, наявність поживних речовин, тощо, зумовлюють відповідний темп розвитку мікробної клітини. Розвиваючись у певних умовах довкілля прокаріоти пристосовуються до них. Цим і пояснюється той факт, що в південних широтах бактерії можуть добре розвиватися при підвищеній температурі, у північних – при пониженій, галофільні мікроорганізми – у водоймищах з високим вмістом солей.

Усі чинники зовнішнього середовища, які впливають на розвиток прокаріотів, можна розподілити на три основні групи: фізичні, хімічні і біологічні. До фізичних факторів належать: волога, температура, концентрація розчинених речовин, світло та інші форми променистої енергії, радіохвилі, ультразвук. Серед хімічних чинників розрізняють рН середовища, отруйні речовини, кисень тощо. До біологічних належать різного типу взаємозв'язки і взаємовідношення між бактеріями, а також між ними та іншими організмами довкілля (симбіоз, метабіоз, коменсалізм, синергізм, антагонізм, паразитизм тощо).

### **Фізичні фактори**

**Волога.** Активна життєдіяльність бактерій можлива лише в умовах достатнього зволоження. Надходження поживних речовин у клітину та виділення продуктів обміну в зовнішнє середовище можливі тільки при достатньому вмісті води. Найменша кількість води, при якій ще можливий розвиток прокаріотів, становить 20-30% загальної маси організму. Менш вимогливі до умов зволоження цвілеві гриби. Вони можуть розвиватися

навіть тоді, коли вміст вологи в субстраті дорівнює 10-15%. Більшість мікробів витримують висушування непогано. Наприклад, туберкульозні палички після висушування зберігають свою життєздатність протягом кількох місяців, а спори сибірки – упродовж 10 років. Молочнокислі бактерії і дріжджові гриби зберігають життєздатність після висушування протягом кількох років. Ця властивість мікробів широко використовується, наприклад, для отримання сухих заквасок, які застосовуються при виготовленні різних молочнокислих продуктів тощо, а також для зберігання музейних мікробів. При цьому культури піддаються заморожуванню в умовах вакууму (ліофілізація).

**Температура.** Мікроорганізми не регулюють температуру свого тіла, а тому існування їх визначається температурою оточуючого середовища. Розрізняють три основні температурні зони, які мають вирішальне значення для розвитку бактерій: мінімум, оптимум і максимум. Найменша температура, при якій можуть розвиватися дані мікроби, називається мінімальною. Найвища температура, при якій ці самі організми ще можуть жити, називається максимальною. Між двома крайніми точками є температура, при якій прокаріоти розвиваються найкраще. Така температура дістала назву оптимальної. Ці точки, хоча і є характерними для кожного виду мікроба, але вони можуть змінюватися під впливом інших чинників зовнішнього середовища.

Щодо температурних умов, усі мікроорганізми прийнято поділяти на три групи: психрофіли, мезофіли, термофіли. **Психрофіли** – холодолюбні мікроби. Мінімальні температури для них знаходяться у межах від -10 до 0<sup>0</sup>С, оптимальні – від 10 до 15 <sup>0</sup>С і максимальні – близько 30 <sup>0</sup>С. Психрофіли живуть у ґрунтах полярних країн, холодних морях і океанах, льодах, на заморожених продуктах тощо.

**Мезофіли** – мікроорганізми, мінімальні температури для яких перебувають у межах від 0 до 10 <sup>0</sup>С, оптимальні – близько 25-35 <sup>0</sup>С,

максимальні – 40-50 °С. До них належать більшість сапрофітних і патогенних мікроорганізмів, наприклад, кишкова паличка, протей, стафілокок та інші.

**Термофіли** – група теплолюбних мікробів, які можуть розвиватися при відносно високих температурах. Природа термофілії досі вивчена лише в загальних рисах. Висловлюються припущення, що ліпіди відіграють певну роль у молекулярних механізмах термофілії, сприяючи термостабільності мембран, і що нижня температурна межа росту термофілів визначається температурою плавлення мембранних ліпідів. За іншою гіпотезою, визначальна роль у термофіла належить ферментним білкам, а саме: основні температурні точки термофілів залежать від конформації одного або декількох основних ферментів. Деякі вчені поділяють твердження, згідно з яким термофілія зумовлюється термостабільністю структурних компонентів клітин термофілів.

Зниження температури нижче оптимальної не так згубно впливає на прокариотів, як її підвищення понад максимальну. На явищі впливу високих температур ґрунтуються поширені способи знезараження продовольчих продуктів, поживних середовищ, посуду та інструментів.

Вони дістали назву пастеризації і стерилізації. Низькі температури мікроби витримують порівняно легко. Наприклад, деякі види бактерій не втрачають життєздатності навіть при температурі рідкого водню (-253 °С). При дії низьких температур прокариоти можуть впадати в анабіотичний стан, зберігаючи тривалий час свою життєдіяльність. Низькі температури широко використовуються для зберігання різних продуктів, які швидко псуються. Використовують два способи зберігання продуктів на холоді: в охолодженому стані при температурі від 10 °С до -2 °С і в замороженому стані при температурі від -12 до -30 °С.

**Випромінювання.** Пряме сонячне світло шкідливо впливає на більшість видів бактерій. Тільки фототрофні мікроорганізми витримують вплив сонячної радіації порівняно легко. Вплив різних видів випромінювання на прокаріотів залежить від довжини хвилі, а також інтенсивності і тривалості випромінювання. Променева енергія поширюється в просторі у вигляді електромагнітних хвиль. Це можуть бути радіохвилі, видимі, інфрачервоні й ультрафіолетові світлові промені, іонізуючі промені – рентгенівські і космічні промені, а також випромінювання, які виникають при ядерних реакціях. Найбільшою довжиною характеризуються радіохвилі. Вони не викликають біологічного ефекту. Дещо меншу довжину хвилі мають інфрачервоні промені. При поглинанні живим організмом вони перетворюються на тепло. Видиме світло, з довжиною хвилі від 300 до 800 нм, поглинається фотосинтезуючими прокаріотами і перетворюється на хімічну енергію. Цей вид випромінювання індукує такі процеси у прокаріотів, як фотосинтез, фототаксис, фотореактивацію ДНК тощо. Найбільш згубними для бактерій є короткохвильові промені, наприклад, ультрафіолетові (УФ) з довжиною хвилі 250-260 нм. Вони поглинаються ДНК, РНК і білками та зумовлюють зміни їхніх молекул, що призводить до пошкодження клітини. УФ-промені викликають також мутагенний ефект, спричиняючи спадкові зміни прокаріотів, а тому їх часто використовують для одержання мутантів різних мікроорганізмів. Штучні джерела УФ-променів – бактерицидні лампи – широко використовують для дезинфекції повітря, холодильних камер, лікувальних і виробничих приміщень тощо.

Іонізуюче випромінювання на мікроорганізми може діяти згубно (бактерицидна дія) або викликати мутагенний ефект. Ефективність дії іонізуючої радіації залежить від виду, дози і об'єкту опромінення. Наприклад, прокаріоти набагато витриваліші до дії ядерних

випромінювань, ніж вищі організми. Тіонові бактерії, які живуть у покладах уранових руд, мають високу стійкість до радіації. Бактерії знаходили у водоймах-охолоджувачах атомних реакторів, де інтенсивність іонізуючої радіації перевищувала 20-30 тис. Гр (2-3 млн рад). Щодо механізму дії радіації на живі організми, то вважають, що вона виявляє пряму і непрямую дію. Пряма дія полягає в радіаційно-хімічних перетвореннях молекул у місці поглинання радіоактивних променів. Вплив останніх спричинює набуття молекулою збудженого стану, в результаті цього утворюються вільні радикали і перексиди, які реагують з ДНК, РНК і білками. При непрямій дії радіації відбувається пошкодження молекул мембран, органел, клітин цими ж продуктами радіолізу води.

**Ультразвук.** Ультразвукові хвилі мають частоту коливання понад 16 000 Гц. Вони виявляють згубну дію на різні мікроорганізми: зумовлюють розпад високомолекулярних сполук, коагуляцію білка, інактивують ферменти, токсини, спричинюють розрив клітинної стінки тощо. Досі ще не розкрито механізм дії ультразвукових хвиль. Його зв'язують з кавітацією (від *lat. cavitas* – порожнина), тобто утворенням у рідині порожнин, при закриванні яких виникають гідравлічні удари, що руйнують клітини мікроорганізмів.

До дії ультразвуку чутливі (різною мірою) всі прокариоти. Наприклад, до дуже чутливих належать протей, сальмонели, сирна паличка та інші, до дуже стійких – туберкульозна паличка та багато інших прокариотів. Інтенсивні дослідження дії електрогідравлічного ефекту на живі об'єкти за допомогою спеціальних установок проводились І. О. Ситником (1982) та іншими дослідниками. Це відкрило широкі можливості для практичного використання електрогідравлічного ефекту при стерилізації молока, соків та інших харчових продуктів, виробництві вбитих вакцин, одержанні внутрішньоцитоплазматичного білка різних видів мікробів, а також для стерилізації питної і стічних вод.

**Осмотичний тиск.** Важливе значення для життя прокаріотів має осмотичний тиск, величина якого визначається концентрацією розчинених речовин у середовищі. Цитоплазматична мембрана бактеріальної клітини регулює проникнення в клітину і вихід із неї води і розчинених речовин, зберігаючи при цьому осмотичну рівновагу. Надходження води з довкілля у клітину можливе лише в тому випадку, коли осмотичний тиск в клітині буде більшим, ніж тиск зовнішнього розчину. При високому осмотичному тиску в середовищі клітина втрачає здатність поглинати з нього воду, що згубно діє на неї. Нормальний осмотичний тиск у клітині визначається в межах від 3 до 7 атм.

Мікроорганізми, які добре розвиваються при нормальному тиску, дістали назву осмоотолерантних. Мікроби, що краще розвиваються при підвищеному осмотичному тиску, називаються осмофільними. Є також група бактерій (наприклад, *Halobacterium*), які потребують для свого росту і розвитку високої концентрації солей. Вони краще ростуть при концентрації солі в середовищі в межах 20-30%. Ці прокаріоти дістали назву галофілів. В свою чергу, серед них розрізняють помірних і екстремальних галофілів. Галофіли потребують іонів  $\text{Na}^+$  для стабільності клітинних мембран і активності ферментів.

**Гідростатичний тиск.** Прокаріоти по-різному реагують на дію гідростатичного тиску. Наприклад морські бактерії, що мешкають на глибині 1.000-10.000 м, можуть витримувати тиск до 900 атм. Деякі бактерії, дріжджі, цвільові гриби витримують тиск до 3000 атм, а фітопатогенні віруси – до 5000 атм. Бактерії, які ростуть при звичайному та підвищеному тиску, називають баротолерантними. Мікроорганізми, що краще розвиваються при високому тиску, належать до барофільних організмів. Під дією гідростатичного тиску змінюються активність ферментів і біохімічні властивості бактерій.

## **Хімічні фактори**

Хімічний склад середовища істотно впливає на ріст і розвиток прокаріотів. Від нього залежить надходження поживних речовин, і він визначає реакцію середовища, її окислювально-відновний потенціал.

**Реакція середовища (рН).** Ступінь кислотності або лужності середовища справляє великий вплив на життя мікроорганізмів. Фізіологічно діючою основою в кислих і лужних субстратах є концентрація гідроксильних і водневих іонів ( $\text{OH}^-$  і  $\text{H}^+$ ). До найбільш кислих природних середовищ належать гарячі кислі джерела і оточуючі їх ґрунти, рН у яких іноді може сягати 1. З цих місць виділено бактерії, які водночас є ацидофілами і термофілами. У природі також трапляються такі лужні джерела і озера, рН яких може сягати 8-11. З них виділено бактерії, які можуть добре рости при рН = 8 ... 10 (ціанобактерії та інші). Від реакції середовища залежить активність ферментів, яка є основою біохімічної активності мікробів. Наприклад, відомо, що ті самі дріжджі у кислому середовищі утворюють при зброджуванні цукру багато етилового спирту і незначну кількість гліцерину. В лужному субстраті, натомість, вони утворюють із цукру велику кількість гліцерину і дуже мало етанолу. Більшість бактерій краще розвиваються в нейтральному або слаболужному середовищі. Добре витримують кислотність оцтовокислі, молочнокислі та деякі інші види бактерій. Дуже чутливі до високої кислотності гнильні бактерії. Мікроорганізми, які добре розвиваються в лужному середовищі, дістали назву алкаліфільних. Наприклад холерний вібріон добре розмножується при рН = 9. Прокаріоти, які краще ростуть у кислому середовищі, називаються ацидофільними. На вивченні ставлення різних мікробів до рН середовища ґрунтується низка важливих практичних заходів щодо зберігання деяких харчових продуктів у квашеному й маринованому вигляді.



**Ступінь аеробності або анаеробності середовища** можна кількісно охарактеризувати за допомогою окисно-відновного потенціалу, який виражається символом  $\rho\text{H}_2$ . Цей індекс аналогічний рН. Тільки рН виражає ступінь кислотності і лужності середовища, а  $\rho\text{H}_2$  – ступінь аеробності і анаеробності. У водному розчині, повністю насиченому киснем,  $\rho\text{H}_2 = 41$ , а при повному насиченні середовища воднем  $\rho\text{H}_2 = 0$ . Отже, шкала від 0 до 41 характеризує будь-який ступінь аеробності.

Кисень трапляється в природі як у вільному, так і в зв'язаному стані; є обов'язковим компонентом будь-якої клітини. Переважна більшість живих організмів використовують обидві форми кисню. За відношенням до молекулярного кисню серед мікроорганізмів розрізняють: облігатні аероби, облігатні анаероби, факультативні анаероби і мікроаерофіли. Різні відношення бактерій до кисню залежить від їхніх фізіологічних особливостей.

**Хімічні речовини.** Залежно від хімічного складу, концентрації, температури, тривалості дії, виду прокариотів хімічні речовини можуть чинити на мікроорганізми стимулюючу, бактеріостатичну (пригнічуючу) і бактерицидну дію. Речовини, які діють на мікроби токсично, називають антисептиками, їх дуже широко використовують проти різних шкідливих мікроорганізмів.

За характером дії хімічні речовини поділяють на кілька груп:

- а) поверхнево-активні речовини – жирні кислоти, мила, інші ПАР; ці речовини найчастіше пошкоджують клітинну стінку;
- б) етанол, крезол, фенол та їхні похідні не тільки пошкоджують оболонку, а й діють руйнівню на білки цитоплазми;
- в) барвники – актифлавін, реванол та інші – діють на ДНК і РНК, порушують цитокінез;
- г) формалін спричинює денатурацію білків, згубно діє на вегетативні клітини і спори;

д) солі важких металів (мідь, срібло, свинець, цинк, ртуть та інші).

Бактерицидна дія важких металів може бути проілюстрована на прикладі срібла. Концентрація солей срібла в розведенні 1:100000 згубно діє на різні види мікробів. У садівництві, наприклад, розчини солей міді, цинку й заліза застосовують для сприскування плодових дерев при зараженні їх бактеріальними і грибовими хворобами.

Окислювачі (хлор, пероксид водню, йод, перманганат калію та інші) широко використовують для дезинфекції питної води, в медицині, сільському господарстві тощо.

*Завдання для самостійного опрацювання:*

1) Складіть таблицю, в яку занесіть основні відомі на сьогодні діапазони виживання та стійкості різних груп мікроорганізмів до: температури, вологості, вмісту в середовищі важких металів, радіації, ультрафіолетового опромінення та інших факторів.

2) Складіть таблицю-схему класифікації хімічних речовин та різних фізичних факторів щодо їхньої бактерицидної (фунгіцидної, баткеріоститичної та фунгістатичної) дії. Відзначте в ній відповідні ситуації та галузі людської діяльності, в яких ці обмежуючі фактори використовуються.

### **Практична 3    Фізіологічні групи мікроорганізмів. (2 год.)            Біотичні взаємодії мікроорганізмів.**

**Мета заняття:** розглянути основні фізіологічні групи мікроорганізмів та їхню роль в процесах перетворення природних і антропогенних речовин в оточуючому середовищі; звернути увагу на різноманітність біотичних взаємин мікроорганізмів, з'ясувати значення даних відносин для підтримання кругообігів біогенних елементів та використання їх з метою інтенсифікації технологічних процесів.

#### **План семінару:**

- Ї Різні фізіологічні групи мікроорганізмів;
- Ї Біотичні взаємодії мікроорганізмів:
  - Симбіоз. Типи симбіозу. Факультативні та облігатні симбіонти;
  - Симбіотичні асоціації мікроорганізмів, їх різноманітність і значення;
  - Коменсалізм, метабіоз.

#### **Загальні теоретичні відомості**

##### **Фізіологічні групи мікроорганізмів**

Мікроорганізми відіграють глобальну роль у біосфері, беручи участь в розкладанні органічних речовин. Кругообіг головних біогенних елементів (C, N, P, S) пов'язаний з діяльністю мікроорганізмів.

Мікроорганізми, що здійснюють певний процес перетворення речовини, відносяться до однієї **фізіологічної групи**. Одну фізіологічну групу можуть складати мікроби, що належать до різних таксонів. Так, наприклад, в фізіологічну групу азотфіксаторів входять аеробні види роду *Azotobacter*, симбіотичні з рослинами бульбочкові бактерії роду *Rhizobium* та анаеробні мікроорганізми, що належать до роду *Clostridium*.

Різні фізіологічні групи приймають участь в перетвореннях безазотових і азотвмісних органічних речовин та в перетвореннях неорганічних сполук.

Серед перетворювачів безазотових речовин відомі групи мікроорганізмів, які розкладають целюлозу, крохмаль, жири, а також зброджують різні природні сполуки до певних продуктів (спиртове, молочнокисле, оцтове, маслянокисле бродіння і т.д.).

Фізіологічні групи амоніфікаторів, нітріфікаторів, азотфіксаторів, денітрифікаторів забезпечують кругообіг азоту в природі.

Перетворення сірковмісних речовин здійснюють фізіологічні групи сульфатвідновлюючих бактерій і групи мікроорганізмів, здатних окислювати сірководень до сірки, а сірку – до сірчаної кислоти.

Окремі фізіологічні групи мікроорганізмів спеціалізуються на перетворенні неорганічних речовин (силікатів, сполук фосфору, заліза тощо).

Для виділення в лабораторних умовах мікроорганізмів, що належать до певної фізіологічної групи, користуються селективними середовищами. Склад такого „вибіркового” середовища забезпечує умови лише для росту необхідних досліднику бактерій, а супутня мікрофлора на них не розвивається.

За допомогою селективних умов можна створити *культури накопичення* певних груп бактерій. Так, якщо внести змішану популяцію бактерій (наприклад, ґрунтову бовтанку) в середовище, яке не містить джерел азоту, то в ньому не зможе розвиватися переважна більшість мікроорганізмів, а лише ті, що здатні фіксувати азот з повітря. Тобто – в цьому випадку накопичення азотфіксуючих бактерій буде обумовлене хімічним складом середовища.

Для селекції анаеробних бактерій культуру накопичення необхідно витримувати в безкисневих умовах, де не розвинуться аеробні форми.

Бактерії, що мешкають в кишковому тракті, можна накопичувати в середовищах при  $t^0 = 41-42^{\circ}\text{C}$  і в присутності жовчних солей, до яких, на відміну від інших бактерій, вони нечутливі і т.д.

### **Біотичні взаємодії мікроорганізмів**

Взаємовідносини різних організмів, які живуть в екосистемі, бувають найрізноманітнішими. Мікроорганізми в різних угрупованнях пов'язані між собою енергетичними ланцюгами і відчують взаємний вплив. Взаємовідносини між організмами в цих угрупованнях складні й динамічні через постійні зміни екологічних умов і мінливість самих мікроорганізмів. Вивчення цих взаємовідношень має надзвичайно важливе значення для розуміння кругообігу речовин у природі, утворення ґрунтів, еволюції видів прокариотів.

Упродовж еволюції в живій природі виникли різноманітні взаємовідносини як між мікроорганізмами, так і між мікро- та макроорганізмами.

*Симбіоз* – взаємно-корисне співіснування організмів різних видів. Прикладом є співжиття молочнокислих бактерій і дріжджів. Бактерії утворюють молочну кислоту, яка підкислює середовище, створюючи сприятливі умови для росту дріжджів. Останні синтезують ростові речовини, необхідні для розвитку бактерій. Інші приклади симбіозу – лишайник (симбіоз водорості й гриба), бульбочкові бактерії та бобові рослини.

*Мутуалізм* – різновидність симбіозу, при якому також існує взаємосприятливий вплив обох партнерів, наприклад взаємовідносини між мікрофлорою рубця жуйних і організмом тварини. Бактерії розкладають клітковину в рубці до сполук, які засвоюються організмом хазяїна, а останній забезпечує бактерії поживними речовинами і захищає їх від несприятливих умов.

*Коменсалізм* – форма симбіозу, при якій має вигоду тільки один партнер, не завдаючи ані шкоди, ані користі іншому. Прикладом цього може бути симбіоз організму людини з нормальною мікрофлорою її тіла (сапрофітна мікрофлора шкіри, травного каналу тощо).

*Метабіоз* – взаємовідносини між мікробами, при яких продукти метаболізму одного виду прокаріотів використовуються як пожива або енергетичний матеріал іншим видом мікробів. Наприклад, амоніфікатори розкладають білки з утворення  $\text{NH}_3$ , який використовується нітрифікуючими бактеріями.

*Синергізм*. При цій формі взаємовідносин у симбіонтів взаємно посилюються фізіологічні функції і виникають нові властивості. Це явище можна спостерігати при співжитті оцтовокислих бактерій і дріжджів. Бактерії перетворюють цукри на кислоти, які використовуються дріжджами, а останні забезпечують бактерії вітамінами.

### **Антибіотики**

Ці речовини належать до вторинних метаболітів, їх біосинтез не зв'язаний з ростом мікроорганізмів і вони не є життєво необхідними. Вони утворюються тільки при певних умовах для забезпечення їх продуцентів в умовах конкуренції. Деякі з них можуть виконувати низку фізіологічних функцій в організмі.

### **Фітонциди**

Про лікувальні властивості вищих рослин було відомо ще в глибоку давнину, проте бактерицидну властивість рослинних виділень вперше було засвідчено Б.П.Токіним у 1928 р. Ці рослинні виділення було названо фітонцидами. Фітонциди – біологічно активні речовини, які виділяються рослинами і характеризуються бактерицидними, фунгіцидними і протистозидними властивостями. Б. П. Токін вперше звернув увагу на те, що

фітонциди володіють антибіотичними властивостями. Разом з В.Г. Дроботько, Б.Ю. Айземан та іншими дослідниками він науково обґрунтував доцільність використання фітонцидів у медицині та інших галузях народного господарства.

Практично майже кожній рослині притаманні фітонцидні властивості, але не однаковою мірою. Найактивнішою бактерицидною дією характеризуються цибуля, часник, гірчиця, хрін, алое, кропива, полин, черемха, горіх, евкаліпт, цитрусові тощо. До складу фітонцидів входять альдегіди, алкалоїди, глікозиди, синильна кислота, хінони і ефірні олії тощо. Серед названих сполук надзвичайно високою антимікробною активністю володіють алкалоїди (анабазин, нікотин, хінін та ін.).

Чимало антибіотичних препаратів рослинного походження широко використовуються в медицині, сільському господарстві та інших галузях: аліцин, добутий із часнику; аренарін, виділений із цмину піскового; берберин, який одержують з багатьох видів рослин з родини жовтецевих. Ці препарати виявляють бактерицидну дію на стрептококи, стафілококи, дифтерійну паличку, гонококи і сальмонели. Фітонциди іманін і новоіманін, виділені зі звіробою звичайного, виявилися високо активними проти бактерій і вірусів рослин. Виділений з бавовника антибіотичний препарат госіпол застосовується для лікування оперізуючого лишая, псоріазу та інших вірусних захворювань.

Серед інших рослинних антибіотиків, які виявляють антимікробну дію, слід назвати: лютенарин, виділений з кореневищ глечиків жовтих; ксантин – із коноплі посівної; рафін – із редьки чорної; сальвій – із шавлії лікарської; хінін – з кори хінного дерева і хлорофіліпт – з листків евкаліпту. Вважають, що фітонциди є одним із факторів імунітету рослин, також вони відіграють важливу роль у взаємовідносинах організмів у біоценозах. Великий внесок стосовно вивчення і впровадження в практику фітонцидних препаратів

зробили вчені Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.

*Завдання для самостійної роботи:*

1) Знайти інформацію про використання вторинних метаболітів організмів в медицині та інших галузях народного господарства.

2) Схематично зобразити кругообіги азоту та сірки. Підписати родові назви та/або назви фізіологічних груп мікроорганізмів, які беруть участь в кожному етапі перетворень.

3) Зробити висновок щодо значення біотичних взаємовідносин мікроорганізмів між собою та з іншими групами організмів.

#### **Тема 4      Ростові процеси мікроорганізмів** (1 год.)

**Мета заняття:** ознайомитись з основними параметрами росту мікроорганізмів та особливостями їх культивування (поверхневого та глибинного; періодичного та безперервного); навчитися будувати криві росту мікробних культур; вивчити назви та особливості окремих ростових фаз.

#### **План семінару:**

- Особливості культивування та росту мікроорганізмів:
- Поверхневе та глибинне культивування.
- Періодичне і безперервне культивування.
- Основні параметри росту культур: час генерації, питома швидкість росту, урожай, економічний коефіцієнт.
- Обмеження росту і відмирання мікроорганізмів.



- Крива росту, особливості окремих фаз.
- Ріст культур при безперервному культивуванні.
- Системи хемостату та турбідостату.
- Значення безперервного культивування для вивчення властивостей мікроорганізмів, практичне використання.
- Синхронні культури: способи одержання, значення.

### Загальні теоретичні відомості

Будь-яка жива істота здатна до росту та розмноження. Під **ростом** розуміють координоване відтворення бактеріальних структур і відповідно збільшення маси мікробної клітини. **Розмноження** – це здатність мікробів до самовідтворення, при цьому збільшується кількість особин у популяції на одиницю об'єму середовища

Розмноження бактерій – складний процес, пов'язаний із синхронною взаємодією багатьох їх структур. Починається воно з відтворення генетичного матеріалу – ДНК, яка локалізована в нуклеоїді. Спочатку відбувається реплікація (подвоєння) генетичного матеріалу напівконсервативним шляхом. Розпочинається вона з реплікативної точки на ДНК, розташованої в місці з'єднання мезосоми з цитоплазматичною мембраною. Нуклеїнова кислота деспіралізується, й нитки ДНК розходяться. Кожна з них є матрицею, на якій за принципом комплементарності синтезуються їх копії, які згодом об'єднуються у двониткову ДНК. Синтез дочірніх ниток ДНК відбувається ступенево, невеликими фрагментами по 1-2 тис. нуклеотидів, які пізніше зшиваються ферментом лігазою. Залежно від умов, реплікація може тривати 20-40 хвилин.

Паралельно з реплікацією починається утворення поперечної перегородки за рахунок цитоплазматичної мембрани, яка згодом оточується пептидогліканом. Під час реплікації та утворення перегородки клітина росте,

синтезуються біополімери, з яких складатимуться цитоплазматична мембрана, рибосоми, цитоплазма.

Клітини відділяються одна від іншої, а в грамнегативних мікробів синтезується додатково зовнішня мембрана. Якщо клітини зберігають зв'язки, утворюються ланцюги з кокоподібних чи паличкоподібних форм.

Поділ клітин може відбуватись за трьома типами. **Випереджаючий** – такий тип, при якому утворюються багатоклітинні палички і коки. При **синхронному** реплікація нуклеоїду супроводжується поділом клітини, й утворюються одноклітинні організми. Третій тип – із **випереджаючим** поділом нуклеоїду, при якому утворюються багатонуклеоїдні форми бактерій.

Швидкість розмноження бактерій залежить від багатьох факторів: віку культури, складу живильного середовища, його рН, окисно-відновного потенціалу, температури, аерації тощо.

Бактерії розмножуються у геометричній прогресії. Якщо вважати, що за оптимальних умов бактерія подвоюється кожні 30 хвилин, то за годину їх буде 4, через дві години – 6, через 4 – 256, через 15 – мільйони. Через 35 год їх об'єм становитиме до  $1000 \text{ м}^3$ , а маса – понад 400 т.

При внесенні у живильне середовище бактерії розмножуються за певними закономірностями. Вони ростуть і розмножуються, досягаючи певного максимуму до того часу, поки не будуть вичерпані запаси живильних речовин. Якщо не видаляти кінцеві продукти обміну і не додавати необхідні речовини, то можна одержати **періодичну культуру** (популяція в обмеженому просторі). Мікроорганізми в такій культурі ведуть себе як багатоклітинні системи з генетично обмеженим ростом.

Крива, яка описує залежність логарифму числа живих клітин від часу культивування, називається **кривою росту**. Типова крива росту періодичної культури мікроорганізмів, зображена на рисунку, має S-подібну форму і характеризується різними фазами, пов'язаними із зміною складу живильного

середовища, складом біомаси та фізіолого-біохімічними властивостями мікроорганізмів.

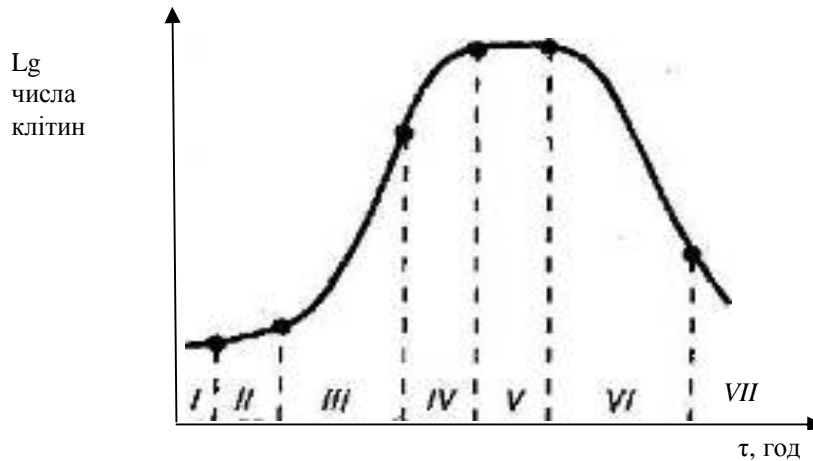


Рис. 4. I – лаг-фаза; II – фаза прискореного росту; III – фаза логарифмічного росту (експоненціальна); IV – фаза уповільненого росту через нестачу джерел живлення або через накопичення інгібуючих продуктів; V – стаціонарна фаза; VI – фаза відмирання клітин; VII – фаза виживання клітин.

Розрізняють чотири основні фази росту періодичної культури: **початкову** (або **лаг-**) **фазу**, **експоненціальну** (або **логарифмічну**) **фазу**, **стаціонарну** та **фазу відмирання** ((рис. 19).

*Початкова або лаг-фаза* охоплює проміжок між інокуляцією бактерій і досягненням найвищої швидкості їх поділу. В цей період відбувається адаптація бактерій до умов існування. В клітині у 8-12 разів зростає кількість РНК, збільшується концентрація ферментів. Тривалість фази 1-2 год.

*Експоненціальна (логарифмічна) фаза* характеризується постійною максимальною швидкістю поділу клітин і зростанням їх кількості у геометричній прогресії. Вона залежить від віку мікробів і складу середовища. Так, ентеробактерії діляться кожні 15-30 хв, стрептококи – 30 хв, а ґрунтові нітробактерії й збудники туберкульозу – 5-18 год. Час, протягом якого

відбувається поділ мікроба, називається **часом генерації**. Тривалість фази – 5-8 год.

**Стаціонарна фаза** настає тоді, коли число клітин перестає збільшуватись. Настає рівновага між кількістю живих мікробів і тих, що відмирають. Цьому сприяє висока щільність популяції, дефіцит живильних речовин у середовищі, низький парціальний тиск кисню, накопичення токсичних продуктів обміну. Однак кількість біомаси в цей період сягає найвищого рівня, тому концентрацію клітин позначають як **максимальну (M<sub>max</sub>)** концентрацію, а величину біомаси – терміном **вихід** або **урожай**. Ця ознака є специфічною й характерною для кожного виду бактерій. Триває фаза 6-7 год.

**Фаза відмирання** (до 10 год) супроводжується різким зменшенням числа живих клітин. Цьому сприяють значний дефіцит поживних речовин у середовищі, нагромадження кислот, автоліз під впливом власних ферментів.

Отже, у періодичній культурі умови культивування весь час змінюються: густина мікробів зростає, а запаси живильних речовин зменшуються. Однак у багатьох випадках необхідно підтримувати клітини у фазі експоненціального росту та M-концентрації, тому що саме в цей період вони найбільш фізіологічно і функціонально активні: синтезують багато білка, продукують велику кількість різноманітних ферментів, токсинів, антибіотиків, інших біологічно активних речовин. Це досягається постійним видаленням популяцій бактерій, що ростуть, оновленням живильного середовища, додатковою аерацією (для аеробних бактерій). Саме за такими принципами працюють хемостати і турбідостати – прилади, які дозволяють проводити безперервне культивування у промислових і лабораторних умовах.

Ріст мікробів на твердих живильних середовищах відбувається за аналогічними закономірностями, однак щільність клітин значно вища.

До промислових способів культивування мікроорганізмів належать періодичне, безперервне культивування та культивування іммобілізованих клітин. Найбільш поширений **спосіб періодичного культивування**. При даному способі інокулянт вносять у живильне середовище, яке містить задану кількість всіх необхідних поживних речовин. При цьому ні один з істотних компонентів живильного середовища не надходить у систему у процесі культивування, тобто це замкнута система. Періодичне культивування застосовується як для поверхневих культур (на поверхні твердого живильного середовища), так і глибинних культур (в рідкому живильному середовищі). Зростання мікроорганізмів у живильному середовищі припиняється тоді, коли зміст якого-небудь з необхідних компонентів середовища досягає мінімуму або у середовищі накопичуються продукти метаболізму, що інгібують ріст мікроорганізмів.

Під час культивування мікроорганізмів у **безперервній культурі** всі компоненти живильного середовища постійно надходять у систему і виводяться з неї. Це відкрита система і культивування здійснюється тільки в глибинній культурі, найчастіше аерованій.

**Культивування іммобілізованих клітин** відбувається шляхом прикріплення клітин мікроорганізмів (іммобілізація) на будь-які інертні носії. Живильне середовище постійно надходить у систему й виводиться з неї, тобто це теж відкрита система.

Для культивування мікроорганізмів необхідна наявність життєздатної засівної культури (інокуляту), живильного середовища, що містить всі необхідні елементи живлення (джерело енергії, вуглецю, макро- і мікроелементів і, у разі потреби, фактори росту), відсутність у середовищі різного роду інгібіторів росту. Необхідна, також підтримка оптимальних для росту мікроорганізмів фізико-хімічних умов навколишнього середовища (температура, рН, тиск, умови аерації, джерела світла та ін.).

**Основні параметри росту мікроорганізмів:**  $X$  – концентрація біомаси, г/л;  $N$  – кількість клітин в одиниці об'єму (титр культури, щільність популяції), кількість клітин у 1 мл;  $\mu$  – питома швидкість росту – приріст біомаси або числа клітин за одиницю часу, віднесений до концентрації біомаси або кількості клітин, год<sup>-1</sup>.

Для кількісної характеристики культивування мікроорганізмів користуються двома показниками – середньою та питоною швидкістю росту. **Середня швидкість росту  $V$**  характеризується приростом біомаси за одиницю часу:

$$V = \frac{x - x_0}{t - t_0},$$

де  $x_0$  – кількість біомаси на початку культивування, кг/м<sup>3</sup>;  $x$  – біомаса за час культивування  $\tau$ , кг/м<sup>3</sup>;  $t_0$  і  $\tau$  – початковий і кінцевий час відліку відповідно, год.

**Питома швидкість росту** характеризує годинний приріст на одиницю зростаючої біомаси:

$$m = \frac{dx}{dt} \times \frac{1}{x}.$$

Математична модель зростання кількості біомаси – рівняння Моно – застосовується для кількісного опису динаміки росту біомаси:

$$\frac{dx}{dt} = mx.$$

Величину  $\mu$  за певний проміжок часу можна знайти, вирішивши рівняння питомої швидкості росту шляхом логарифмування:

$$m = \frac{\ln \frac{x_0}{x}}{t - t_0} \quad \text{або} \quad m = \frac{2,3(\lg x - \lg x_0)}{t - t_0}.$$

Розмірність питомої швидкості  $\mu$ ,  $\text{год}^{-1}$ . З наведених рівнянь виходить, що питома швидкість росту залежить від кількості біомаси мікроорганізмів, які засіваються та отримуваних, від тривалості процесу.

Для визначення показників росту мікроорганізмів використовуються ряд методів, які поділяються на прямі і непрямі методи визначення. До прямих методів належать:

- визначення біомаси ваговим або турбідиметричним методом;
- визначення кількості клітин мікроорганізмів при використанні лічильних камер або при висіванні на тверді середовища.

При використанні непрямих методів проводять визначення маси окремих компонентів клітини (білок, клітинний азот, нуклеїнові кислоти, аденозінтрифосфорна кислота та ін.), маси спожитого субстрату (джерела вуглецю, азоту, кисню та ін.), маси утворених продуктів метаболізму тощо.

*Завдання для самостійної роботи:*

1) Отримати від викладача дані щодо накопичення біомаси у періодичній культурі певним мікроорганізмом та побудувати за цими даними криву росту.

2) Розрахувати показник середньої та питомої швидкості росту, виходячи з отриманих даних.

**Тема 5**  
(2 год.)

**Мікрофлора води та її роль в процесах самоочищення**

**Мета заняття:** систематизувати інформацію щодо шляхів та джерел забруднення водних об'єктів; розглянути роль мікрофлори води в процесах забруднення та очищення водойм; вивчити критерії, на основі яких обирають санітарно-показові мікроорганізми.

**План семінару:**

- Санітарно-бактеріологічне дослідження води.
- Санітарно-показові мікроорганізми.
- Джерела мікробного забруднення водойм.
- Кишкова група бактерій.
- Методи знезараження води.

**Загальні теоретичні відомості**

**Води поверхневих водойм** відкриті для всіх видів контамінації. Забруднення їх мікроорганізмами, що потрапляють зі стічними, зливовими, талими водами різко змінює мікробний пейзаж і санітарний режим водойми.

Основною **шлях мікробного забруднення водойм** – потрапляння неочищених міських відходів і стічних вод в довколишні озера, ставки, річки. При паводках, розливах річок, повені або сильних зливах можливе переповнення колодязів, джерел і потрапляння в них стічних вод.

**Кількість мікроорганізмів** у воді поверхневих стоків у весняно-паводковий період збільшується до 28-3 млн. в 1 мл. У період паводку можливо вторинне забруднення водопровідної мережі. Мікрофлора господарсько-фекальних стічних вод складається з мікроорганізмів, що виділяються з кишечника людини і тварин, серед яких є представники нормальної та умовно-патогенної флори (ешеріхії, ентерококи, клебсієли,



кlostридії, гриби роду *Candida*, найпростіші тощо), але можуть знаходитися і патогенні – збудники кишкових інфекцій (сальмонели, шигели, віріони, збудники туляремії, лептоспір, віруси поліомієліту, гепатитів А, Е та ін.)

Небезпека зараження останніми особливо велика, якщо в **водойми потрапляють** недостатньо знезаражені стічні води інфекційних лікарень. Контамінація води водойм відбувається також при купанні людей, худоби і прання білизни. Однак вода не є середовищем, сприятливим для розмноження патогенних мікроорганізмів, для яких природні біотопи – організми людини або тварин. На життєздатність патогенних бактерій впливає супутня, конкурентна флора (мікроби-антагоністи, фаги, найпростіші, водорості), а також температура, інсоляція, різні хімічні речовини і т.д.

### ***Самоочищення відкритих водойм***

**Звільнення від контамінуючих мікроорганізмів** спостерігають після органічного забруднення водойм. Основний фактор очищення – конкурентна активація сапрофітної мікрофлори, яка призводить до швидкого розкладання органічних речовин, зменшення чисельності бактерій різних видів, особливо фекального походження. Здатність водойми до самоочищення пов'язана з присутністю в ній аутохтонних мікроорганізмів, що входять в конкретний біоценоз. Проте кількісні та якісні співвідношення в біоценозах нестійкі і змінюються під дією різних факторів, тобто змінюються по сапробності. Терміном «сапробність» [від грец. *sapros*, гнилий] позначають комплекс особливостей водойми, в тому числі склад і кількість мікроорганізмів у воді, яка містить органічні і неорганічні речовини в певних концентраціях. Розрізняють полісапробну, мезосапробну та олігосапробну зони.

- **Полісапробна зона** (Зона сильного забруднення). Містить велику кількість органічних речовин, що легко розкладаються, і майже повністю позбавлена кисню. Мікробний біоценоз подібних зон особливо багатий, але

видовий склад обмежений анаеробними бактеріями, грибами, актиноміцетами. Кількість бактерій в 1 мл води в полісапробній зоні сягає мільйона і більше.

- **Мезосапробна зона** (Зона помірного забруднення). Характеризується домінуванням окисних і нітрифікаційних процесів. Якісний склад різноманітний. В основному, це нітрифікуючі, облігатно аеробні бактерії, а також види *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Candida* та ін. Загальна кількість мікроорганізмів – сотні тисяч в 1 мл.

- **Олігосапробна зона** (Зона чистої води). Характеризується закінченими процесами самоочищення, невеликим вмістом органічних сполук і закінченням процесу мінералізації. Вода відрізняється високим ступенем чистоти. Кількість бактерій від 10 до 1000 в 1 мл води.

**Патогенні мікроорганізми**, що потрапляють у водойми, досить рясні в полісапробній зоні, поступово відмирають в мезосапробній і практично не виявляються в олігосапробній.

Процеси самоочищення води у водоймах відбуваються послідовно і безперервно, з поступовою зміною біоценозів.

### *Аутохтонна мікрофлора відкритих водойм*

**Аутохтонная мікрофлора** – сукупність мікроорганізмів, що постійно живуть і розмножуються у воді. Як правило, мікробний склад води нагадує мікрофлору ґрунту, з яким вода стикається.

Тобто більшість **водних мікроорганізмів** також є поширеними мешканцями ґрунтів. Мікроорганізми, що пристосувалися до умов існування в воді і регулярно виявляються в ній, можна вважати специфічною для води флорою. До них відносять аеробні коки: мікрококи, сарцини; *Serratia marcescens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, бактерії родів *Pseudomonas*, *Proteus*, *Leptospira*.

**Анаеробних бактерій в незабруднених водоймах** мало; найбільш часто в них виявляють клостридії. Кількість мікроорганізмів у відкритих водоймах варіює в широких межах: від декількох десятків, сотень до мільйонів в 1 мл, що залежить від виду водойми, ступеня його забруднення, зміни метеорологічних умов, сезону і т.д. Слід пам'ятати, що у воді водойм можуть міститися речовини, що перешкоджають розмноженню мікробів і навіть надають згубний на них дію. Наприклад, сірководень або сірчана кислота, що утворюються в результаті життєдіяльності одних бактерій, несприятливо впливають на інші мікроорганізми.

На дні, а також у прибережній зоні водойм виявляють велику кількість мікробів, що пов'язано з постійним потраплянням бактерій з ґрунту берега, з дощовою водою, з поверхневими стоками, тому флора такого поверхневого водоймища періодично змінюється і оновлюється. Далеко від берегів у воді міститься невелика кількість мікробів. Мікроорганізми води відіграють значну роль у кругообігу речовин у природі. Вони розщеплюють органічні речовини з утворенням субстратів, які використовують у харчуванні інші водні мікроорганізми.

**Біологічна активність** у водоймах максимальна в літньо-осінній період.

### ***Загальна характеристика методів санітарно-мікробіологічних досліджень***

Для визначення кількості мікроорганізмів використовують різні методи:

- прямий підрахунок під мікроскопом у рахувальних камерах (застосовується рідко);
- кількісний посів на щільні середовища з наступним підрахунком колоній, які виростили;
- титраційний посів на рідкі поживні середовища;

- спеціальні методи, які враховують особливості досліджуваного матеріалу.

Кількість санітарно-показових мікроорганізмів у досліджуваному матеріалі виражають у вигляді титру чи індексу.

Титр – це найменший об'єм досліджуваного матеріалу (в мілілітрах) чи вагова кількість (у грамах), в яких виявлена одна клітина санітарно-показового мікроорганізму.

Індекс – кількість клітин санітарно-показового мікроорганізму в 1 л ( $\rho$ ) досліджуваного матеріалу.

Індекс – величина, обернена титру, тому перерахунок індекса в титр і навпаки можна здійснювати за формулою(для рідин):

$$титр = \frac{1000}{індекс}; \quad індекс = \frac{1000}{титр}.$$

Індекс частіше визначають шляхом застосування мембранних фільтрів чи посіву різних розведень досліджуваних субстратів на щільні поживні середовища, на яких потім підраховують колонії.

Вибір того чи іншого санітарно-показового мікроорганізму залежить від об'єкта дослідження та конкретної задачі. Нерідко одночасно визначається присутність і ведеться кількісний підрахунок двох і більше санітарно-показових мікроорганізмів.

**Загальне мікробне число** (загальна мікробна забрудненість) об'єкта характеризується кількістю мікроорганізмів в 1 мл води, іншої рідини чи в 1 г твердої речовини. Існує кілька методів визначення загального мікробного числа: метод прямого підрахунку і метод кількісного посіву різних розведень зразків і проб досліджуваного об'єкта.

### ***Санітарно-показові мікроорганізми***

Основними джерелами розповсюдження патогенних мікроорганізмів у навколишньому середовищі є люди та теплокровні тварини (хворі, бактеріо-

та вірусоносії). Виділення мікроорганізмів до оточуючого середовища відбувається переважно фекальним та повітряно-крапельним шляхами.

Безпосередньо виявити патогенні мікроорганізми в об'єктах зовнішнього середовища надзвичайно важко. Пов'язано це з їхньою низькою концентрацією, коливанням вмісту (наявністю під час епідемії та відсутністю в міжепідемічний період).

Виявленню патогенів заважають і сапрофітні мікроорганізми, вміст яких у дослідних об'єктах значно більший. Тому можливе забруднення патогенними мікроорганізмами визначають базуючись на непрямому показникові – виявленні санітарно-показових мікроорганізмів, які є постійними мешканцями організму людини та тварин (кишечнику, верхнього відділу дихальних шляхів, поверхні тіла). Вони складають нормальну мікрофлору і тільки при певних умовах можуть проявляти патогенні властивості.

Виявлення таких мікроорганізмів у об'єктах зовнішнього середовища свідчить про їхнє забруднення виділеннями людини та тварин. Чим більше таке забруднення, тим більша вірогідність потрапляння до об'єкта патогенних мікроорганізмів.

Санітарно-показові мікроорганізми повинні відповідати певним вимогам:

- постійно мешкати в організмі людини та тварин і у великій кількості виділятися в навколишнє середовище;
- зберігати життєздатність у зовнішньому середовищі протягом термінів, близьких до виживання патогенних мікроорганізмів, які виділяються тими ж шляхами;
- не повинні розмножуватися в довкіллі;
- повинні легко виділятися з об'єктів і не пригнічуватися сапрофітами;
- не повинні змінювати своїх біологічних властивостей;

- не повинні мати іншого природного резервуара, крім організму людини та тварин;
- повинні бути більш стійкими до дії фізичних та хімічних факторів зовнішнього середовища, ніж патогенні мікроорганізми;
- індикація, ідентифікація та кількісний облік повинні здійснюватися сучасними, простими, легко доступними та економічними мікробіологічними методами.

### ***Бактерії групи кишкової палички***

Під загальною назвою «Бактерії групи кишкової палички» (БГКП) об'єднують бактерії родини *Enterobacteriaceae*, рр. *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* і *Klebsiella* (за Біргером). До бактерій групи кишкової палички відносяться грамнегативні неспороутворюючі палички, які зброджують лактозу з утворенням кислоти і газу при 37 °С протягом 1-2 діб чи зброджують глюкозу з утвореннями кислоти та газу протягом 1 доби, в яких відсутня оксидазна активність. Позитивна відповідь про наявність у досліджуваному об'єкті БГКП дається на основі визначення грамнегативних паличок і негативного оксидазного тесту.

При характеристиці БГКП ураховують наступні диференційно-діагностичні ознаки:

- інкубація посівів при 37 °С;
- характер росту на середовищі Ендо – лактозний тест (враховуються темно-червоні колонії з металевим блиском (*E. coli*) чи без нього (*Enterobacter*);
- забарвлення за Грамом;
- бродильна проба на середовищі з глюкозою.

Усі бактерії, які дають ріст на середовищі Ендо при 37 °С протягом 24 год. називаються ендобактеріями. Серед них переважають грамнегативні мікроорганізми, проте іноді зустрічаються і грампозитивні палички, і коки.

Загальну кількість цих бактерій враховують при санітарно-гігієнічній оцінці водоочисних споруд та характеристиці процесів самоочищення водою.

До них відносять грамнегативні, неспороутворюючі, оксидазонегативні бактерії. Із ентеробактерій виділяють БГКП-бактерії, які зброджують глюкозу до кислоти і газу при температурі 37 °С. Серед БГКП виділяють лактозопозитивні палички (ЛКП), які ферментують лактозу до кислоти і газу при 37 °С. Із ЛКП виділяють фекальні кишкові палички (ФКП), які зберігають здатність розщеплювати лактозу при 44,5 °С. Наявність ФКП є показником свіжого фекального забруднення. Із ФКП до *E.coli* відносять тільки бактерії, які нездатні рости на нітратному середовищі.

### **Аналіз води поділяється на 2 етапи:**

**1) Вивчення водних мікроорганізмів-сапротрофів.** Для обліку цієї групи мікроорганізмів користуються методом серійних розведень із висівом на МПА. Чим більше у воді сапрофітних мікробів, тим сильніше вона забруднена.

**2) Санітарно-гігієнічний аналіз води** – це аналіз на виявлення у воді збудників таких захворювань як дизентерія, черевний тиф, холера (тобто, кишкових захворювань). Пряме виявлення збудників цих захворювань у воді дуже складне і займало б дуже багато часу, тому про їх наявність судять то наявності у воді санітарно-показового мікроорганізму — *Escherichia coli*.

### *Завдання для самостійної роботи:*

1) Скласти план-схему аналізу води. На схемі зазначити методичні особливості санітарно-гігієнічного аналізу та вивчення сапрофітної мікрофлори.

2) Проаналізувати нормативні документи, що регулюють характер проведення санітарного аналізу води.

**Тема 6**  
(2 год.)

**Мікрофлора ґрунту та її роль в процесах самоочищення**

**Мета заняття:** ознайомитись з ґрунтом як продуктом та середовищем існування мікроорганізмів; визначити основні етапи та особливості санітарного аналізу ґрунту.

**План семінару:**

- Ў Ґрунт як середовище перебування мікроорганізмів і продукт їх життєдіяльності. Мікрональність. Утворення гумусу.
- Ў Самоочищення ґрунту від органічних забруднень.
- Ў Екологія ґрунтових мікроорганізмів.
- Ў Мікробоценози ґрунту та їх розвиток.
- Ў Санітарний аналіз ґрунту.

**Загальні теоретичні відомості**

Ґрунт є природним середовищем існування мікроорганізмів. Цьому сприяє достатня кількість вологи, органічних та мінеральних речовин, із природних субстратів ґрунт найбільш заселений мікроорганізмами, які складають його постійну мікрофлору. Санітарно-гігієнічна роль цієї мікрофлори величезна. Ґрунтові мікроорганізми приймають участь у мінералізації органічних відходів, самоочищенні ґрунту, в кругообігу речовин у природі.

У ґрунт з виділеннями хворих, а також з трупами людей та тварин, які загинули від інфекційних хвороб, із стічними водами потрапляють патогенні мікроорганізми. У зв'язку з цим ґрунт може служити джерелом розповсюдження збудників інфекційних захворювань. Через нього може відбуватися забруднення сапрофітними та патогенними мікроорганізмами сировини, харчових продуктів, кормів. Тому відходи, які потрапляють у



грунт, повинні підлягати очищенню та знезараженню. Санітарний стан ґрунту оцінюють за мікробіологічними показниками.

### *Мікрофлора ґрунту*

Кількісний та видовий склад мікрофлори ґрунту зумовлений вмістом у ньому органічних речовин, вологи, рН, температурою, кліматичними умовами, способом обробки тощо. Зі збільшенням кількості органічних речовин, як правило, зростає і кількість мікроорганізмів. Органічні речовини є джерелом живлення для більшості ґрунтових бактерій. Загальний запас органічних речовин ґрунту досягає 400 т на 1 га, і переважно знаходиться у поверхневому шарі (до 30 см) ґрунту. За узагальненими даними Д. Г. Звягінцева сира маса бактерій в орному шарі різних ґрунтів коливається від 0,5 до 15 т/га, мікроскопічних грибів – від 5 до 20 т/га. Найбільш багаті мікроорганізмами чорноземні, каштанові, сіроземні та спеціально оброблені ґрунти. Кількість бактерій в 1 г таких ґрунтів іноді досягає декількох десятків мільярдів. Бідні мікрофлорою піщані, гірські та позбавлені рослинності ґрунти. Але навіть у пісках пустель кількість бактерій досягає 10-100 тис. в 1 г. Розподіл мікробів у ґрунті нерівномірний. На поверхні і в шарі товщиною 1-2 мм мікроорганізмів відносно мало, незважаючи на їхнє постійне надходження до ґрунту. Це пояснюється згубною дією ультрафіолетового випромінювання сонця та висушування.

Максимальна кількість бактерій у ґрунті міститься на глибині 10-20 см. Починаючи з глибини 1-2 м кількість їх різко зменшується і на глибині 4-5 м мікроорганізми виявляються в дуже малих кількостях. Вода, яку отримують із артезіанських свердловин, практично стерильна, що можна пояснити фільтраційними властивостями ґрунтових грудочок і відсутністю для живлення бактерій необхідних органічних сполук.

Чисельність мікроорганізмів зазнає сезонних коливань: весною кількість збільшується, досягаючи максимуму на початку літа, в розпалі літа

– зменшується в результаті найбільш активного впливу сонячних променів, восени – знову збільшується, і знижується взимку.

Грунт заселений найрізноманітнішими автотрофними та гетеротрофними, аеробними та анаеробними термо-, мезо- та психрофільними мікроорганізмами.

У складі мікрофлори ґрунту прийнято виділяти так звані фізіологічні групи мікроорганізмів, які приймають участь у різних процесах і на різних етапах поступового розщеплення органічних речовин.

1. **Бактерії-амоніфікатори** – гнилісні мікроорганізми, які викликають гниття залишків рослин, трупів тварин, розщеплення сечовини. У процесі гниття приймають участь аеробні спороутворюючі бактерії роду *Bacillus* – *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *B. cereus*, *B. megaterium*, аспорогенні аероби та факультативні анаероби *Serratia marcescens*, бактерії роду *Proteus*, *Pseudomonas fluorescens*, анаеробні бактерії роду *Clostridium* – *C. sporogenes*, *C. putrificum*, *C. perfringens*, уробактерії, які розщеплюють сечовину – *Urobacillus pasteurii*, *Sarcina ureae*, гриби родів *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*.

2. **Нітрифікуючі бактерії** родів *Nitrosomonas* та *Nitrobacter*. Представники роду *Nitrosomonas* окислюють аміак, який утворюється в результаті життєдіяльності амоніфікуючих бактерій, до азотистої кислоти, утворюючи нітриту. Під дією бактерій роду *Nitrobacter* азотиста кислота окислюється до азотної кислоти в нітрати.

3. **Азотфіксуючі бактерії**. Вільноживучі азотфіксуючі бактерії роду *Azotobacter*, симбіотичні бульбочкові бактерії роду *Rhizobium* та деякі інші, здатні засвоювати із повітря атмосферний азот і у процесі життєдіяльності утворювати із молекулярного азоту білки та інші органічні сполуки азоту, які використовуються рослинами.

4. **Бактерії, які розщеплюють клітковину**, викликають різні види бродіння, що відбуваються при розщепленні мікроорганізмами органічних

сполук вуглецю (молочнокисле бродіння, спиртове, маслянокисле, оцтовокисле, пропіоновокисле, ацетонобутилове та інші).

**5. Бактерії, які приймають участь у кругообігу сірки, заліза, фосфору та інших елементів** – сіркобактерії, залізобактерії тощо, різноманітні види яких здійснюють окислення та відновлення цих сполук у природі.

Зміни мікробних біоценозів у ґрунті залежать від родючості, добових та сезонних коливань температури і вологості. У родючому ґрунті інтенсивно розвиваються гетеротрофні мікроорганізми, які належать до родин *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Bacillaceae* та інші. Вони змінюють реакцію середовища в кислий бік, оскільки мають високу ферментативну активність.

В кислому середовищі починають розмножуватися молочнокислі бактерії, дріжджі, **цвільові гриби, бактерії, які розщеплюють клітковину**. Використання цими бактеріями кислот та утворення карбонатів веде до нейтралізації та підлугування середовища, особливо в добре дренованих, аерованих ґрунтах. У цей період відбувається збіднення ґрунтових вод сполуками азоту, фосфору, кальцію і ґрунт стає малопридатним для росту сільськогосподарських культур. Починається зменшення загальної кількості вегетативних форм ґрунтових організмів за рахунок їхньої загибелі і утворення спор бацилами, актиноміцетами, дріжджами, грибами та цист найпростішими. Описані зміни біоценозу пов'язані зі змінами хімічного складу ґрунту в результаті розщеплення мікробами білків до аміаку та сірководню і подальшого їх окислення до нітратів та сульфатів, відповідно. Це сприяє формуванню повного біоценозу, який включає мікобактерії, актиноміцети, вищі гриби.

Порядок зміни біоценозів може бути порушений при внесенні до ґрунту різних мінеральних та органічних добрив. У біоценозах спостерігаються різноманітні взаємовідношення між мікроорганізмами, рослинами та найпростішими, які характеризуються не тільки антагонізмом,

але і взаємодопомогою (синтрофізмом). До подібного типу відносяться взаємовідношення аеробних та анаеробних бактерій в ґрунті, коли перші, використовуючи в ізольованих порожнинах кисень, створюють умови для розвитку анаеробів.

### ***Біологічне забруднення ґрунту та роль мікроорганізмів у його самоочищенні***

З виділеннями людини та тварин, з різними господарсько-побутовими та промисловими відходами та стічними водами, з залишками рослин та трупами тварин у ґрунт надходить величезна кількість різноматнітних мікроорганізмів. Так, у фекаліях людини знайдено понад 60 видів мікроорганізмів – представників 8-10 родин. Переважають анаероби і факультативні анаероби (до 96% усіх видів): біфідобактерії, лактобацили, стрептококи. У меншій кількості зустрічаються ешеріхії, ентерококи, протеї, клостридії, кандіди та інші мікроорганізми. Дуже високим є рівень біологічного забруднення ґрунту в неканалізованих землях, на територіях тих підприємств, де можуть накопичуватись органічні відходи (наприклад, бойні тощо), на господарських подвір'ях, на територіях тваринницьких комплексів, на пляжах та прилеглих до них ділянках. Велику небезпеку в епідеміологічному відношенні мають стічні води боєн, м'ясокомбінатів, підприємств по переробці шкіри, вовни, в яких можуть знаходитися патогенні мікроорганізми. Зі стічними водами мікроорганізми потрапляють у мулові відкладення, потім, при використанні недостатньо знезаражених мулових осадів і стічних вод на полях зрошування, може відбутись інфікування ґрунту, а також ягідних культур та овочів, які вирощуються на таких полях. Адсорбуючись на поверхні ґрунтових часток та осадів стічних вод бактерії можуть деякий час зберігати свою життєдіяльність та вірулентність. Бактерії-забруднювачі можуть проникати досить глибоко, до 30-40 см, що залежить від структури ґрунту.

Оскільки контамінантні мікроорганізми не входять до складу сформованих ґрунтових мікробних ценозів, вони через деякий час гинуть. Цьому сприяють фізичні та хімічні умови існування, відсутність необхідних поживних речовин, а головне, антагонізм постійних мешканців ґрунту – бактерій, актиноміцетів, грибів. Антагонізм, обумовлений виділенням антибіотиків, бактеріоцинів, дією бактеріофагів, а також життєдіяльністю найпростіших.

Основна роль у мінералізації органічних речовин, яка забезпечує самоочищення ґрунту, належить ґрунтовим мікроорганізмам.

У ґрунті безперервно здійснюються процеси, обумовлені життєдіяльністю мікроорганізмів: гниття, нітрифікація, денітрифікація, розщеплення клітковини, сечовини. Ці процеси розпаду та мінералізації органічних речовин мають велике санітарно-гігієнічне значення. У процесі самоочищення ґрунту вміст санітарно-показових мікроорганізмів (БГКП та термофільних мікроорганізмів) у ньому змінюється.

Спостерігається чіткий зв'язок між забрудненням ґрунту та присутністю в ньому ешеріхій, наприклад, якщо при початковому виявленні в дуже забрудненому ґрунті вміст ешеріхій складає  $10^5$ - $10^6$ , то через 4 місяці він знижується до  $10^{-1}$ - $10^{-2}$ , а через 8 місяців ешеріхії взагалі не виявляються в 1 г. Проте, багато з представників нормальної мікрофлори людини вступають у біоценоз ґрунту, приймаючи участь у його біохімічних процесах, а окремі види бактерій стають постійними мешканцями ґрунту. Тому важко чітко розділити мікрофлору на постійну та таку, що тимчасово мешкає в ґрунті. Для того, щоб оцінити роль ґрунту у передачі інфекційних хвороб, необхідно знати можливу тривалість зберігання і розмноження патогенних бактерій у ґрунті (табл. 1). На термін їхнього виживання впливає багато чинників: склад та тип ґрунту, температура, вологість, вплив атмосферних осадів, ступінь контамінації та її характер.

**Патогенні мікроорганізми, які виявляються в ґрунті**  
(за Г.Н. Чистовичем)

Мікроорганізми, для яких ґрунт є природним біотопом	Мікроорганізми, які потрапляють до ґрунту з виділеннями людини та тварин	
	Зберігаються тривалий час	Зберігаються порівняно недовго
Клостридії ботулізму	Збудник сибірської виразки	Сальмонели, шигели, віріони
Збудники глибоких мікозів	Клостридії правця	Бруцели
Актиноміцети	Збудники анаеробної інфекції	Збудник туляремії
Деякі збудники мікотоксикозів		Мікобактерії туберкульозу Лептоспіри Збудник сапу

До першої групи патогенних мікроорганізмів, які постійно мешкають у ґрунті, відноситься невелика кількість мікроорганізмів. Серед них найбільше значення мають збудники ботулізму *Clostridium botulinum*, які потрапляють у ґрунт з випорожненнями людини та тварин і, утворюючи спори, залишаються в ньому протягом тривалого часу. Про це необхідно пам'ятати при консервуванні (особливо домашньому) овочів, грибів, м'яса та інших продуктів, які можуть бути забруднені ґрунтом і, таким чином, містити спори клостридій ботулізму.

Друга група включає спороутворюючі патогенні мікроорганізми (збудники сибірської виразки, правця, газової гангрени), які потрапляють у ґрунт з фекаліями людини та тварин, іншими виділеннями, а також з трупами загиблих тварин. Ґрунт для них є вторинним резервуаром, оскільки при сприятливих умовах клостридії можуть розмножуватися і зберігатися у вигляді спор тривалий час. Спори *B. anthracis* виявляються в ґрунті

«проклятих полів» протягом десятків років, причому ці бактерії здатні розмножуватися в ґрунті при температурі не нижче 12 °С, достатній вологості, наявності гумусу та мікроелементів.

До третьої групи включені патогенні мікроорганізми, які потрапляють у ґрунт з виділеннями людини та тварин, і можуть зберігатися в ньому кілька тижнів чи місяців. Ці мікроорганізми (сальмонели, шигели, віріони, бруцели, мікобактерії, лептоспіри, збудники сапу та інші) не утворюють спор і тому швидко гинуть у результаті дії різних фізичних та біологічних факторів.

Показником активності самоочищення ґрунту може служити визначення енергії нітрифікації. Посиленню розмноження нітрифікуючих бактерій: сприяє наявність у ґрунті великої кількості аміаку – продукту білкового розщеплення. Чим більше мінералізовано органічних речовин у ґрунті, тим інтенсивніше перебігає процес нітрифікації і, таким чином, процес самоочищення ґрунту.

### ***Очищення та знезараження ґрунту***

У процесі життєдіяльності людини та тварин ґрунт, особливо великих міст, тваринницьких ферм у значній мірі забруднюється різними відходами.

Мікроорганізми ґрунту та водойм у природних умовах успішно здійснюють розщеплення органічних речовин. У поселеннях людини відходи органічних речовин накопичуються швидко, санітарний стан середовища погіршується. Для підтримки належних умов необхідно систематично очищати та знезаражувати відходи.

Очищення – це система заходів, головною метою яких є охорона середовища мешкання людини та сільськогосподарських тварин від забруднення органічними та іншими відходами. Особливо старанно слід очищати територію м'ясокомбінатів, молочних заводів та інших харчових підприємств. У процесі знезараження відходів складні органічні сполуки перетворюються на прості речовини, придатні для живлення рослин, патогенні мікроорганізми знищуються, отруйні речовини руйнуються.\*

Знезаражують відходи двома методами ґрунтовим та біотермічним.

*Ґрунтовий метод* базується на закопуванні відходів. При цьому одночасно з мінералізацією органічних речовин відбувається відмирання сапрофітних та патогенних мікроорганізмів, які містилися у відходах. Це зумовлюється тим, що мікроорганізми потрапляють і заражають невласне для них середовище існування і зазнають антагоністичного впливу з боку ґрунтової мікрофлори. Ґрунтовий метод знезараження відходів застосовується для очищення стічних вод. Недоліком цього методу є значна тривалість процесу знезараження.

*Біотермічний метод* базується на здатності органічних речовин самонагріватися і навіть самозайматися. Найпростішим методом біотермічного знезараження відходів є компостування. Компости влаштовують подалі від колодязів та житла. Їхня ширина 2 м, висота 1,5 м, довжина 20 м. Краще закладати компости в камери, забезпечені установками для аерації. Розігрівання компосту іде з поверхні, де окиснення відбувається більш інтенсивно. Поверхневі шари нагріваються до 60-70 °С, а глибинні – спочатку до 25 °С. Швидкість розігрівання залежить від ступеню аерації. Речовини, які компостуються, складають нещільно, вологість повинна дорівнювати 60%.

### ***Санітарно-мікробіологічне дослідження ґрунту та оцінка ґрунту за мікробіологічними показниками***

Мікробіологічне дослідження ґрунту є важливою ланкою його санітарної оцінки.

Необхідність санітарно-мікробіологічного дослідження ґрунту обумовлена регламентаціями при здійсненні попереджувального та поточного санітарного нагляду.

*Попереджувальний нагляд здійснюється при:*

1) плануванні, будівництві та реконструкції ділянок і населених місць, які вперше заселяються;



- 2) виборі ділянок для будівництва дитячих дошкільних закладів, таборів відпочинку, санаторіїв тощо;
- 3) будівництві водосховищ;
- 4) вирішенні питань водопостачання і каналізації населених територій;
- 5) санітарному оцінюванні землі на полях зрошування, де використовується гній, компости, стоки тваринницьких комплексів тощо;
- 6) визначенні санітарного стану ґрунту, забрудненого отрутохімікатами;
- 7) санітарному оцінюванні пляжів, місць масового відпочинку тощо.

*Поточний санітарний нагляд здійснюється:*

- 1) при оцінюванні санітарного стану поверхневих шарів ґрунту для встановлення ступеню впливу біологічної контамінації на здатність ґрунту до самоочищення;
- 2) при контролі за ґрунтовими та біотермічними методами знезараження стічних вод та відходів;
- 3) за епідемічними показниками для пояснення можливого шляху передачі інфекційної хвороби через ґрунт, термінів виживання в ґрунті патогенних мікроорганізмів, можливості зараження води (відкритих водойм та ґрунтових), овочів, які вирощуються на зрошуваних землях.

*Головна задача санітарно-мікробіологічного дослідження ґрунту* полягає у тому, щоб оцінити санітарно-гігієнічний стан ґрунту та інтенсивність його забруднення (ступінь та давність).

Залежно від поставленої мети санітарно-мікробіологічне дослідження може бути проведено у вигляді короткого чи повного аналізу. Короткий аналіз рекомендується при здійсненні поточного санітарного нагляду. Він включає визначення:

- 1) загального мікробного числа;
- 2) бактерій групи кишкових паличок (БГКП);
- 3) титру анаеробів (перфрінгенс-титру);

- 4) термофільних бактерій, які вказують на характер контамінації (гноєм, фекаліями, стічними водами, компостами);
- 5) нітрифікуючих бактерій.

До повного санітарно-мікробіологічного аналізу, який проводиться при санітарному нагляді, входять додаткові дослідження, які визначаються конкретними задачами. Наприклад, сюди може входити визначення загальної кількості сапрофітів, чисельності і відсоткового відношення спор до загальної кількості мікроорганізмів, кількості актиноміцетів, грибів, целюлозо-розщеплюючих бактерій, основних груп ґрунтового мікробіоценозу. За епідеміологічними показниками проводяться виявлення та ідентифікація патогенних мікроорганізмів – сальмонел, шигел, збудників правця, ботулізму, сибірської виразки.

Критерії оцінювання санітарного стану ґрунту за основними мікробіологічними показниками наведені у таблиці 2. Мікробіологічним показником, що характеризує забруднення ґрунту органічними речовинами, є мікробне число. В чистих ґрунтах воно не перевищує 1-1,5 млн. клітин в 1 г, в дуже забруднених ґрунтах того ж типу кількість мікробів зростає в декілька разів.

Таблиця 2

**Критерії оцінювання санітарного стану ґрунту за основними мікробіологічними показниками \***

Категорія ґрунту	Мікробне число, млн. / 1 г	Титр			Кількість термофільних бактерій (на 1 г)
		кишкова паличка	нітрифікуючі бактерії	анаеробні бактерії ( <i>C.perfringens</i> )	
<b>Чистий</b>	1 □ 1,5	≥ 1,0	≥ 0,1	≥ 0,01	10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup>
<b>Забруднений</b>	2,5 □ 3	0,9 □ 0,01	9,0 · 10 <sup>-2</sup> □ 1,0 · 10 <sup>-3</sup>	9,0 · 10 <sup>-3</sup> □ 1,0 · 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>5</sup>
<b>Дуже забруднений</b>	≥ 3	≤ 9,0 · 10 <sup>-3</sup>	≤ 9,0 · 10 <sup>-4</sup>	≤ 9,0 · 10 <sup>-5</sup>	10 <sup>5</sup> □ 10 <sup>6</sup>

Санітарне значення мікробного числа ґрунту не можна розглядати без урахування особливостей різних типів ґрунтів. Наприклад, чорноземні ґрунти містять значно більше мікроорганізмів, ніж підзолисті. Тому при визначенні загальної кількості бактерій у ґрунті необхідно отримані результати порівнювати з мікробним числом незабруднених ґрунтів того ж типу.

Дослідження на пряме виявлення патогенних мікроорганізмів у ґрунті проводять тільки при наявності спеціальних вказівок. У якості непрямих показників можливого забруднення ґрунту патогенними бактеріями використовують санітарно-показові мікроорганізми: БГКП, *C. perfringens*, бактерії р. *Proteus*, термофіли. Наявність у ґрунті БГКП свідчить про фекальне забруднення ґрунту. На заражених ділянках колі-титр складає  $10^{-3}$  -  $10^{-5}$ , тоді як у чистих ґрунтах він може дорівнювати 1 і вище.

Виявлення *C. perfringens* у ґрунті також вказує на його фекальне забруднення. Ґрунтовий шар збагачується одночасно БГКП і *C. perfringens*. Через 4-5 місяців відмічається відмирання кишкових паличок, а *C. perfringens* ще виявляється в титрі 0,01.

Різні терміни виживання цих бактерій у ґрунті дозволяють визначити давність його забруднення фекаліями. Наявність *E. coli* та *E. faecalis* свідчить про свіже фекальне забруднення; виділення бактерій родів *Citrobacter* та *Enterobacter* – розцінюють як несвіже фекальне забруднення, а наявність *C. perfringens* – як давнє забруднення.

*C. perfringens* має санітарно-показове значення тільки в тому випадку, коли його титр визначають у комплексі з колі-титром та іншими показниками. Враховують також співвідношення кількості вегетативних форм *C. perfringens* і спор.

Виявлення у ґрунті бактерій роду *Proteus* свідчить про забруднення його органічними речовинами тваринного походження чи фекаліями людей.

Термофільні мікроорганізми є показниками забруднення ґрунту гноєм, компостом. У чистих ґрунтах термофіли не виявляються.

*Завдання для самостійної роботи:*

1) В зошит переписати перелік патогенних мікроорганізмів, які можуть зберігатися у ґрунті впродовж тривалого часу та тих, що зберігаються недовго.

2) Виписати, які захворювання людини та тварин можуть спричинювати мікроорганізми із наведеного в пункті 1 переліку. Якими є симптоми цих захворювань?

3) Занотувати критерії оцінювання санітарного стану ґрунту за основними мікробіологічними показниками.

## **Тема 7    Мікробний розклад природних речовин і синтетичних сполук** (2 год.)

**Мета заняття:** визначити властивості, які мають бути характерними для біодеградабельних полімерів; порівняти особливості руйнування природних полімерів та речовин антропогенного походження в оточуючому середовищі; окреслити круг речовин, які найлегше піддаються мікробній біотрансформації та деградації та таких, що руйнуються найважче, з метою визначення можливості створення матеріалів, які не будуть створювати екологічну небезпеку для довкілля.

### **План семінару:**

- Ї Розкладання мікроорганізмами целюлози та нафтопродуктів.
- Ї Мікробний розклад ксенобіотиків.
- Ї Участь мікроорганізмів у біотехнологіях розкладання отруйних речовин.

## **Загальні теоретичні відомості**

Природа в різний спосіб справляється з різними відходами. Органічні субстанції, наприклад, овочі та фрукти, розкладаються дуже швидко. Шкірки від помаранчів чи бананів вимагають більше часу, ніж недогризок яблука, оскільки містять субстанції, яких не знають бактерії, що присутні в нашому кліматі.

Сприятливими для процесів біодеградації в природному середовищі є: відповідна хімічна будова; відповідна фізична структура; менша молекулярна маса; більша водопоглинаюча здатність полімеру; відсутність сіткових зв'язків в полімері.

Перерахованим умовам у значній мірі відповідають полімери натурального походження, наприклад, крохмаль, целюлоза, натуральний шовк, які внаслідок дії ферментів, мікроорганізмів ззовні або всередині клітин піддаються біодеградації. Синтетичні полімери проявляють дуже диференційовану схильність до біодеградації і в переважній більшості несприйнятливі до неї.

Полімери можуть повністю піддаватися біодеградації з виділенням карбон діоксида, амоніаку, метану та води або частковій біодеградації, наприклад, одного зі складників синтетичного матеріалу. У такому разі маємо справу з біорозкладом.

Процес біорозкладу характерний для багатокomпонентних полімерів, де біодеградації підлягають допоміжні складники, наприклад, крохмаль чи целюлоза.

У зв'язку зі значним навантаженням на охорону довкілля, все більше робіт дослідників присвячені отриманню синтетичних матеріалів, які після використання підлягали б біодеградації.

Біодеградація є процесом розкладу синтетичних полімерів під впливом мікроорганізмів (наприклад, бактерій, дріжджів, грибів, плісняви) при відповідних температурах та вологості повітря. Зокрема, внаслідок

біодеградації порошків для прання чи розчинів для миття посуду шкідливі сполуки, що містяться в цих продуктах, розкладаються на нешкідливі.

Існує також поняття фотодегградації, коли функції мікроорганізмів чи грибів виконує ультрафіолет, який міститься в сонячному світлі і розкладає деякі синтетичні матеріали. Із таких матеріалів виготовляють, наприклад, одноразові столові прибори.

З огляду на те, як вони піддаються атаці мікроорганізмів, доступні на ринку полімери поділяють на декілька груп:

- недеградуєчі полімери, які цілковито відпорні до дії біологічних елементів;
- біодеградуєчі полімери — тобто такі, які під впливом мікроорганізмів повністю мінералізуються;
- біодисперсні, які є сумішшю недеградуєчих та біодеградуєчих полімерів.

До біодеградуєчих сполук відносять матеріали, які піддаються повній мінералізації протягом 180 днів. Першою групою біодеградуєчих полімерів є природні полімери. Джерелом цих полімерів є рослинні чи тваринні організми або мікроорганізми. Найпоширенішим полімером рослинного походження є *целюлоза*.

Більшість традиційних синтетичних матеріалів, які виробляють сьогодні, стійкі до впливу таких факторів як атмосфера, вода, ґрунт, випромінювання, температура. Саме ці властивості синтетичних матеріалів, внаслідок багаторічної модифікації їхніх властивостей, стали найбільшою проблемою. Тому спостерігається підвищений інтерес промисловців та споживачів до матеріалів, які після короткої експлуатації можуть розкладатися.

Розрізняють три основні механізми розкладу полімерів: фотохімічний, біологічний та хімічний.

Фотодеградації підлягають синтетичні полімери, що містять фрагменти, які абсорбують ультрафіолетові промені або добавки, чутливі до цих променів, які додаються до полімерів в кількості 0,1-1% маси. З економічних міркувань виробляють та використовують лише такі полімери, які мають здатність абсорбувати сонячні промені, наприклад, полістирен, поліетилен та поліпропілен. Під впливом випромінювання матеріали стають крихкими внаслідок розпаду під впливом хімічних або біологічних факторів, або можуть бути піддані наступному процесу фотохімічної деградації. З фотохімічно біодеградуємих матеріалів виготовляють упаковки та вироби одноразового вжитку, а також плівки, які застосовують у землеробстві.

Хімічний розклад полімерів відбувається під впливом спеціальних добавок, завдяки яким полімер стає більш вразливим до дії елементів, які знаходяться в ґрунті або воді. Процес розпочинається через деякий час залежно від виду та кількості доданих модифікаторів. Вони утворюють пероксиди під впливом кисню, які розпадаються на вільні радикали і реагують з полімерною матрицею, наприклад, поліетиленом.

До групи біологічно деградуємих полімери відносять два види полімерів:

1. Отримані з відновлювальної рослинної сировини, які в принципі не виявляють тенденції до швидкого розкладу. Їхній розвиток, на думку спеціалістів, приведе до зменшення навантаження на звалища, а також створює нові перспективи для землеробства, охорони середовища внаслідок адсорбції карбон двооксиду.
2. Отримані різними методами синтезу, котрі підлягають швидкому розкладу та мінералізації під впливом мікроорганізмів. Отримані хімічним або біологічним синтезом підлягають повній біодеградації, інколи аж до карбон двооксиду та води.

Окрім перерахованих вище полімерів існують також полімери, які частково деградуєми, наприклад, суміші синтетичних полімерів із добавками

крохмалю. Частково біодеградуєчі полімери відносять інколи до біорозкладальних, тобто таких, у яких лише деякі складники підлягають біодеградації, решта ж розпиленню в середовищі.

Біодеградація полімерів відбувається в чітко визначених умовах. Обов'язковими є присутність мікроорганізмів та поживного мінерального середовища, доступ кисню та вологи, відповідна для даних бактерій температура, а також рН в межах 5-8. Це складний процес, метою якого є подрібнення полімерного матеріалу з наступним послабленням його стійкості. Більшість синтетичних полімерів, в тому числі поліолефіни, полівінілхлорид, полістирен, поліметилметакрилат і термореактивні матеріали не піддаються впливу мікроорганізмів. Водночас природні полімери, такі як целюлоза, крохмаль, хітин, дуже вразливі до дії мікроорганізмів і підлягають повній біодеградації.

Біодеградація має місце внаслідок дії ферментів чи грибів, бактерій, плісняви тощо або субстанцій, які вони виробляють, на органічні матеріали. Мікроорганізми атакують також полімери і спричинюють їхнє механічне, хімічне чи ферментальне старіння.

Найважливішим деградаційним параметром є хімічна структура полімеру. Полімери, у яких головний ланцюг складається виключно з атомів карбону, біодеградації не піддаються. Піддаються впливу мікроорганізмів полімери, які мають в своєму основному ланцюзі карбоксильні, естерні групи або поліаміди, поліуретани, поліацетати тощо.

Біорозпошувальні полімери — це матеріали, які складаються з полімерів, що біодеградуєчі, та синтетичних полімерів, які не підлягають біодеградації. Біодеградуєчою складовою в них є крохмаль. Ці матеріали поділяють на дві групи: перша — матеріали, що містять 6-15 % крохмалю; друга — 40-60 %. В першій біодеградації підлягає лише поверхневий шар, в другій крохмаль повністю доступний для мікроорганізмів, які спричиняють його біодеградацію. В результаті біодеградації крохмалю отримана пориста



матриця матеріалу зі збільшеною поверхнею контакту з середовищем стає дуже крихкою і підлягає подрібненню. Матеріали, модифіковані крохмалем, використовують до виготовлення пакетів для покупок та відходів, упаковок, городнього інвентарю.

З розвитком хімічної промисловості в біосферу постійно потрапляють тисячі чужорідних докільню речовин — *ксенобіотиків*, які значною мірою забруднюють навколишнє середовище. На сьогодні навантаження на процеси самоочищення біосфери є надлишковим, внаслідок чого паралельно з деструкцією забруднень іде їх постійне накопичення. Отже, деградація ксенобіотиків – одна з важливих проблем захисту біосфери. Відмінною рисою деградабельних полімерів є збереження необхідних експлуатаційних параметрів протягом всього терміну їх використання в поєднанні з прискореною деградацією (гідролітичною, окиснювальною, фото-, термо-, механо- та біо-деструкцією) під дією різних природних факторів. *Саме мікроорганізми є головними біологічними системами, здатними руйнувати широкий спектр хімічно стійких сполук, тим самим, повертаючи головні поживні елементи у глобальні цикли та попереджуючи накопичення «мертвих» залишків у біосфері.*

Принципову схему процесу деградації полімерів у докільлі подано на рис. 5.

Деградація полімерних матеріалів відбувається у два етапи:

1 етап. *Фрагментація*. Полімерні макромолекули під дією різних факторів навколишнього середовища, в тому числі продуктів метаболізму мікроорганізмів, розпадаються на дрібні фрагменти з наступним використанням їх мікроорганізмами як поживного середовища. Цей процес приводить до видимого руйнування полімерів і утворення продуктів з ММ до 1000 а.о.м. (наприклад, ланцюг із 6 молекул глюкози).

2 етап. *Мінералізація*. Продукти фрагментації споживаються мікроорганізмами і в кінцевому результаті генерується вуглекислий газ і вода за аеробних або



Особливої актуальності деструктивна активність мікроорганізмів набула в останні десятиріччя у зв'язку із зростаючою присутністю в біосфері стійких до руйнування забрудників антропогенного походження, причому нерідко в масштабах, які набагато перевищують природну самоочисну здатність. Людині вдалося створити такі сполуки, які не руйнуються в природі в звичайних умовах. Це різноманітні синтетичні полімери, барвники, пестициди, фармакоцевтичні препарати, миючі засоби і т.д. Ці чужорідні для природних систем речовини (ксенобіотики) мають унікальну біологічну активність вже на рівні мікродомішок. В широкому сенсі до ксенобіотиків можуть бути віднесені також речовини природного походження, але отримані у надвеликих кількостях та переміщені до невласливих місць (наприклад, нафта). Більшість таких сполук характеризується значною стабільністю, а для їх повного розкладання за звичайних умов необхідні сторіччя. Відбувається також безперервне перенесення таких речовин по трофічних ланцюгах та їхнє накопичення на кінцевих ланках, до яких відноситься сама людина. Величезна кількість ксенобіотиків надзвичайно токсична та виявляє мутагенний, канцерогенний, алергічний та тератогенний вплив. Зрозуміло, що людство не може повністю відмовитись від використання даних речовин, оскільки вони використовуються практично в усіх галузях народного господарства. Тому *зараз на перший план виступає використання біоруйнуючих властивостей мікроорганізмів для очистки середовища від антропогенних забрудників.*

### **Біологічна активність і мікробіологічна рекультівація ґрунтів, забруднених нафтопродуктами**

Природний відновлення родючості ґрунтів при забрудненні нафтою відбувається значно довше, ніж при інших техногенних забрудненнях. Різко змінюється водопроникність внаслідок гідрофобізації, структурні окремо не змочуються, а вода ніби "провалюється" в нижні горизонти профілю ґрунту;

вологість зменшується. Як наслідок цього – випадання одного з головних ланок ценозу – рослинності.

Нафта і нафтопродукти викликають практично повну депресію функціональної активності флори і фауни. Пригнічується життєдіяльність більшості мікроорганізмів, включаючи їх ферментативну активність. Управління процесами біодеградації нафти повинно бути спрямоване, насамперед, на активізацію мікробних спільнот, створення оптимальних умов їхнього існування. Відзначається велика неоднорідність розподілу нафтових компонентів у ґрунтах різних ділянок нафтопромислів, що залежить від фізичних і хімічних властивостей конкретних ґрунтових ділянок, якості і складу нафти. В результаті цього самоочищення навколишнього середовища від токсичних органічних речовин техногенного походження в різних ландшафтних зонах і областях різняться.

Потрапляючи в ґрунт, нафта збільшує загальну кількість вуглецю. У складі гумусу зростає нерозчинний залишок, що є однією з причин погіршення родючості. Зростає відношення С: N. Погіршується азотний режим, що у разі рекультивації вимагає внесення підвищених доз азотних добрив. На окислення 1 г нафти потрібно 80 мг азоту і 8 мг фосфору. Рекомендується вносити масовані дози органічних добрив, що підвищує біохімічну і мікробіологічну активність ґрунтів, швидше знижує кількість залишкової нафти, ніж при внесенні одних мінеральних добрив.

Ґрунт, володіючи властивістю дисперсного гетерогенного тіла, діє як хроматографіческая колонка, в якій відбувається шаровий перерозподіл компонентів нафти. Показано, що пригнічення рослинності починається, коли кількість нафтових вуглеводнів в ґрунті стає вище 1 кг/м<sup>2</sup>.

*Виділяють три етапи процесу самоочищення ґрунту.*

**1-й етап** (1-1,5 року) характеризується фізико-хімічними процесами, що включають вимивання, вивітрювання, розподіл нафтових вуглеводнів

(НВ) по ґрунтовому профілю. Гинуть рослини. Спостерігається активізація мікрофлори.

**На 2-му етапі** (3-4 роки) відбувається біологічне перетворення метанонафтенних і ароматичних вуглеводнів.

**3-тій етап** включає деградацію поліциклічної ароматики.

На всіх етапах, а особливо на 3-му, необхідне активне розпушування ґрунту, внесення розпушувачів (наприклад, торфу), які сприяють зниженню вмісту аліфатичних структур у вуглеводнях. За силою токсичної дії на мікроорганізми нафтові фракції розташовуються в наступній спадній послідовності: ароматичні вуглеводні—циклопарафінова фракція—фракція парафінів.

Невелика кількість НВ (5 г/100 г ґрунту) стимулює діяльність мікрофлори. Проте, процес нітрифікації блокується будь-якою їхньою концентрацією; нітрифікація є найбільш чутливим процесом на "нафтове" забруднення ґрунту. Найбільш важливими умовами активної діяльності мікрофлори у присутності нафтових забруднень також є вологість і температура ґрунту.

Для активної рекультивації ґрунтів в якості основних і необхідних компонентів потрібні мінеральні добрива, переважно амонійні форми азоту і фосфор, а також активні культури нафтоокиснюючих мікроорганізмів (НОМ).

Внесення добрив у забруднений ґрунт (6% НВ) збільшує біологічну активність: зростає інтенсивність дихання, коефіцієнт мінералізації, активність ряду ферментів. Чутливість же окремих груп мікроорганізмів до окремих фракцій нафти визначається хімічним складом та фізичними властивостями останні.

Цікаво відзначити, що НВ, що потрапляють у ґрунт, збагачують його на вуглець і здатні підвищити активність біологічної азотфіксації. Збільшення інтенсивності нафтового забруднення (до кількох відсотків)

призводить до збільшення концентрації азоту, що є наслідком збільшення чисельності вільноживучих мікроорганізмів, які фіксують азот; одночасно знижується нітріфікуюча активність, і основна частина азоту існує в амонійній формі. Здатність до фіксації азоту азотобактером проявляється на середовищах з октаном, толуолом, саліцилатами. Виділено ряд бактерій (ноккардії, артробактер, бревібактерум), здатних засвоювати атмосферний азот; у деяких бактерій фіксація азоту була вище при культивуванні на середовищах з парафіном, ніж з сахарозою. У ґрунтах, що містять невелику кількість бітумних речовин (0,2 %), таких бактерій виявляється більше, ніж у чистих ґрунтах.

Таким чином, вплив нафти і окремих її продуктів на ґрунт і ґрунтоутворювальний процес досліджено досить докладно. Окиснення нафти починається відразу після її потрапляння в ґрунт. Швидкість зміни окремих НВ і групових фракцій залежить від природно-кліматичних зон і складу початкової нафти.

Технічні засоби не здатні забезпечити повного очищення забруднених нафтою об'єктів. Суттєву допомогу у вирішенні даного питання – очищення території від нафти – можуть надати біологічні засоби.

*Завдання для самостійної роботи:*

1) Виписати перелік мікроорганізмів, які є активними деструкторами природних речовин.

2) Такий само перелік скласти для мікроорганізмів-деструкторів ксенобіотиків, найбільш розповсюджених нині в якості забруднювачів довкілля. Провести порівняння двох списків. Знайти спільні риси та відмінності.

3) Провести класифікацію мікроорганізмів-деструкторів за типом руйнування ними певного хімічного зв'язку або структури.

**Тема 8**  
(1 год.)

**Мікробні біотехнології**

**Мета заняття:** визначити фактори, які можуть прямо чи опосередковано змінювати клімат та тепловий баланс Землі; проаналізувати сутність теорій, які на сьогоднішній день обґрунтовують можливість майбутнього потепління або похолодання клімату Землі; познайомитись з історією виникнення та використання отрут людиною; визначити основні шляхи та ризики надходження сильнодіючих отруйних речовин до організму людини.

**План семінару:**

- Ї Сучасні мікробні біотехнології
- Ї Біотехнології очистки води

**Загальні теоретичні відомості**

**Біотехнологія** (*Βιοτεχνολογία*, від грецького *bios* – життя, *techne* – мистецтво, майстерність і *logos* – слово, навчання), використання живих організмів і біологічних процесів у виробництві. Біотехнологія – міждисциплінарна галузь, що виникла на стику біологічних, хімічних і технічних наук. З розвитком біотехнології пов'язують вирішення глобальних проблем людства – ліквідацію нестачі продовольства, енергії, мінеральних ресурсів, поліпшення стану охорони здоров'я і якості навколишнього середовища.

**Історія біотехнології**

З найдавніших часів людина використовувала біотехнологічні процеси при хлібопеченні, готуванні кисломолочних продуктів, у виноробстві і т.п., але лише завдяки роботам Л. Пастера в середині 19 ст., що доказали зв'язок

процесів шумування з діяльністю мікроорганізмів, традиційна біотехнологія одержала наукову основу. У 40–50-ті роки 20 ст., коли був здійснений біосинтез пеніцилінів методами ферментації, почалася ера антибіотиків, що дала поштовх розвитку мікробіологічного синтезу і створенню мікробіологічної промисловості. У 60–70-ті р. 20 ст. почала бурхливо розвиватися клітинна інженерія.

### **Біотехнологія у виробництві**

Біотехнологічні процеси з використанням мікроорганізмів і ферментів уже на сучасному технічному рівні широко застосовують у харчовій промисловості. Промислове вирощування мікроорганізмів, рослинних і тваринних клітин використовують для одержання багатьох цінних сполук — ферментів, гормонів, амінокислот, вітамінів, антибіотиків, метанолу, органічних кислот (оцтової, лимонної, молочної) і т.д. За допомогою мікроорганізмів проводять біотрансформацію одних органічних сполук в інші (наприклад, сорбіта у фруктозу). Широке застосування в різноманітних виробництвах одержали іммобілізовані ферменти. А. С. Спіріним у 1985–1988 розроблені принципи безклітинного синтезу білка, коли замість клітин застосовуються спеціальні біореактори, що містять необхідний набір очищених клітинних компонентів. Цей метод дозволяє одержувати різні типи білків і може бути ефективним у виробництві.

Багато промислових технологій замінюються технологіями, що використовують ферменти і мікроорганізми. Такі біотехнологічні методи переробки сільськогосподарських, промислових і побутових відходів, очищення і використання стічних вод для одержання біогазу і добрив. У ряді країн за допомогою мікроорганізмів одержують етиловий спирт, що використовують як пальне для автомобілів (у Бразилії, де паливний спирт широко застосовується, його одержують із цукрового очерету й інших рослин). На спроможності різноманітних бактерій перетворювати метали в



розчинні сполуки або накопичувати їх у собі заснований вилучення багатьох металів із бідних руд або стічних вод.

### **Біотехнології очистки води**

Достойне місце мікроорганізми посіли і в сучасних процесах та технологіях, що використовуються для очистки стічних вод.

**Біологічне очищення стічних вод** є результатом функціонування системи активний мул–стічна вода, яка характеризується наявністю складної багаторівневої структури. Біологічне окислення становить основу цього процесу і є наслідком протікання великого комплексу взаємопов'язаних процесів різної складності: від елементних актів обміну електронів до складних взаємодій біоценозу з зовнішнім середовищем.

### **Біологічне очищення стічних вод: історична довідка**

Ще в містах стародавнього Єгипту, Греції та Риму існували каналізаційні системи, за якими відходи життєдіяльності людей і тварин транспортувалися у водойми – річки, озера і моря. У Стародавньому Римі перед скиданням у Тибр каналізаційні стоки накопичувалися і витримувалися в накопичувальному ставку-відстійнику – клоаці (*cloaca maxima*). У Середні століття цей досвід був у значній мірі забутий, помиї, екскременти людей і тварин, виливалися на міські вулиці і видалялися епізодично. Це було причиною забруднення і зараження джерел питної води і приводило до виникнення епідемій холери, тифу, амебної дизентерії та ін.

На початку 19 століття в Англії був винайдений туалет з водяним зливом (water closet, WC). Виникла очевидна необхідність в обробці стічних вод та запобіганню їх попадання в джерела питної води. Стічні води збирали і витримували у великих ємностях, осад використовували в якості добрив.

На початку двадцятого століття були розроблені інтенсивні системи очищення побутових стічних вод, включаючи поля зрошення, де вода

очищалася, фільтруючись через ґрунт, струменеві фільтри з щебеневим і піщаним завантаженням, а також резервуари з примусовою аерацією – аеротенки. Останні є основним вузлом сучасних станцій аеробного біологічного очищення міських стічних вод. Спочатку основною метою очищення стоків було їх знезараження. Розуміння важливості якісного очищення стічних вод для охорони природних водойм прийшло пізніше.

Проблема чистої води є однією з найактуальніших проблем початку століття. Для збереження місць забору питної води чистими необхідне якісне біологічне очищення стічних вод. В даний час розроблені і розвиваються *сучасні технології очищення стічних вод*. Найбільший інтерес і перспективу мають природні і найдешевші біологічні методи очищення, що представляють собою інтенсифікацію природних процесів розкладання органічних сполук мікроорганізмами в аеробних або анаеробних умовах.

### **Біологічне очищення стічних вод: основні принципи**

Біологічне очищення стічних вод передбачає практично повне розкладання органічних сполук у воді. За існуючими нормами, вміст органічних речовин в очищеній воді не повинен перевищувати 10 мг/л.

Деградація органічних речовин мікроорганізмами в аеробних і в анаеробних умовах здійснюється за різними енергетичними балансами сумарних реакцій. При аеробному біоокисленні глюкози 59% енергії, що міститься в ній, витрачається на приріст біомаси і 41% становлять теплові втрати. Цим обумовлюється активний ріст аеробних мікроорганізмів. Чим вища концентрація органічних речовин в оброблюваних стоках, тим сильніший розігрів, вища швидкість росту мікробної біомаси і накопичення надлишкового активного мулу. При анаеробній деградації глюкози з утворенням метану лише 8% енергії витрачається на приріст біомаси, 3% становлять теплові втрати і 89% переходить в метан. Анаеробні

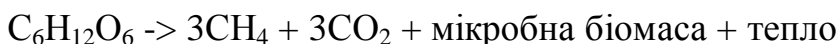
мікроорганізми ростуть повільно і потребують високої концентрації субстрату.

**Біологічне очищення стічних вод: аеробний процес**



Аеробна мікрофауна представлена різноманітними мікроорганізмами, в основному бактеріями, які окислюють різні органічні речовини в більшості випадків незалежно один від одного, хоча окислювання деяких речовин здійснюється шляхом співокислення (кометаболізм). Аеробна мікробна фауна активного мулу систем аеробного очищення води відзначається винятковим біорізноманіттям. В останні роки за допомогою нових молекулярно-біологічних методів, зокрема специфічних рРНК проб, в активному мулі показана присутність бактерій родів *Paracoccus*, *Caulobacter*, *Hyphomicrobium*, *Nitrobacter*, *Acinetobacter*, *Sphaerotilus*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Flexibacter*, *Halisomenobacter*, *Artrobacter*, *Corynebacterium*, *Microtrix*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*. Однак, вважається, що до теперішнього часу ідентифіковано не більше 5% видів мікроорганізмів, що беруть участь в аеробному біологічному очищенню стічних вод. Слід зазначити, що багато аеробних бактерій є факультативними анаеробами. Вони можуть рости при відсутності кисню за рахунок інших акцепторів електрона (анаеробне дихання) або бродіння (субстратне фосфорилування). Продуктами їхньої життєдіяльності є вуглекислота, водень, органічні кислоти і спирти.

**Біологічне очищення стічних вод: анаеробний процес**



Анаеробна деградація органічних речовин, при метаногенезі здійснюється як багатоступеневий процес, в якому необхідна участь щонайменше чотирьох груп мікроорганізмів: гідролітиків, бродильників, ацетогенів і метаногенів. У

анаеробній фауні між мікроорганізмами існують тісні і складні взаємозв'язки, що мають аналогії в багатоклітинних організмах, оскільки зважаючи на субстратну специфічність метаногенів, їх розвиток неможливий без трофічного зв'язку з бактеріями попередніх стадій. У свою чергу, метанові археї, використовуючи речовини, які продукуються первинними анаеробами, визначають швидкість реакцій, здійснюваних цими бактеріями. Ключову роль в анаеробній деградації органічних речовин до метану грають метанові археї родів *Methanosarcina*, *Methanosaeta* (*Methanothrix*), *Methanomicrobium* та інші. При їх відсутності або недостатці анаеробне розкладання закінчується на стадії кислотогенного і ацетогенного бродіння, що призводить до накопичення летких жирних кислот, в основному масляної, пропіонової і оцтової, зниження рН і зупинки процесу.

Перевагою аеробного біологічного очищення стічних вод є висока швидкість і використання речовин в низьких концентраціях. Суттєвими недоліками, особливо при обробці концентрованих стічних вод, є високі енерговитрати на аерацію і проблеми, пов'язані з обробкою та утилізацією великих кількостей надлишкового мулу. Аеробний процес використовується при очищенні побутових, деяких промислових і свинарських стічних вод з хімічним споживанням кисню не вище 2000 мг/л. Виключити вказані недоліки аеробних технологій може попередня анаеробна обробка концентрованих стічних вод методом метанового зброджування, яка не вимагає витрат енергії на аерацію і більше того пов'язана з утворенням цінного енергоносія – метану. Перевагою анаеробного процесу біологічного очищення стічних вод є також відносно незначне утворення мікробної біомаси. До недоліків слід віднести неможливість видалення органічних забруднень у низьких концентраціях. Для глибокого очищення концентрованих стічних вод анаеробну обробку слід використовувати в комбінації з подальшою аеробною стадією. Вибір технології та особливості обробки стічних вод визначаються вмістом органічних забруднень в них.

Стічні води великих міст і невеликих селищ значно відрізняються за концентрацією органічних забруднювачів. Вміст органічних забруднювачів у стічних водах великих міст не перевищує 500 мг/л, складаючи зазвичай 200-300 мг/л. Побутові стічні води невеликих населених пунктів містять більше органіки, від 500-1000 г/л і більше. У сучасних дачних і котеджних селищах часто туалетні і кухонні стічні води, які містять велику кількість органічних забруднень, відокремлюються від стоків ванних кімнат. Для очищення стічних вод котеджних селищ, які інтенсивно розвиваються, будуються локальні очисні споруди, для пуску яких і виведення на робочий режим необхідно використовувати активний мул міських станцій аерації або спеціальні мікробні препарати.

### **Біологічне очищення стічних вод: біопрепарати**

В даний час існує безліч біопрепаратів, що використовуються для біологічного очищення стічних вод. Це консорціуми мікроорганізмів, виділені методом накопичувальних культур зазвичай з активного мулу аеротенків міських споруд біологічного очищення стічних вод. Вони використовуються для очищення стічних вод місцевого значення, наприклад, у селах, дачних і котеджних селищах, невеликих селищах міського типу, міні-заводах і т.п. Біопрепарати, містять обмежену кількість видів мікроорганізмів і за спектром речовин, що утилізуються, поступаються свіжому активному мулу. Однак, вони містять штами, які швидко ростуть та ініціюють процеси розкладання органічних забруднень. У нестерильному процесі розвиваються також мікроорганізми, що містяться у відходах, і в мікробне співтовариство включаються відсутні ланки.

Дія мікроорганізмів біопрепаратів полягає в тому, що в процесі своєї життєдіяльності вони виробляють ферменти, які здатні, розщеплювати жири, білки та інші складні речовини органічного походження на більш прості органічні речовини, які легко розкладаються ними до вуглекислоти і простих

сполук азоту. Після додавання препарату зростає концентрація мікроорганізмів, а отже і ступінь очищення. Клітини мікроорганізмів іноді іммобілізують на твердому дисперсному носії, який може служити додатковим джерелом азоту і фосфору. Препарати містять асоціації 6-12 штамів аеробних і факультативно анаеробних мікроорганізмів, які забезпечують комплексну біологічну очистку стічних вод від органічних забруднювачів: жирів, білків, складних вуглеводів, і навіть (спеціалізовані) від нафтопродуктів. В якості поживних елементів біопрепарати містять солі азоту та фосфору, які стимулюють ріст мікроорганізмів і вироблення мікроорганізмами ліполітичних, амілазолітичних, карбогідразних, та ін. ферментів, що максимально полегшують розкладання органіки. Аналогічні біоактиватори, але з дещо іншим складом, застосовуються так само при виробництві компосту, в біотуалетах і т.п.

*Завдання для самостійної роботи:*

- 1) Повторити матеріал лекцій та практичних.
- 2) Підготуватись до заліку.

# Методика проведення розрахунків при мікробіологічному аналізі та санітарному аналізі води

## Задача № 1

Визначте кількість мікроорганізмів, що міститься в 1 г сухого ґрунту, якщо після розсіву ґрунтової бовтанки методом послідовних розведень з пробірки № 4 на чашках Петрі виросло: 32, 27, 36 та 45 колоній (паралельні досліди), а з пробірки № 5 – 8, 4, 5 та 6 колоній. Початкова вологість ґрунтових зразків складала 21%.

*Методичні вказівки до рішення:*

Оскільки найбільш достовірні результати при підрахунку колоній мікроорганізмів на чашках Петрі можна отримати при кількості колоній, що лежать у межах від 50 до 150, тому ми зупиняємося на результатах, які були отримані при висівах з пробірки № 4.

### Проведемо необхідні розрахунки:

із пробірки № 4 на чашці виросло в середньому 35 колоній (це означає, що в 1 мл суспензії, взятої з пробірки № 4 знаходиться 350 мікробних клітин).

Отже, у пробірці № 3 в 1 мл знаходиться 3 500 клітин мікроорганізмів;

у пробірці № 2 — " — 35 000 клітин;

у пробірці № 1 — " — 350 000 клітин;

а у колбочці — " — 3 500 000 клітин.

Таким чином, в 1 г вихідного (вологого) ґрунту містилося 35 000 000 клітин мікроорганізмів (або  $35 \cdot 10^6$  клітин).

Вологість ґрунту становить 21%, отже на 1 г вологого ґрунту припадає 0,79 г абсолютно сухого ґрунту (АСГ). Після складання відповідної пропорції, отримуємо формулу, де враховано поправку на вологість:

$$N_{АСГ} = \frac{N_{H_2O}}{V_{АСГ}}, \text{ де } N_{АСГ} - \text{кількість клітин мікроорганізмів у 1 г сухого ґрунту, } N_{H_2O} - \text{кількість}$$

мікробних клітин у 1 г вологого ґрунту,  $V_{АСГ}$  – вага сухого залишку після висушування 1 г ґрунту.

$$\text{Таким чином, отримуємо: } N_{АСГ} = \frac{35 \cdot 10^6}{0,79} \approx 4,4 \cdot 10^7 \text{ клітин.}$$

## Задача № 2

Визначте початкову вологість ґрунту, якщо після розсіву ґрунтової бовтанки методом послідовних розведень з пробірки № 3 на чашках Петрі виросло: 230, 224, 226 та 218 колоній (паралельні досліди), а з пробірки № 4 – 52, 61, 56 та 54 колоній. Загальна кількість мікроорганізмів на 1 г сухого ґрунту у даному досліді була встановлена на рівні  $76 \cdot 10^6$ .

*Методичні вказівки до рішення:*

Оскільки найбільш достовірні результати при підрахунку колоній мікроорганізмів на чашках Петрі можна отримати при кількості колоній, що лежать у межах від 50 до 150, тому ми зупиняємося на результатах, які були отримані при висівах з пробірки № 4.

### Проведемо необхідні розрахунки:

із пробірки № 4 на чашці виросло в середньому 56 колоній (це означає, що в 1 мл суспензії, взятої з пробірки № 4 знаходиться 560 мікробних клітин).

Отже, у пробірці № 3 в 1 мл знаходиться 5 600 клітин мікроорганізмів;  
у пробірці № 2 — " — 56 000 клітин;  
у пробірці № 1 — " — 560 000 клітин;  
а у колбочці — " — 5 600 000 клітин.

Таким чином, в 1 г вихідного (вологого) ґрунту містилося 56 000 000 клітин мікроорганізмів (або  $56 \cdot 10^6$  клітин).

Для визначення вологості ґрунтового зразку нам необхідно скласти пропорцію, що пов'язує кількість клітин мікроорганізмів у зразках вологого та абсолютно сухого ґрунту (АСГ). Після складання відповідної пропорції, отримуємо формулу, де враховано поправку на вологість:

$$N_{АСГ} = \frac{N_{H_2O}}{V_{АСГ}}, \text{ де } N_{АСГ} - \text{кількість клітин мікроорганізмів у 1 г сухого ґрунту, } N_{H_2O} - \text{кількість}$$

мікробних клітин у 1 г вологого ґрунту,  $V_{АСГ}$  – вага сухого залишку після висушування 1 г ґрунту.

$$\text{Таким чином, } V_{АСГ} = \frac{N_{H_2O}}{N_{АСГ}}.$$

Оскільки кількість мікробних клітин в 1 г сухого ґрунту відома, отримуємо:  $V_{АСГ} = \frac{56 \cdot 10^6}{76 \cdot 10^6} = 0,74$ .

Отже 1 г вологого ґрунту містить 0,74 г сухого залишку і, відповідно, вологість ґрунтового зразка складає 26%.

### Задача № 3

Розрахуйте колі-титр, колі-індекс та ступінь забрудненості бюветної води, якщо після проходження 500 мл цієї води через мембранний фільтр на середовищі Ендо утворилося 1 червона колонія з металевим блиском (чмб) та 1 рожева колонія (рж), результати перевірки яких на Грам-приналежність та методом бродильного тесту дали наступні результати:

Порядковий № культури	Колір колонії	Грам-приналежність	В результаті проходження бродильного тесту утворюються	
			кислота	газ
1	чмб	Г <sup>-</sup> (паличка)	+	+
2	рж	Г <sup>-</sup> (паличка)	+	+

Методичні вказівки до рішення:

Спочатку аналізуємо кількість колоній, що належать до групи кишкової палички. Для цього шукаємо ті з них, що мають три наступних ознаки: 1) на середовищі Ендо мають забарвлення від червоного з металевим блиском до рожевого, 2) є грамнегативними паличками та 3) в результаті бродильного тесту утворюють одночасно кислоту та газ.

Даним критеріям відповідає 2 колонії.

**Колі-індекс** – це кількість колі-бактерій у 1 л води, а **колі-титр** – кількість мл води, у яких нараховується 1 колі-бактерія.

Перераховуємо отриманий результат на 500 мл води, і отримуємо:

колі-індекс – 4;

колі-титр – 250.



Порівняємо отримані результати з табличними даними санітарної оцінки якості води (табл. 1). Як бачимо, бюветна вода, що аналізувалася, **відповідає** санітарним нормам якості для питної води лише для нецентралізованих джерел водопостачання.

### **Задача № 4**

Розрахуйте колі-титр, колі-індекс та ступінь забрудненості озерної води, якщо після проходження 100 мл цієї води через мембранний фільтр на середовищі Ендо утворилося 4 червоні колонії з металевим блиском (чмб), 2 червоні колонії без металевих блисків (ч) та 2 рожеві колонії (рж), результати перевірки яких на Грам-приналежність та методом бродильного тесту дали наступні результати:

Порядковий № культури	Колір колонії	Грам-приналежність	В результаті проходження бродильного тесту утворюються	
			кислота	газ
1	чмб	Г <sup>-</sup> (паличка)	+	+
2	чмб	Г <sup>-</sup> (паличка)	+	+
3	чмб	Г <sup>-</sup> (паличка)	+	+
4	чмб	Г <sup>-</sup> (паличка)	+	+
5	чмб	Г <sup>-</sup> (паличка)	+	+
6	ч	Г <sup>-</sup> (паличка)	+	+
7	рж	Г <sup>-</sup> (паличка)	+	-
8	рж	Г <sup>-</sup> (паличка)	+	+

*Методичні вказівки до рішення:*

Спочатку аналізуємо кількість колоній, що належать до групи кишкової палички. Для цього шукаємо ті з них, що мають три наступних ознаки: 1) на середовищі Ендо мають забарвлення від червоного з металевим блиском до рожевого, 2) є грамнегативними паличками та 3) в результаті бродильного тесту утворюють одночасно кислоту та газ.

Даним критеріям відповідає 7 колоній.

**Колі-індекс** – це кількість колі-бактерій у 1 л води, а **колі-титр** – кількість мл води, у яких нараховується 1 колі-бактерія.

Перераховуємо отриманий результат на 100 мл води, і отримуємо:

колі-індекс – 70;

колі-титр – 14.

Порівняємо отримані результати з табличними даними санітарної оцінки якості води (табл. 1). Як бачимо, взята на аналіз озерна вода відноситься до типу **дуже чиста**.

## СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Шлегель Г. Общая микробиология. – М.: Высшая школа, 1987. – 566 с.
2. Стейниер Р., Эдельберг Э., Ингрэм Дж. Мир микробов (в 3-х т.). – М.: Мир, 1979. – Т. 1. – 320 с.; Т. 2. – 334 с.; Т. 3 – 486 с.
3. Голубовская Э.К. Биологические основы очистки воды. – М.: Высшая школа, 1978. – 268 с.
4. Возная Н.Ф. Химия и микробиология воды. – М.: Высшая школа, 1979. – 340 с.
5. Роуз Э. Химическая микробиология. – М.: Мир, 1971. – 294 с.
6. Ротмистров М.Н., Гвоздяк П.И., Ставская С.С. Микробиология очистки воды. – Киев: Наукова думка, 1978. – 268 с.
7. Работнова И.Л. Общая микробиология. – М.: Высшая школа, 1966. – 271 с.
8. Большой практикум по микробиологии / Под ред. Г.Л. Селибер. – М.: Высшая школа, 1962. – 491 с.
9. Білай В.Й. Мікроорганізми – друзі й вороги людини. – Київ: Наукова думка, 1982. – 149 с.
10. Андреев Е.И., Козлова И.А. Литотрофные бактерии и микробиологическая коррозия. – Киев: Наукова думка, 1977. – 163 с.
11. Митчел Р. Микробиология загрязненных вод. – М.: Медицина, 1976. – 319 с.
12. Мишустин Е.Н., Емцев В.Т. Микробиология. – М.: Колос, 1970. – 343 с.
13. Таширев А.Б. Взаимодействие микроорганизмов с металлами // Микробиологический журнал. – 1996. – Т. 57, № 2. – С. 95–101.
14. Голубовская Э.К. Методические указания к лабораторным работам по микробиологии с элементами УИРС (для студентов специальности 1217 – очистка природных и сточных вод) – Л., 1978. – 41 с.

## ПЕРЕЛІК ПИТАНЬ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Загальна характеристика мікроорганізмів та відмінності між про- та еукаріотами.
2. Сучасна класифікація мікроорганізмів та її еволюція.
3. Мікроорганізми в житті людини. Зв'язок мікробіології та екології.
4. Хімічний склад бактеріальної клітини: вода і сухий залишок. Хімічні елементи та мінеральні речовини.
5. Біополімери в складі бактеріальної клітини (білки, вуглеводи, ліпіди, нуклеїнові кислоти). Функції біополімерів.
6. Будова клітинної стінки бактерій.
7. Взаємодія барвників із структурами бактеріальної клітини. Методи фарбування.
8. Правила роботи з оптичним мікроскопом. Складові частини мікроскопу.
9. Виготовлення препаратів мікроорганізмів.
10. Морфологія мікроорганізмів.
11. Кулясті бактерії (коки).
12. Паличковидні бактерії.
13. Спорові та неспорові палички.
14. Звивчасті та нитчасті бактерії.
15. Дріжджі, плісняві гриби.
16. Ферменти мікроорганізмів, їх біологічна роль.
17. Класифікація ферментів мікроорганізмів. Використання ферментів для ідентифікації бактерій.
18. Використання ферментів бактерій в біотехнології.
19. Типи поживних середовищ для вирощування мікроорганізмів: рідкі та тверді, природні та штучні, загальноживані (МПА, МПБ), спеціальні (елективні), диференційно-діагностичні.
20. Ріст та розмноження бактерій. Фази розвитку стаціонарної культури.
21. Методи культивування мікроорганізмів. Періодичне та безперервне культивування.
22. Форми взаємовідносин між мікроорганізмами в біоценозах.
23. Відношення мікроорганізмів до екстремальних факторів середовища.
24. Відношення мікроорганізмів до температурного режиму.
25. Відношення мікроорганізмів до рН середовища та тиску.

26. Методи антисептики. Антисептичні препарати.
27. Дезінфекція. Фізичні методи дезінфекції.
28. Хімічні методи дезінфекції. Основні групи дезінфектантів.
29. Методи стерилізації. Їх класифікація.
30. Пастеризація та тиндалізація. Переваги та умови застосування.
31. Елективні середовища та метод накопичувальної культури.
32. Ідентифікація чистих культур мікроорганізмів за морфологічними, культуральними та біохімічними ознаками. Схема опису мікроорганізмів.
33. Шляхи отримання енергії мікроорганізмами.
34. Класифікація бактерій за типом живлення та отримання енергії.
35. Фототрофні мікроорганізми.
36. Хемолітотрофні бактерії.
37. Процеси неповного окислення.
38. Цикл трикарбонових кислот.
39. Бродіння як тип метаболізму та отримання енергії. Типи бродінь.
40. Фізіологічні групи мікроорганізмів.
41. Роль мікроорганізмів в кругообігу азоту.
42. Процес амоніфікації та його збудники.
43. Природна нітрифікація та мікроорганізми, які її здійснюють.
44. Мікробна денітрифікація.
45. Мікробіологічні процеси в кругообігу сірки.
46. Аеробний і анаеробний мікробний розклад целюлози.
47. Мікроорганізми повітря. Методи виділення.
48. Мікрофлора природних вод. Фактори самоочищення водоймищ.
49. Загальне мікробне число як санітарно-епідеміологічний показник безпеки об'єктів зовнішнього середовища.
50. Санітарно-показові мікроорганізми. Вимоги до них. Титр та індекс санітарно-показових мікроорганізмів.
51. Кишкова паличка як показник фекального забруднення води і ґрунту. Нормування бактерій групи кишкової палички у воді.
52. Санітарно-бактеріологічне дослідження води.
53. Джерела мікробного забруднення водойм. Кишкова група бактерій.
54. Методи знезараження води.
55. Ґрунт як середовище перебування мікроорганізмів і продукт їх життєдіяльності.

56. Мікрофлора ґрунту. Фізіологічні групи мікроорганізмів ґрунту.
57. Мікрозональність ґрунтового середовища. Процес утворення гумусу.
58. Самоочищення ґрунту від органічних забруднень.
59. Розкладання мікроорганізмами целюлози та нафтопродуктів.
60. Біотехнології очистки води.
61. Продуктори антибіотиків. Бактерії, актиноміцети, гриби. Методи виділення. Методи визначення антибіотичної активності.
62. Сучасні мікробні біотехнології. Одержання мікробного білка, амінокислот, ферментів, вітамінів з мікроорганізмів.
63. Отримання лікарських засобів біотехнологічними методами. Інші шляхи використання мікробіології у наукових дослідженнях та народно-господарському секторі.

Таблиця 3.

**Санітарна оцінка води при визначенні її якості  
методом мембранних фільтрів  
(за Голубовская Э.К., 1978 та Асонов Н.Р., 1975)**

Х а р а к т е р и с т и к а в о д и	Загальна кількість бактерій (в 1 мл води)	Бактерії групи кишкової палички	
		Колі-титр	Колі-індекс
<b>П и т н а в о д а *</b>			
<b>Водогінна вода</b> (міста з населенням більше 1 млн. чол.)	$\leq 100$	$\geq 500$	$\leq 2$
<b>Водогінна вода</b> (міста з населенням менше 1 млн. чол.)	$\leq 100$	$\geq 300$	$\leq 3$
<b>Колодязна вода</b> (нецентралізовані джерела водопостачання)	$\leq 500$	200–300	3–5
<b>В о д а в і д к р и т и х в о д о й м</b>			
Д у ж е ч и с т а	$< 10^2$	100–10	10–100
Ч и с т а	$< 10^3$	10–1	100–1000
П о м і р н о з а б р у д н е н а	$< 10^4$	1–0,05	$1 \cdot 10^3$ – $2 \cdot 10^4$
З а б р у д н е н а	$< 10^5$	0,05–0,005	$2 \cdot 10^4$ – $2 \cdot 10^5$
Б р у д н а	$< 10^6$	0,005–0,001	$2 \cdot 10^5$ – $1 \cdot 10^6$
Д у ж е б р у д н а (непридатна для використання)	$> 9 \cdot 10^6$	$< 0,001$	$> 1 \cdot 10^6$

\* Вода з гіршими показниками вважається неякісною та непридатною для пиття.