



Лапчук І.В., Татарчук Т.Р.

Мікробіологічний аналіз води

УДК 579.68

Рекомендовано до друку Вченою радою факультету природничих наук «Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника» (протокол № _ від _ червня 2023 року).

Рецензенти:

Шийчук Олександр Васильович, професор кафедри хімії Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника, доктор хімічних наук, професор.

Солтис Любов Михайлівна, завідувач навчальними лабораторіями кафедри хімії Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника, кандидат хімічних наук.

Лапчук І.В., Татарчук Т.Р. Мікробіологічний аналіз води: [Електронний ресурс] / *Іванна Василівна Лапчук, Тетяна Романівна Татарчук. Мікробіологічний аналіз води* / Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника. – Івано-Франківськ, 2023. – 34 с.

Навчальний посібник містить короткий конспект лекції «Мікробіологічний аналіз води» та інструкцію до лабораторної роботи з курсу «Технології очищення води». Посібник складається з наступних розділів: мікробіологічне забруднення води, причини забруднення, основні бактеріальні захворювання, що передаються через питну воду, методи ідентифікації мікроорганізмів, способи визначення кількості бактерій, порядок виконання лабораторної роботи з визначення ступеня забруднення води і кількості бактерій *E. coli* (кишкової палички) та приклади графічного представлення результатів дезінфекції води за механізмом Фентона. Описано порядок виконання лабораторної роботи, а саме: посів бактерій *Escherichia coli*, розведення бактеріальних суспензій, ідентифікацію кишкової палички та підрахунок колоній *Escherichia coli*. Навчальний посібник призначений для студентів та аспірантів, які навчаються за спеціальністю 102 Хімія.

© Лапчук І.В., Татарчук Т.Р., 2023

© Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника, 2023

Зміст

Мікробіологічне забруднення води.....	4
Хто такі мікроорганізми?.....	5
Країни з найбільш забрудненими водоймами.....	6
Причини мікробіологічного забруднення води.....	7
Основні бактеріальні захворювання, що передаються через питну воду.....	8
Методи ідентифікації мікроорганізмів: хромогенні середовища та мікроскопія, біохімічні та молекулярні методи.....	9
Як відбираються проби для мікробіологічного дослідження?.....	10
Способи визначення кількості бактерій у воді.....	11
Способи підрахунку бактерій.....	12
Лабораторна робота.....	18
Порядок виконання роботи: посів <i>Escherichia coli</i>	19
Розведення бактеріальних суспензій	20
Приклад кількісного визначення бактерій <i>E. coli</i> за допомогою каталітичного розкладу H_2O_2 та каталізатора гематиту шляхом підрахунку колоній.....	25
Способи графічного представлення результатів підрахунку бактерій.....	26
Приклад графічного представлення результатів інактивації <i>E. coli</i> в процесі Фентона....	27
Список використаних джерел.....	33



Мікробіологічне забруднення води



Сьогодні мікробіологічні дослідження дозволяють уникати безлічі проблем. Вони важливі в багатьох областях діяльності людини, так як дають можливість з'ясувати, наскільки досліджувані матеріали відповідають загальноприйнятим санітарно-епідеміологічним нормам.

Мікробіологічні дослідження дозволяють виявити і ідентифікувати збудників захворювань в людському, тваринному організмі, в навколишньому середовищі. При цьому знайдені бактерії вивчаються, з'ясовується їх вид і перевіряється, наскільки вони стійкі до антимікробних засобів. Мікробіологічний аналіз необхідний, як для постановки точного діагнозу, так і для перевірки навколишнього простору на безпеку його для людини.

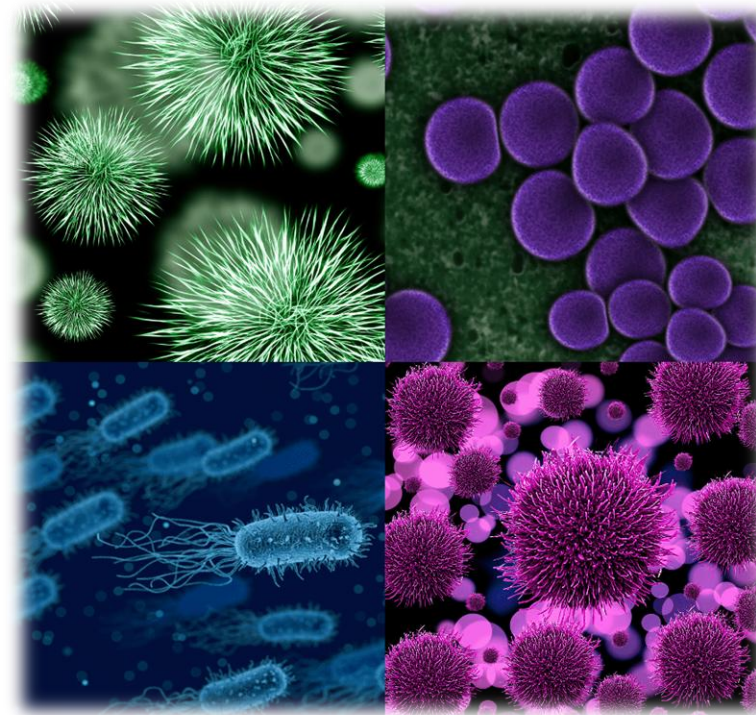


Хто такі мікроорганізми?

Мікроорганізми — це живі істоти з розмірами в діапазоні мікронів (мікрометрів) або менше. Мікроби приблизно в десять разів менші за середню товщину людського волосся, і їх неможливо побачити без допомоги мікроскопів. Мікроорганізми, які здатні завдавати шкоди своїм господарям та викликати захворювання, називаються патогенними.



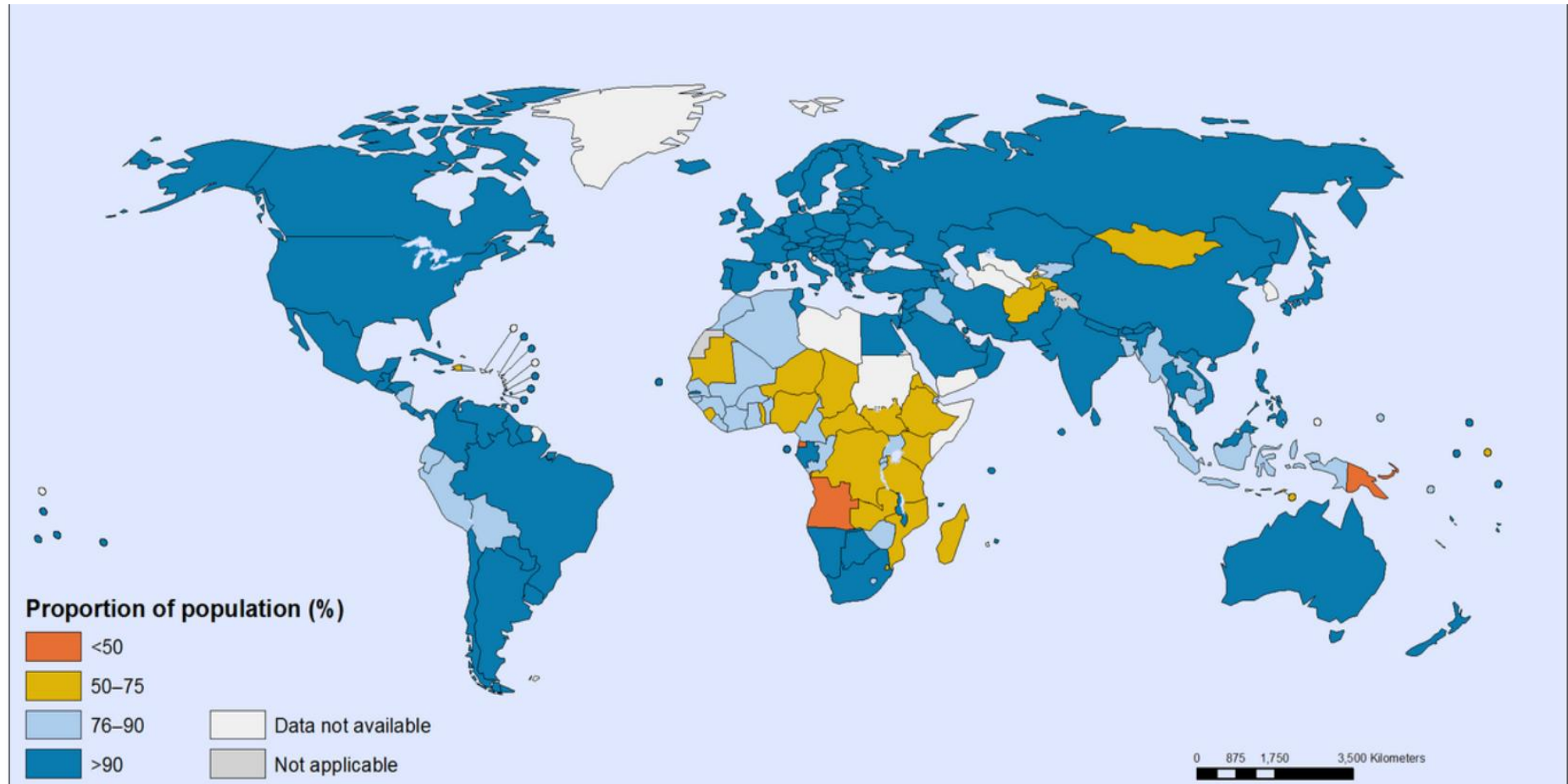
Велике призматичне гаряче джерело, Єллоустонський національний парк. Різні бактерії при різних температурах створюють кольори веселки [1]



Зображення різних видів мікроорганізмів під мікроскопом [1]

Країни з найбільш забрудненими водоймами

В країнах Африки більшість населення використовує річки, озера, ставки та зрошувальні канали як їхнє основне джерело води. Ці джерела, ймовірно, забруднені мікробними клітинами, оскільки 80% стічних вод, які утворюються в результаті діяльності людини, скидаються в поверхневі води без очищення, тим самим підвищуючи ризики захворювань, що передаються через воду.

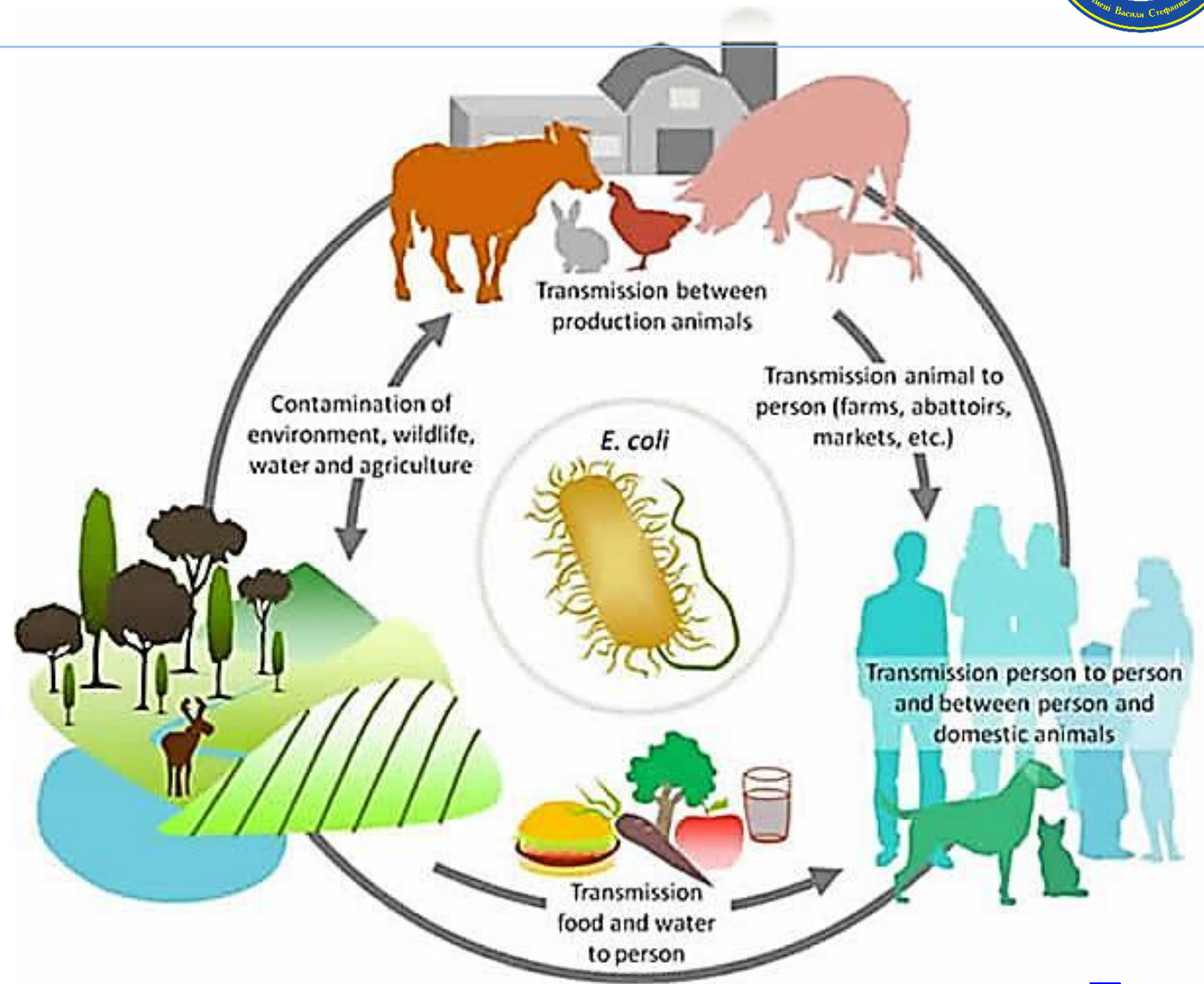


Частка населення країн, що використовують покращене джерело питної води станом на 2015 рік [2]

Причини мікробіологічного забруднення води

Найпоширенішими способами потрапляння бактерій у воду є неналежна очистка води, переповнення стічних вод, неправильна робота каналізаційної системи, сільськогосподарські стоки, стоки медичних закладів, повені та в деяких випадках зміни фізичних і хімічних властивостей води.

Несправні системи трубопроводів у розподільній мережі можуть призвести до появи патогенів у питній воді. Патогенні бактерії можуть бути причиною різноманітних захворювань, таких як гастроентерит або інфекційна діарея, пневмонія, інфекції сечовивідних шляхів, легіонельоз, черевний тиф, кампілобактеріоз і холера [3].



Основні бактеріальні захворювання, що передаються через питну воду

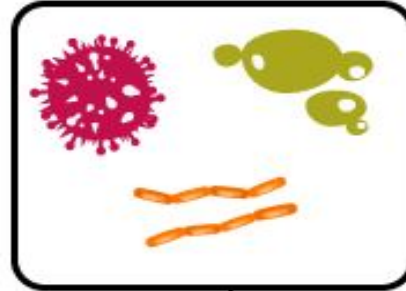


Захворювання [4]	Збудник бактерій [4]
Холера	<i>Vibrio cholerae</i> , serovarieties O1 і O139
Гастроентерит, спричинений вібріонами	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Черевний тиф та інші важкі форми сальмонельозу	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Paratyphi <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium
Гострі діареї та гастроентерити	<i>Escherichia coli</i> , зокрема такі серотипи, як O148, O157 і O124
Шигельоз	<i>Shigella dysenteriae</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Shigella boydii</i> <i>Shigella sonnei</i>

Методи ідентифікації мікроорганізмів: хромогенні середовища та мікроскопія, біохімічні та молекулярні методи



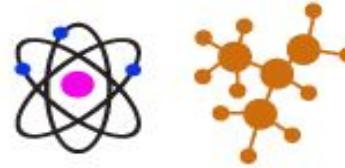
MICROORGANISM IDENTIFICATION



Phylogenetic classification
(e.g. chromogenic media: pH, carbohydrate/ gas production, etc)



Microscopy methods
(e.g. Bright/Dark Field, SEM, TEM, CLSM, ATM, Inverted Microscopy, etc)



Biochemical techniques
(Spectroscopy (e.g. FTIR, Raman), Mass Spectrometry (e.g. MALDI, LC, GC), Electrokinetic separation, etc)



Molecular Methods
(e.g. PCR, Sequencing, FISH, Ribotyping...)

Як відбираються проби для мікробіологічного дослідження?



Для відбору матеріалу використовується тільки стерильний лабораторний посуд

Проби відбираються в стерильних умовах наскільки це можливо.

В місце дослідження зразки слід доставити якнайшвидше. Якщо виникає необхідність, то використовуються холодильні бокси.

Способи визначення кількості бактерій у воді



Підрахунок бактерій визначається як процес визначення кількості бактерій у даному зразку. Існує багато причин, чому дослідникам доводиться обчислювати кількість бактерій або порівнювати зростаючу кількість цих мікробів за певних конкретних умов. Це є частиною роботи в мікробіологічних лабораторіях.

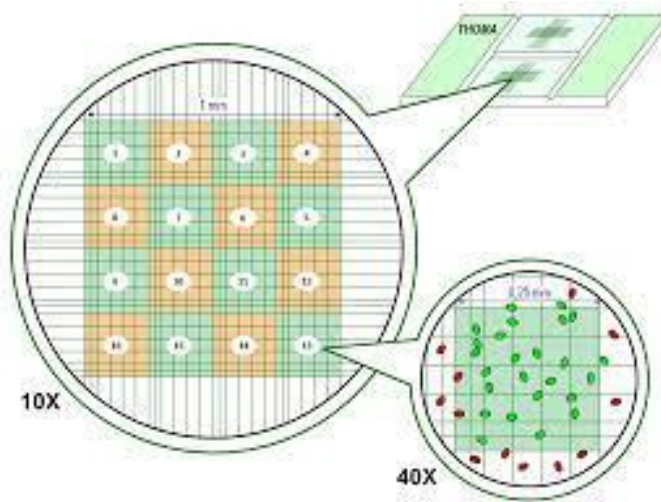


Способи підрахунку бактерій

Підрахунок бактерій поділяється на чотири категорії:

1. *Прямий підрахунок клітин:*

За даного процесу підраховується кількість бактерій у рідкому середовищі або колоній на чашці. У цьому процесі лічильні камери використовуються для безпосереднього підрахунку кількості бактерій під мікроскопом.



Лічильні камери

2. Непрямий підрахунок клітин:

Цей процес не включає прямий підрахунок кількості бактеріальних клітин, однак розраховуються бактеріальні колонії, за допомогою яких оцінюється концентрація бактеріальних клітин у даному зразку методом підрахунку колоній.

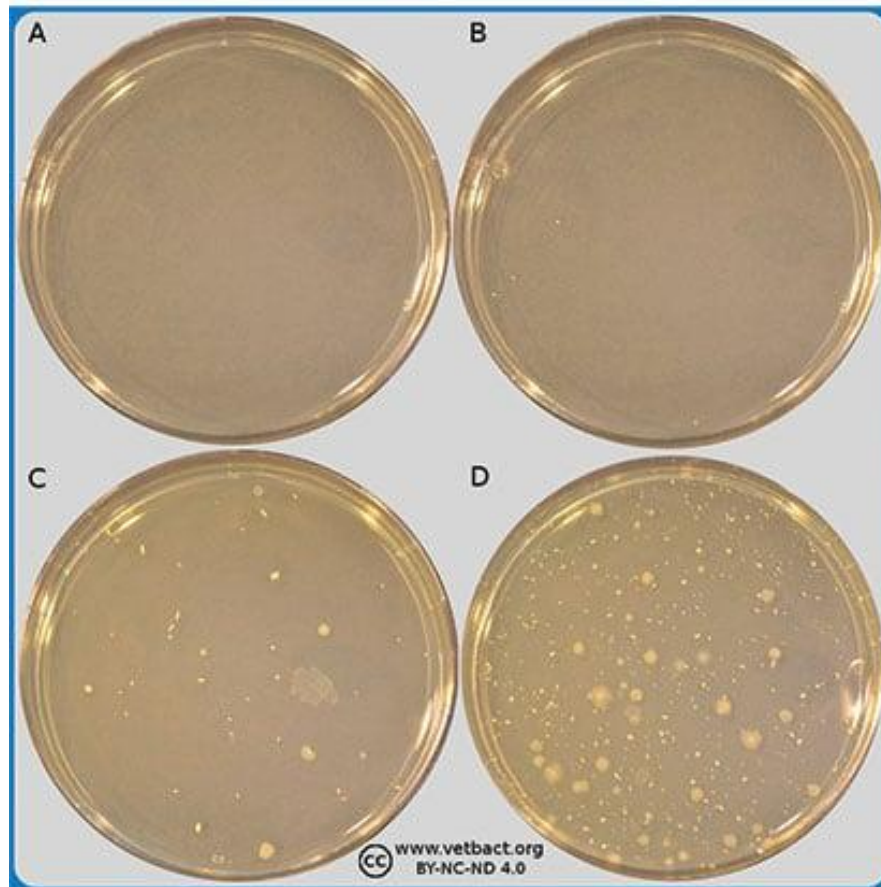
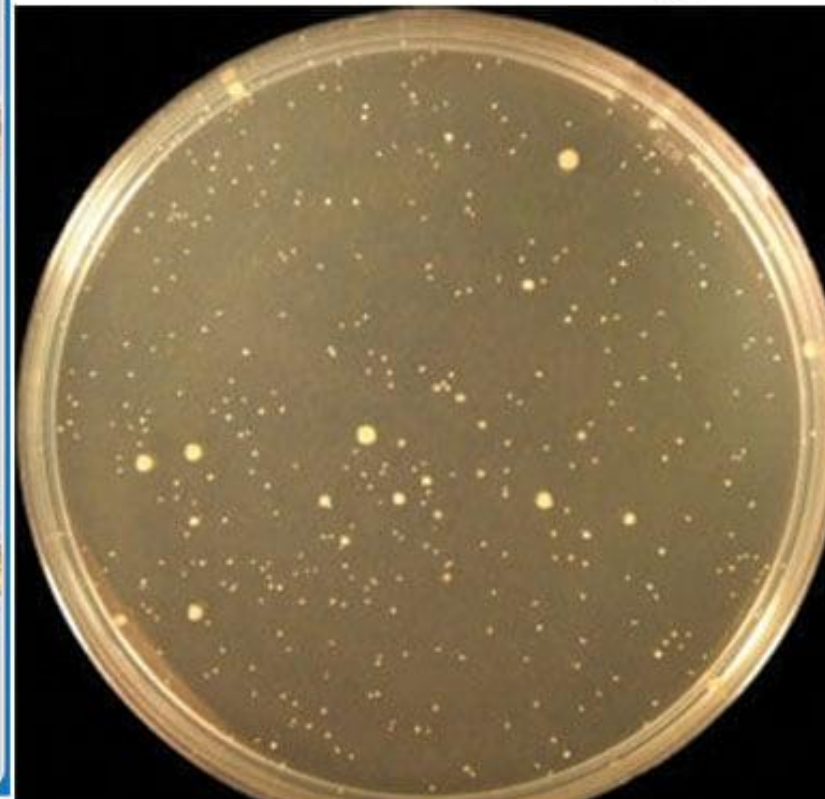
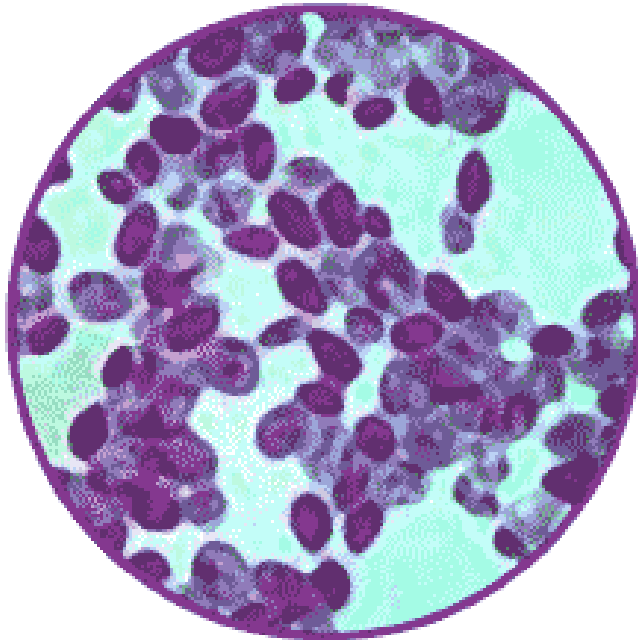


Plate Count Agar

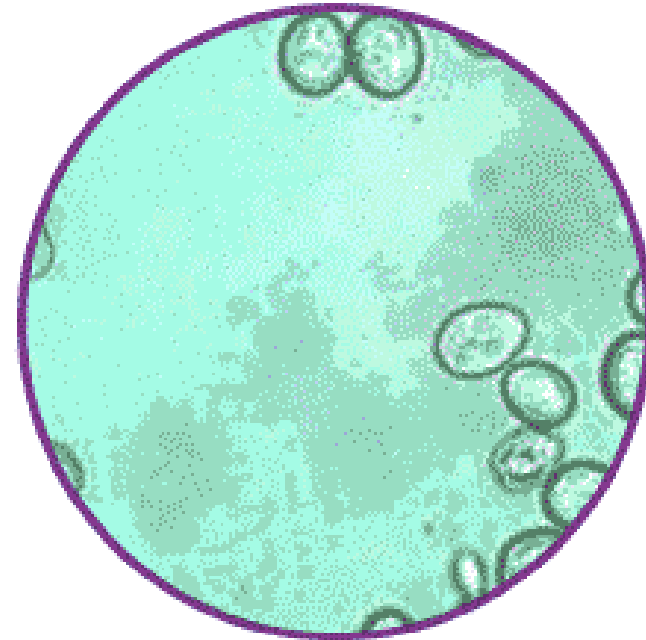


3. Підрахунок кількості життєздатних клітин:

Це підрахунок бактеріальних клітин, які є метаболічно активними та активно ростуть у культуральному середовищі.



Нежиттєздатні клітини



Життєздатні клітини

4. Підрахунок загальної кількості клітин:

Включає підрахунок загальної кількості бактеріальних клітин, включаючи як метаболічно активні, так і метаболічно неактивні/мертві мікроби.

Ці чотири категорії оцінки кількості бактерій експериментально виконуються чотирма способами:

- **Прямий/життєздатний метод:**

стандартний метод підрахунку колоній, у якому багаторазові розведення зразка визначають кількість життєздатних клітин бактерій у даному зразку. Використовується під час розрахунку кількості бактерій у клітинних вакцинах або молоці

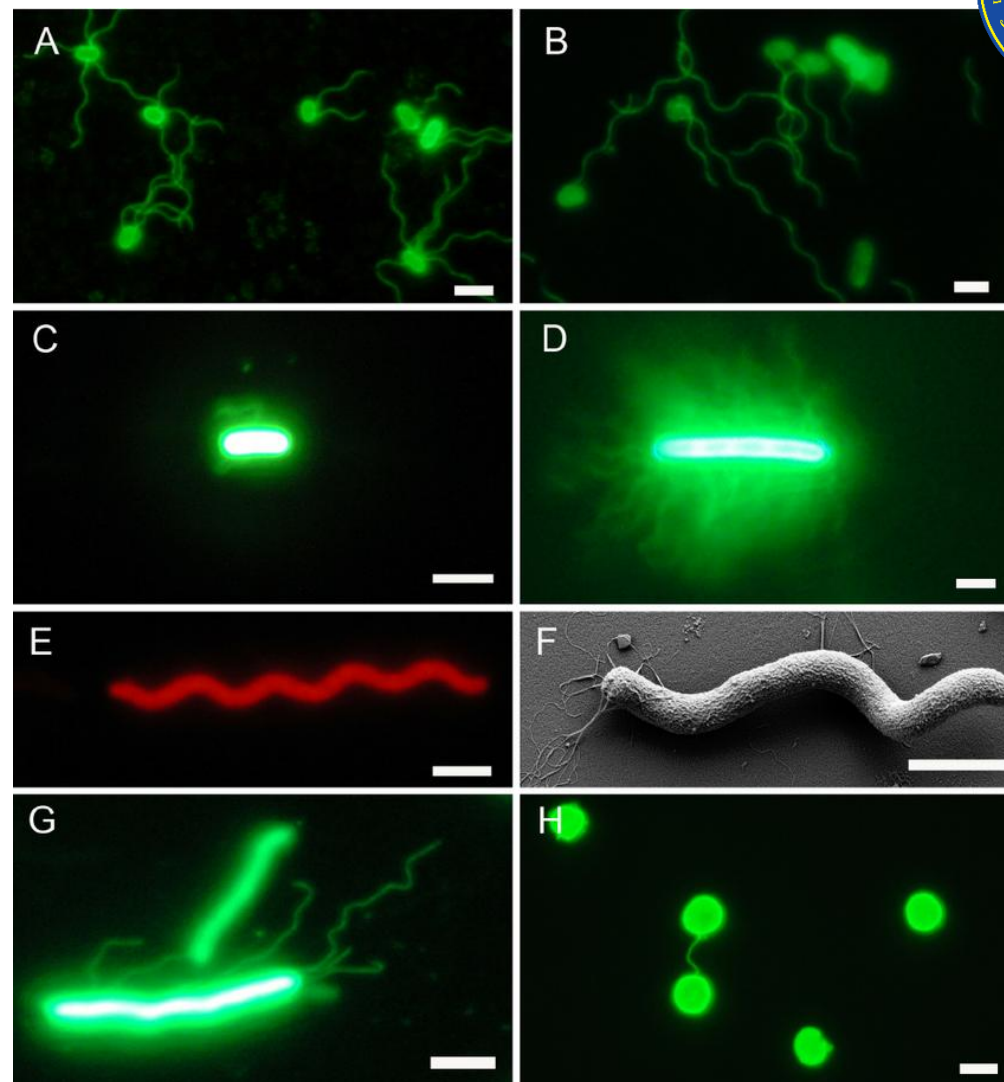
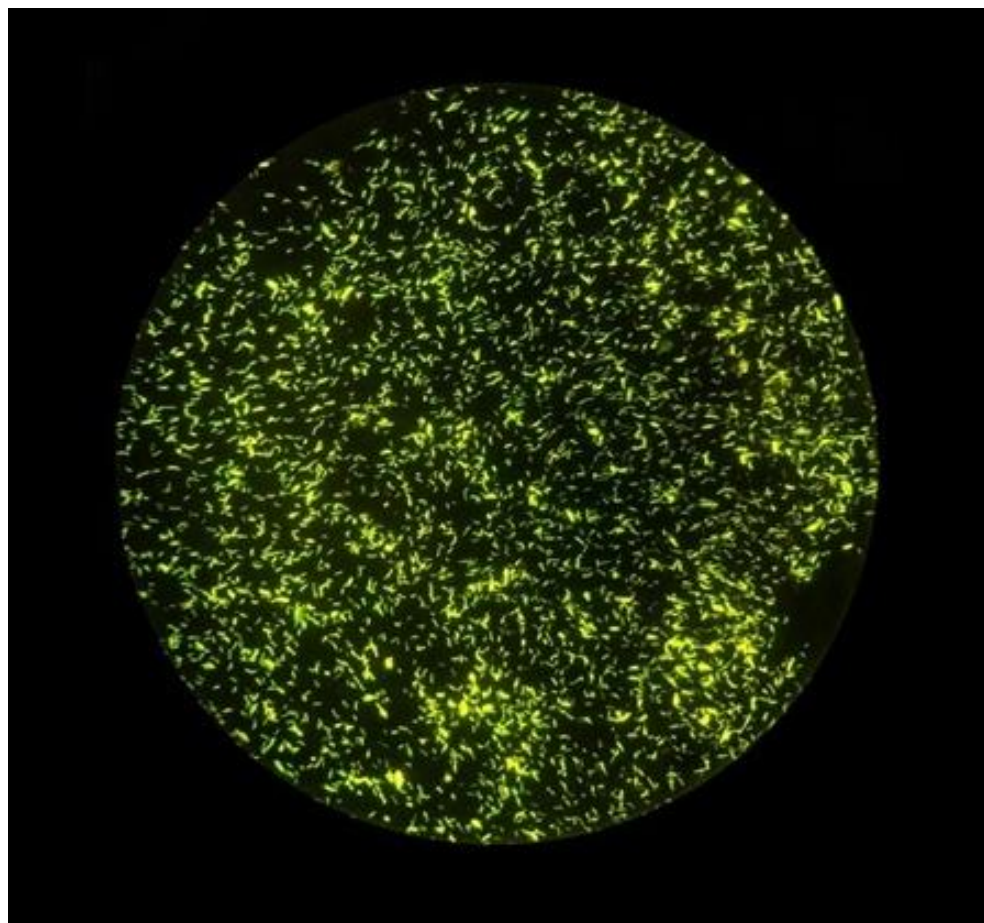
- **Непрямий/життєздатний метод :**

статистичний висновок про мікробну кількість на основі моделей росту. Враховується при підрахунку концентрації бактерій у ґрунті, лабораторних культурах або воді.

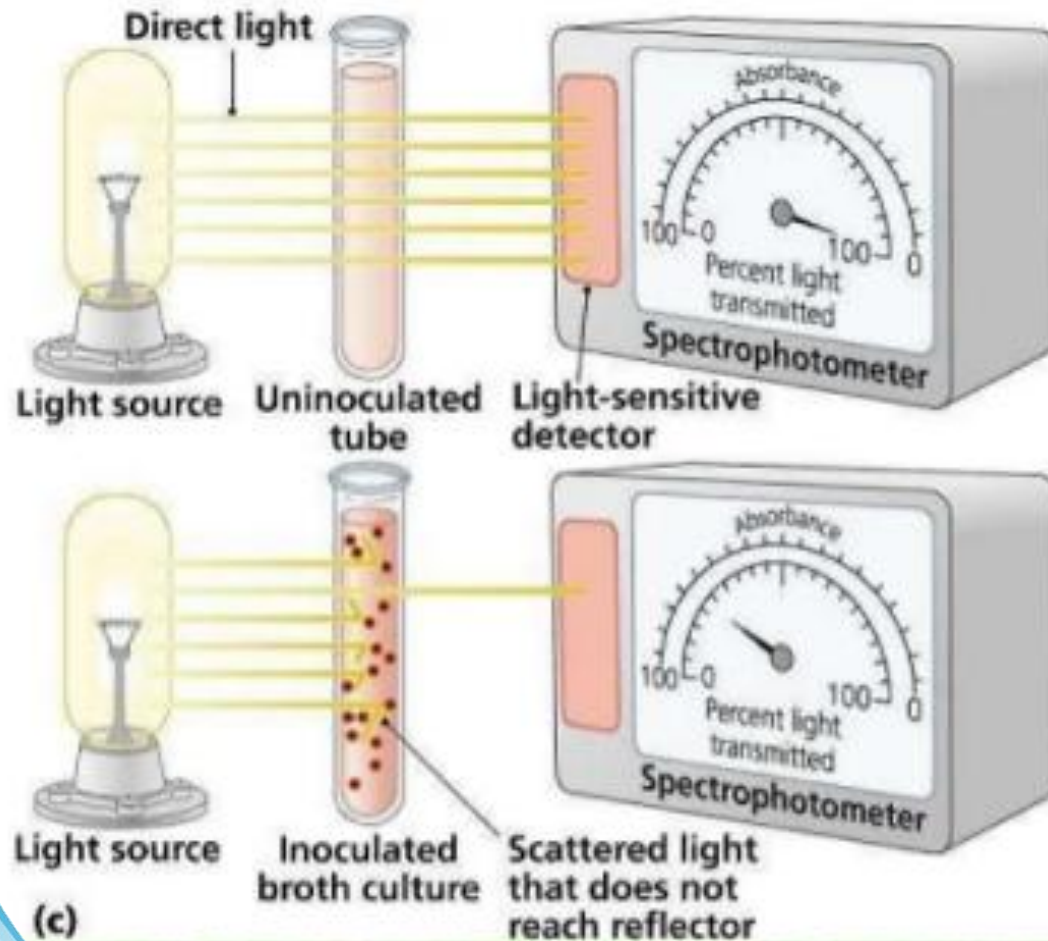


- **Прямий/загальний:**

використовуються флуоресцентні барвники, щоб зробити бактеріальні клітини видимими за допомогою флуоресцентного мікроскопа для підрахунку бактерій у пробі.

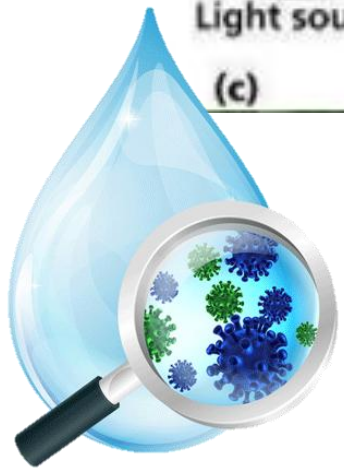


Використання сукцинімідових ефірів флуоресцентних барвників для забарвлення клітинних поверхонь та **16** поверхневих відростків бактерій *E. coli* [5]



- **Непрямий/загальний метод:**

спектроскопія розглядається як непрямий/загальний підрахунок. За допомогою спектрофотометра кількість світла, що пройшла через культуру, використовується для оцінки кількості присутніх мікробів [6].



Лабораторна робота

Тема: Мікробіологічний аналіз води

Мета: опанувати мікробіологічний аналіз води, навчитися визначати ступінь забруднення води та кількість бактерій *E. coli* (кишкової палички) у воді.

Обладнання: спиртівки, штативи, стерильні чашки Петрі, бактеріологічні петлі, термостат, мембранні фільтри, культура кишкової палички, 0,9% р-н NaCl, живильне середовище – агар, Ендо

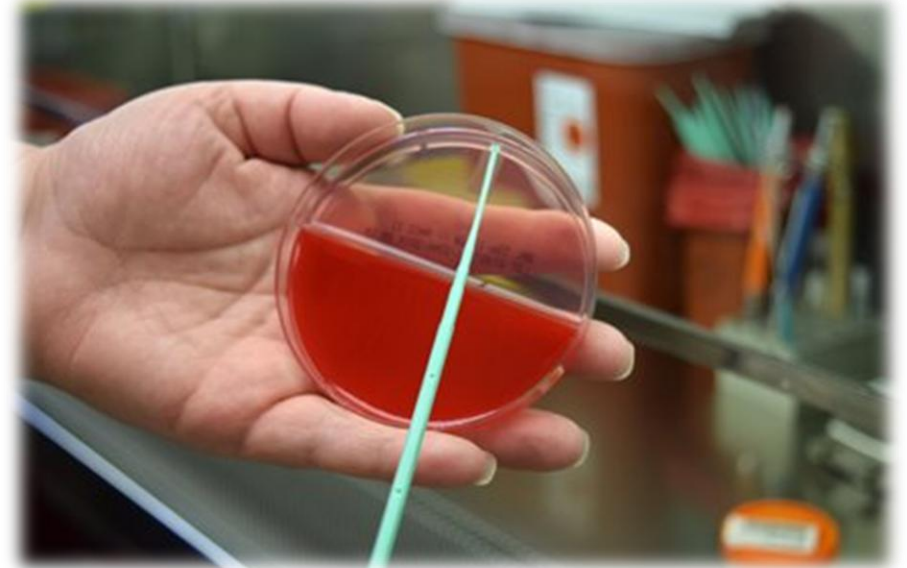


Порядок виконання роботи

1. Посів бактерій *Escherichia coli*

У лабораторних умовах штам бактерій *Escherichia coli* висівають на стерильне живильне агарове середовище за добу до проведення експерименту, оскільки при тривалому зберіганні мікроорганізмів у лабораторних умовах може відбутися зміна фізіологічних характеристик.

Посів на чашку Петрі здійснюють штрихоподібними рухами бактеріологічною петлею, яку перед та після використання прожарюють в полум'ї пальника, тобто стерилізують. Після посіву чашку Петрі у перевернутому вигляді потрібно помістити в термостат для культивування при температурі 37°C на 24 год.



2. Розведення бактеріальних суспензій

Готують бактеріальну суспензію в 0,9 % розчині NaCl.

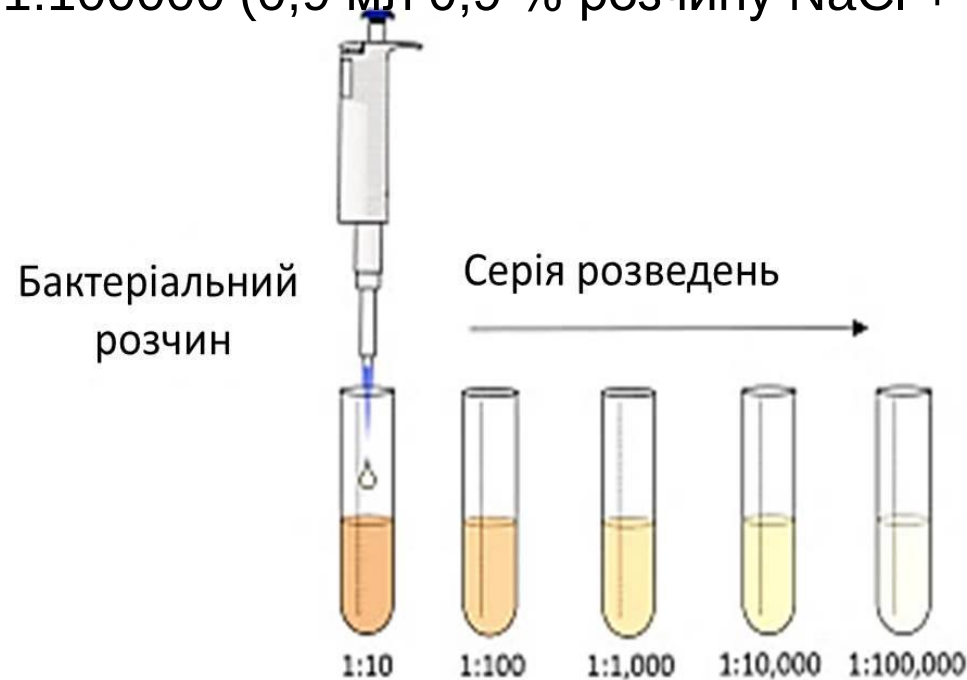
Для цього культуру, що виросла на твердому живильному середовищі відбирають та поміщають у пробірку з фізіологічним розчином, змивають в рідину, попередньо розтираючи по внутрішнім стінкам пробірки.

Суспензію культури стандартизують по бактеріальному стандарту мутності (еталон 10 (10 од. мутності або 1 млрд. бактерій в 1 мл).



З цієї суспензії готуються наступні розведення до потрібної концентрації:

- 1:10 (0,9 мл 0,9 % розчину NaCl + 0,1 мл суспензії);
- 1:100 (0,9 мл 0,9 % розчину NaCl + 0,1 мл суспензії 1:10);
- 1:1000 (0,9 мл 0,9 % розчину NaCl + 0,1 мл суспензії 1:100);
- 1:10000 (0,9 мл 0,9 % розчину NaCl + 0,1 мл суспензії 1:1000);
- 1:100000 (0,9 мл 0,9 % розчину NaCl + 0,1 мл суспензії 1:10000)

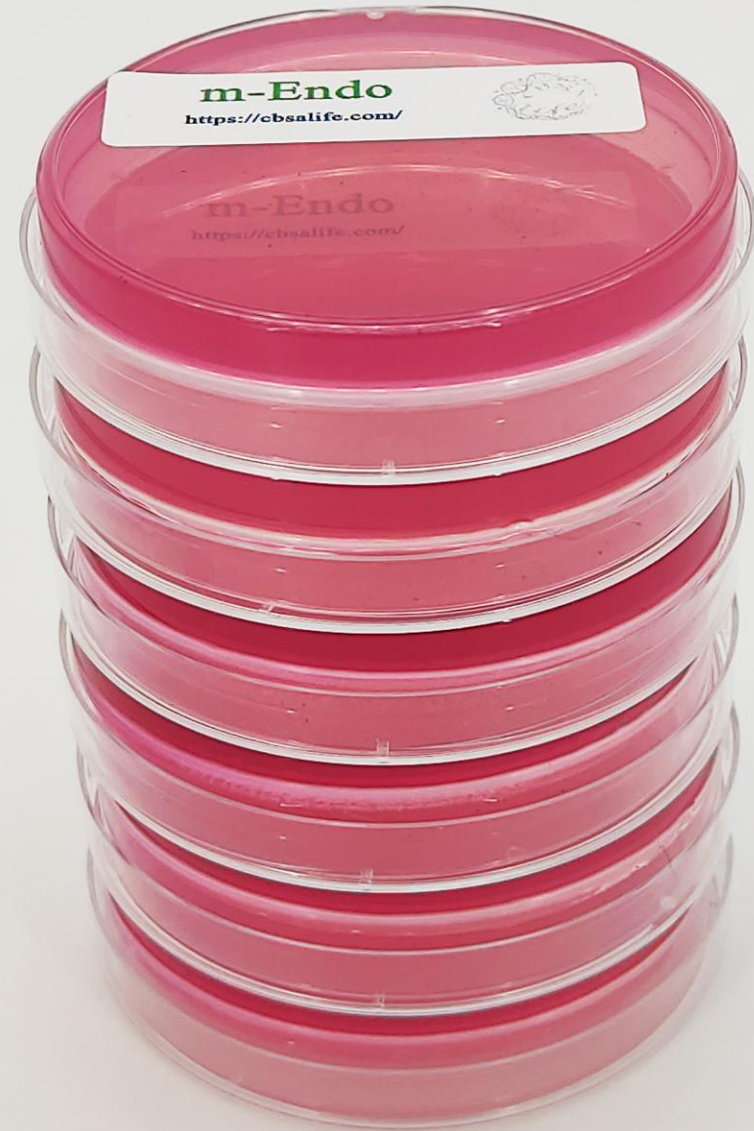


Ступінь розведення досліджуваного зразка визначається передбачуваною кількістю мікроорганізмів в зразку. Відповідно число розведень тим більше, чим більше мікроорганізмів в вихідному субстраті

Ідентифікація бактерій відбувається при посіві розведених суспензій на живильне середовище Ендо.

Посів роблять з певних розведень залежно від передбачуваної кількості мікроорганізмів в досліджуваному субстраті. Стерильною піпеткою наносять певний об'єм (зазвичай 0,1 або 1 мл) відповідного розведення, заздалегідь ретельно перемішаного, на поверхню мембранного фільтру, який поміщають на живильне середовище Ендо, що використовується для виявлення *Escherichia coli* за здатністю ферментувати лактозу.

Згодом чашки Петрі витримують у термостаті за температури 37°C впродовж 24 год.



Механізм даного живильного середовища полягає в здатності фуксину утворювати безбарвний комплекс з сульфітом. В результаті можуть утворюватись типи бактерій, що не ферментують лактозу і утворюватимуть безбарвні колонії та види, що ферментують бактерії і утворюють характерні темно-червоні колонії з металевим блиском (*E. coli*).





Утворені колонії червоного забарвлення на мембранному фільтрі підраховують в КУО/л (колонієутворюючі одиниці).

За санітарними нормами в питній воді бактерій кишкової палички не повинно бути!

Середовище Ендо та мембранні фільтри
з утвореними колоніями бактерій
кишкової палички

Приклад кількісного визначення бактерій *E. coli* за допомогою каталітичного розкладу H_2O_2 та каталізатора гематиту шляхом підрахунку колоній

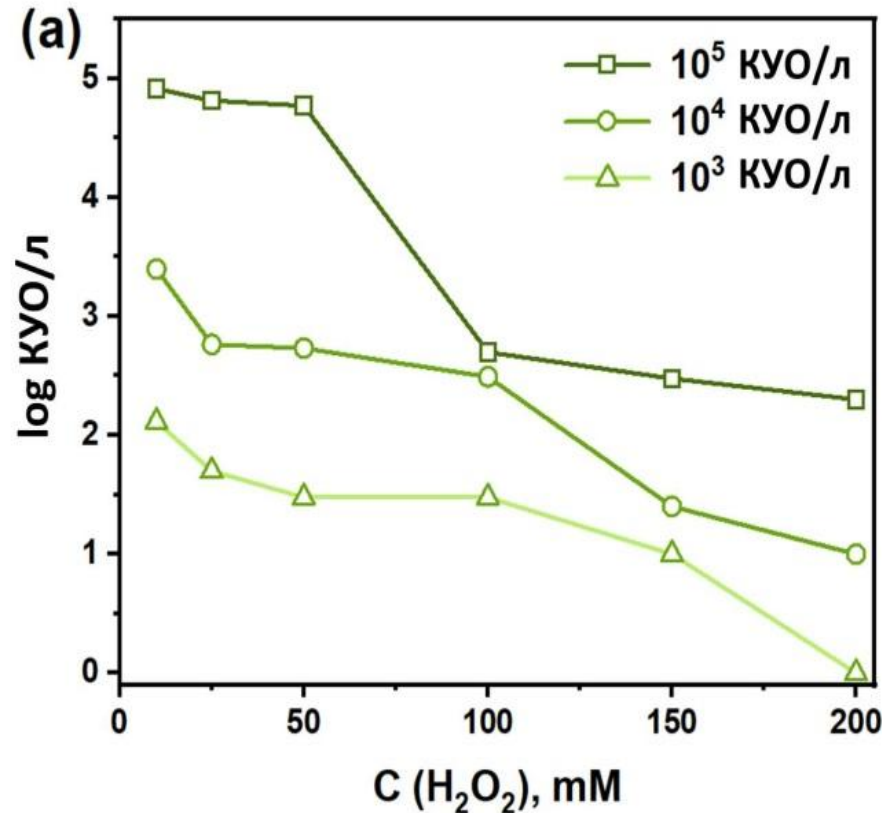


КУО/л	контроль <i>E. coli</i>	Каталізатор Fe_2O_3	H_2O_2 (50 мМ)	каталізатор + 10 мМ H_2O_2	каталізатор + 25 мМ H_2O_2	каталізатор + 50 мМ H_2O_2	каталізатор + 100 мМ H_2O_2	каталізатор + 150 мМ H_2O_2	каталізатор + 200 мМ H_2O_2
10^3									
10^4									
10^5									

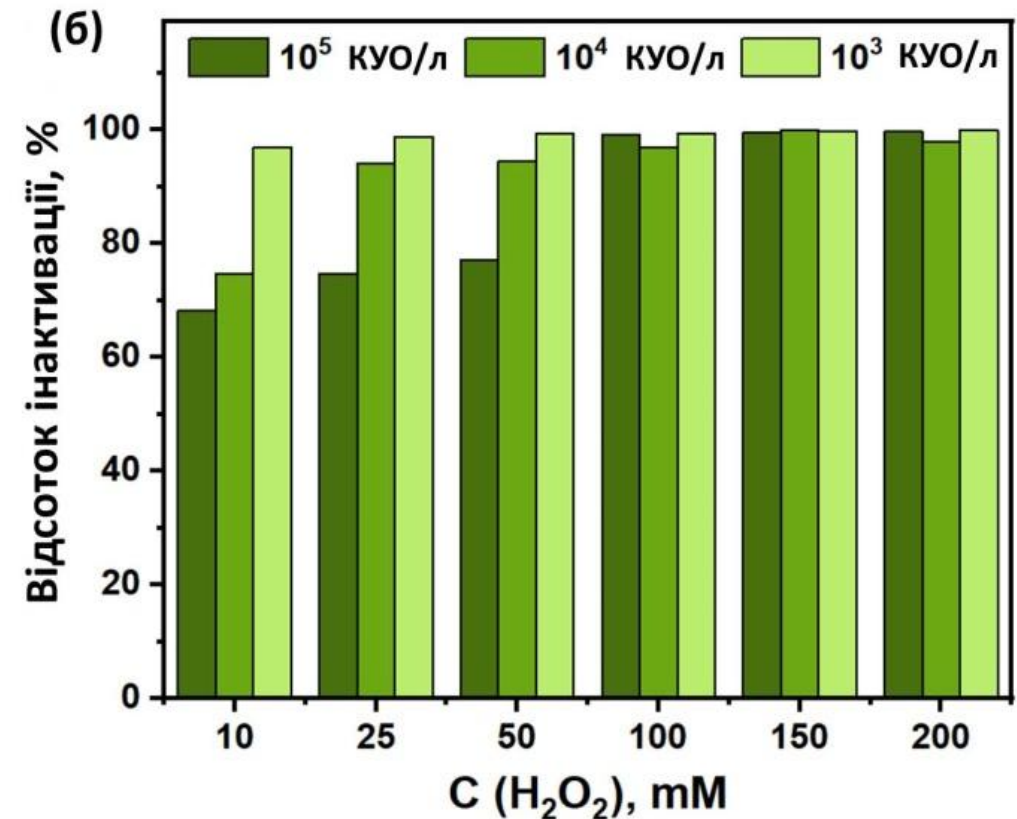
Добре відомо, що активні форми кисню (АФК) руйнують клітинні стінки бактерій. Цей підхід можна використовувати для знезараження води. Гематитовий каталізатор може розкласти пероксид водню H_2O_2 , викликаючи утворення радикалів, які дезінфікують воду.

Зображення мембранних фільтрів із залишковими колоніями бактерій [7].

Способи графічного представлення результатів підрахунку бактерій



Кількість бактерій на виході з реактора в залежності від кількості бактерій і концентрації H₂O₂ на вході [7]

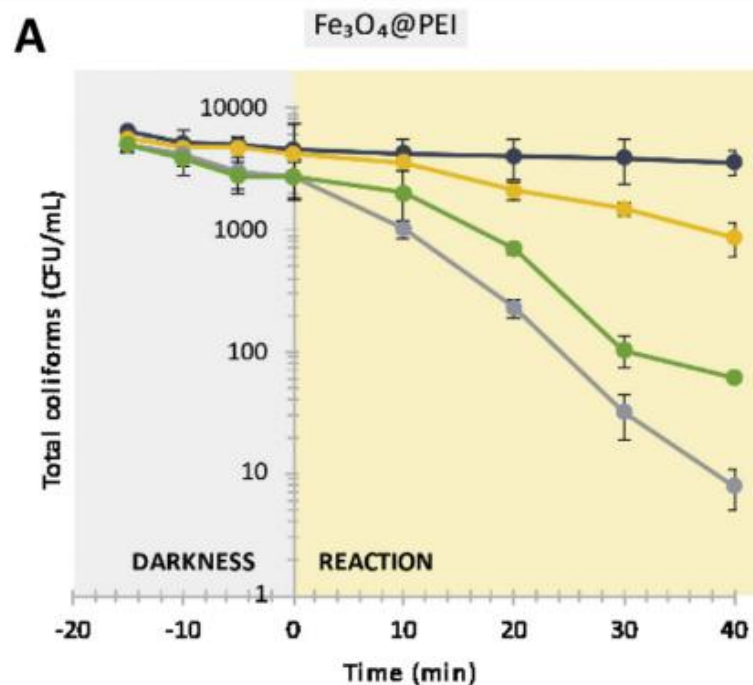


Ефективність дезінфекції, виражена у % [7].

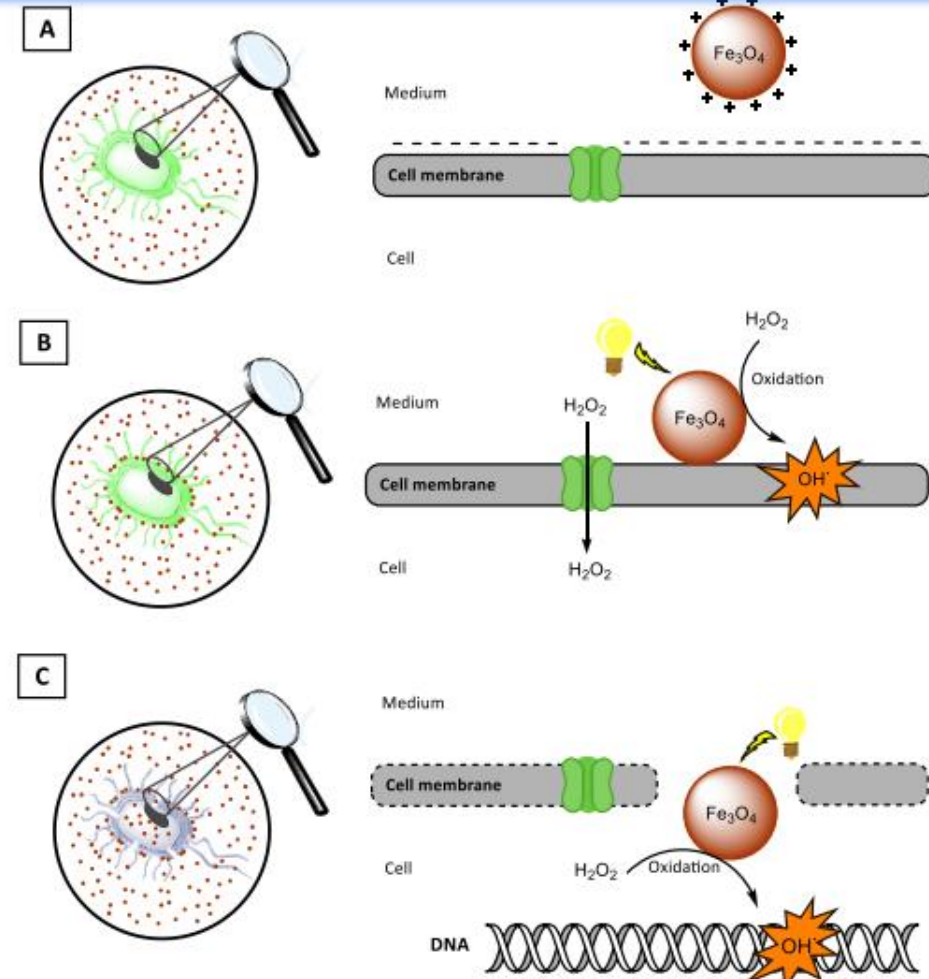
Приклад графічного представлення результатів інактивації *E. coli* в процесі Фентона



Використання магнітних наночастинок у фотокаталізі Фентона для дезінфекції води від кишкової палички, яка присутня в муніципальних стічних водах [8]



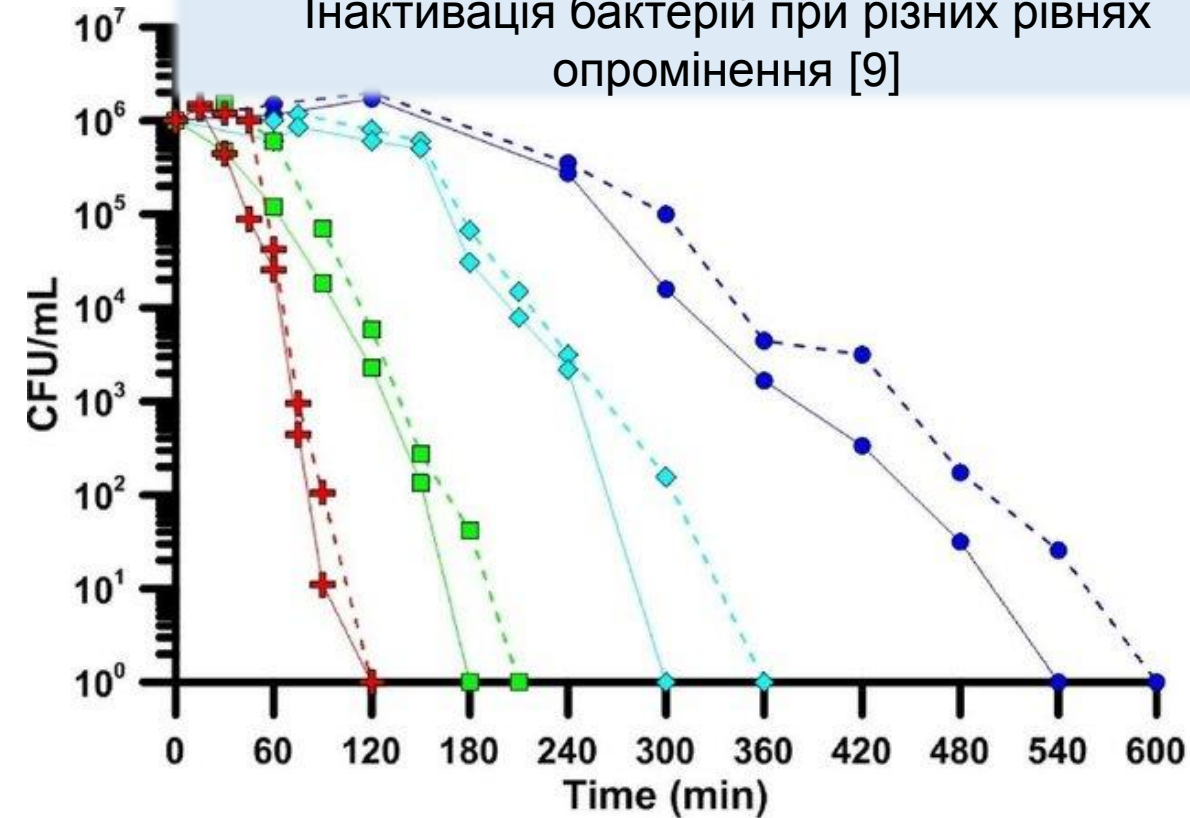
Інактивація *E. coli* за допомогою процесів Фентона (зелений колір) і фото-Фентона (сірий) у видимому світлі з використанням наночастинок із концентрацією Fe_3O_4 (50 мг/л) і H_2O_2 (10 мг/л).



Приклад графічного представлення результатів інактивації *E. coli* в процесі фото-Фентона



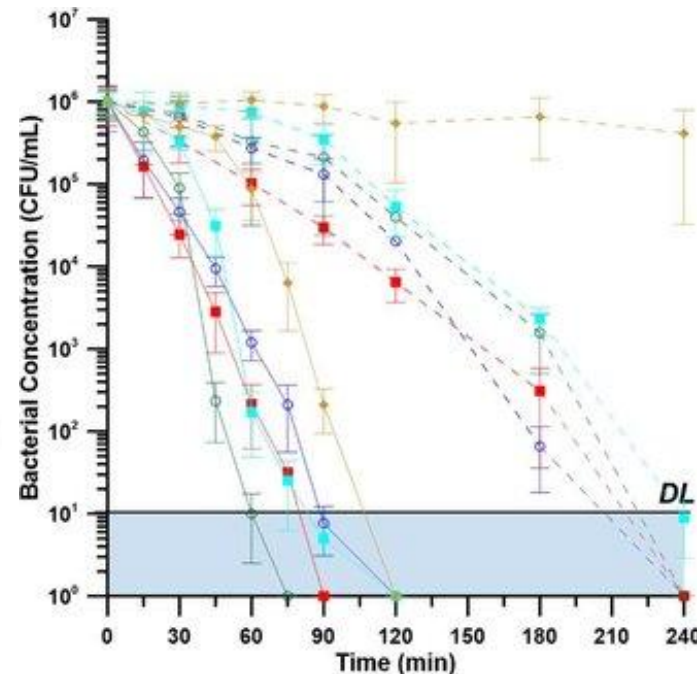
Інактивація бактерій при різних рівнях опромінення [9]



E. coli inactivation by solar light

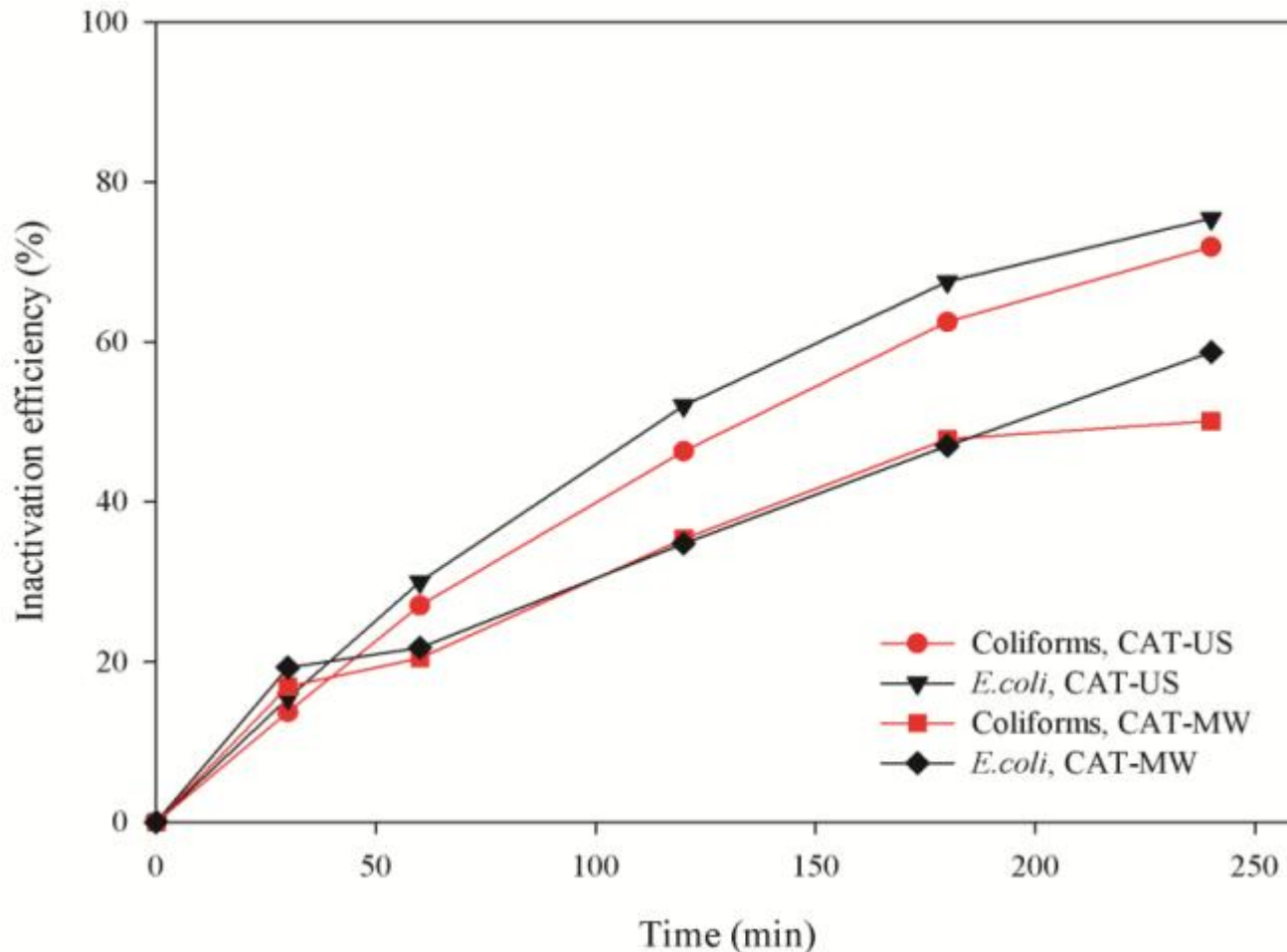
- ● - Total bacteria - 300 W/m²
- ● - Resistant bacteria - 300 W/m²
- ◆ - Total bacteria - 600 W/m²
- ◆ - Resistant bacteria - 600 W/m²
- ■ - Total bacteria - 900 W/m²
- ■ - Resistant bacteria - 900 W/m²
- + - Total bacteria - 1200 W/m²
- + - Resistant bacteria - 1200 W/m²

Дослідження дезінфекції стійких до антибіотиків (R) і чутливих до антибіотиків (S) грам-позитивних і грам-негативних бактерій методом фото-Фентона [9]



- | | | Gram + vs. Gram - | |
|---|---|-------------------|---|
| + | S | - ○ - | <i>S. aureus</i> ATCC 29213 - Solar |
| | S | - ○ - | <i>S. aureus</i> ATCC 29213 - photo-Fenton |
| | R | - ■ - | MRSA ATCC 43300 - Solar |
| | R | - ■ - | MRSA ATCC 43300 - photo-Fenton |
| - | S | - ○ - | <i>E. coli</i> ATCC 25922 - Solar |
| | S | - ○ - | <i>E. coli</i> ATCC 25922 - photo-Fenton |
| | R | - ◆ - | <i>E. coli</i> ESBL 8543 - Solar |
| | R | - ◆ - | <i>E. coli</i> ESBL 8543 - photo-Fenton |
| | R | - ◆ - | <i>K. pneumoniae</i> ESBL 8534 - photo-Fenton |
| | R | - ◆ - | <i>K. pneumoniae</i> ESBL 8534 - Solar |

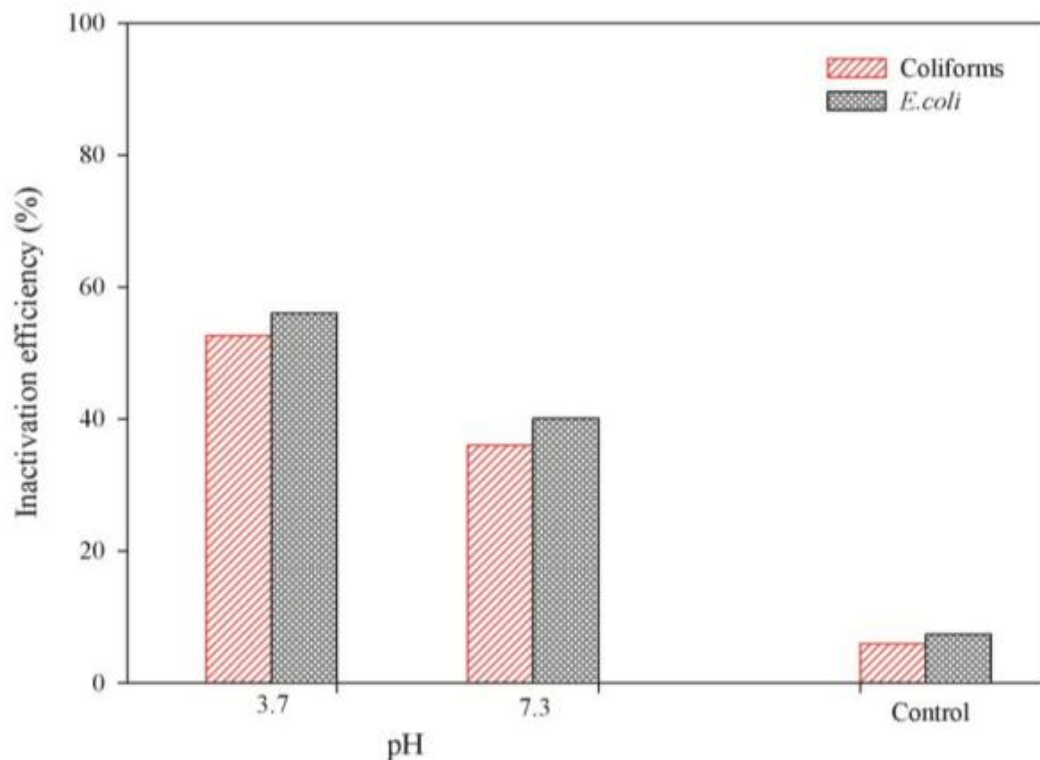
Приклад графічного представлення результатів інактивації *E. coli* в процесі Фентона



Ефективність інактивації *E. coli* в залежності від часу [10]

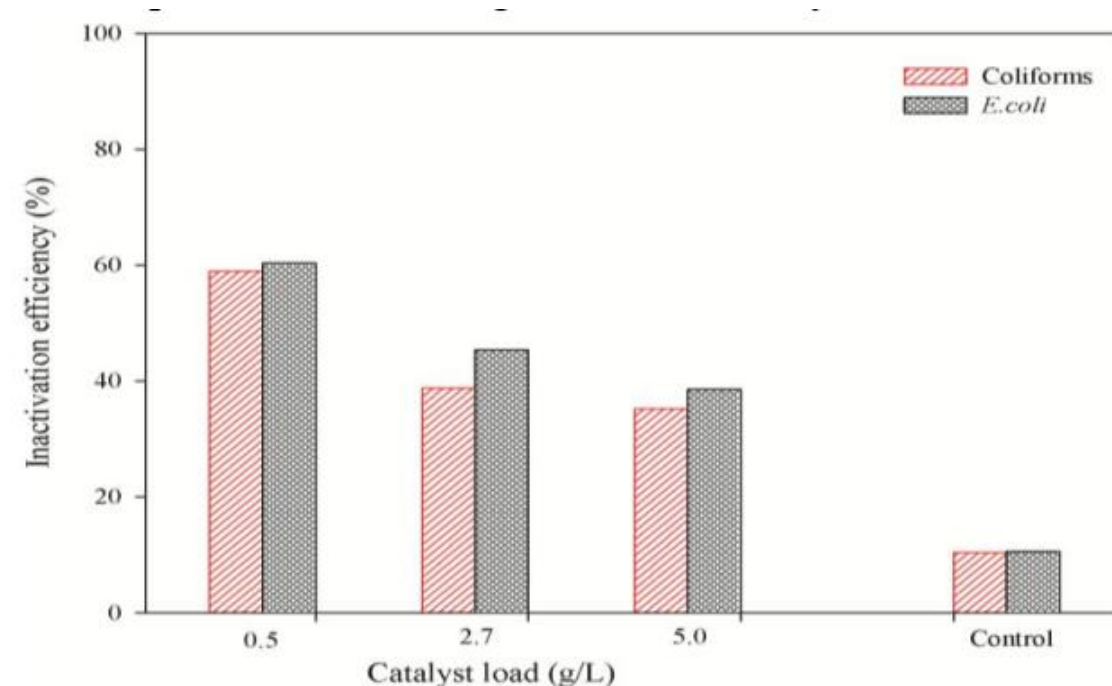
$C[\text{H}_2\text{O}_2] = 0,06$ мг/л,
Маса каталізатора = 0,5 г/л,
 $\text{pH} = 7,3$,
 $[E. coli] = 10^6$ КУО/мл

Приклад графічного представлення результатів інактивації *E. coli* в процесі Фентона



Ефективність інактивації *E. coli* в залежності від pH [10].

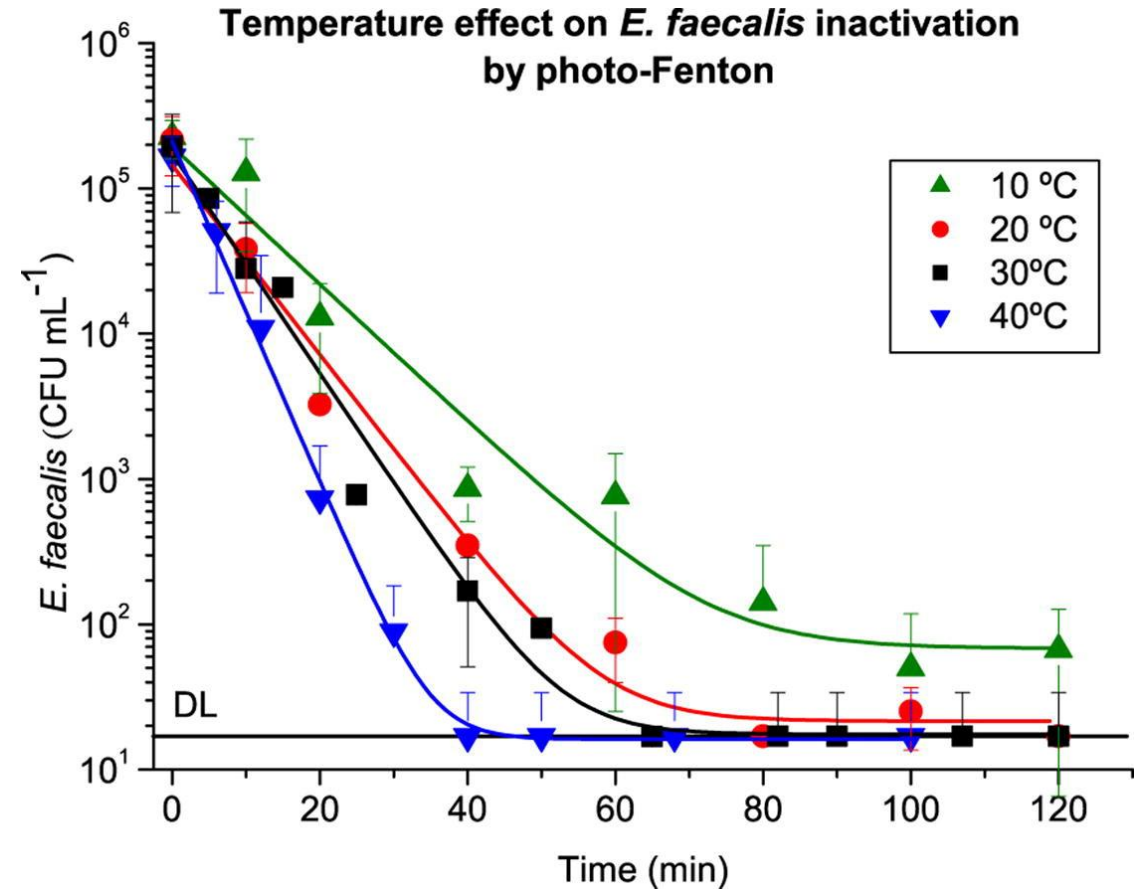
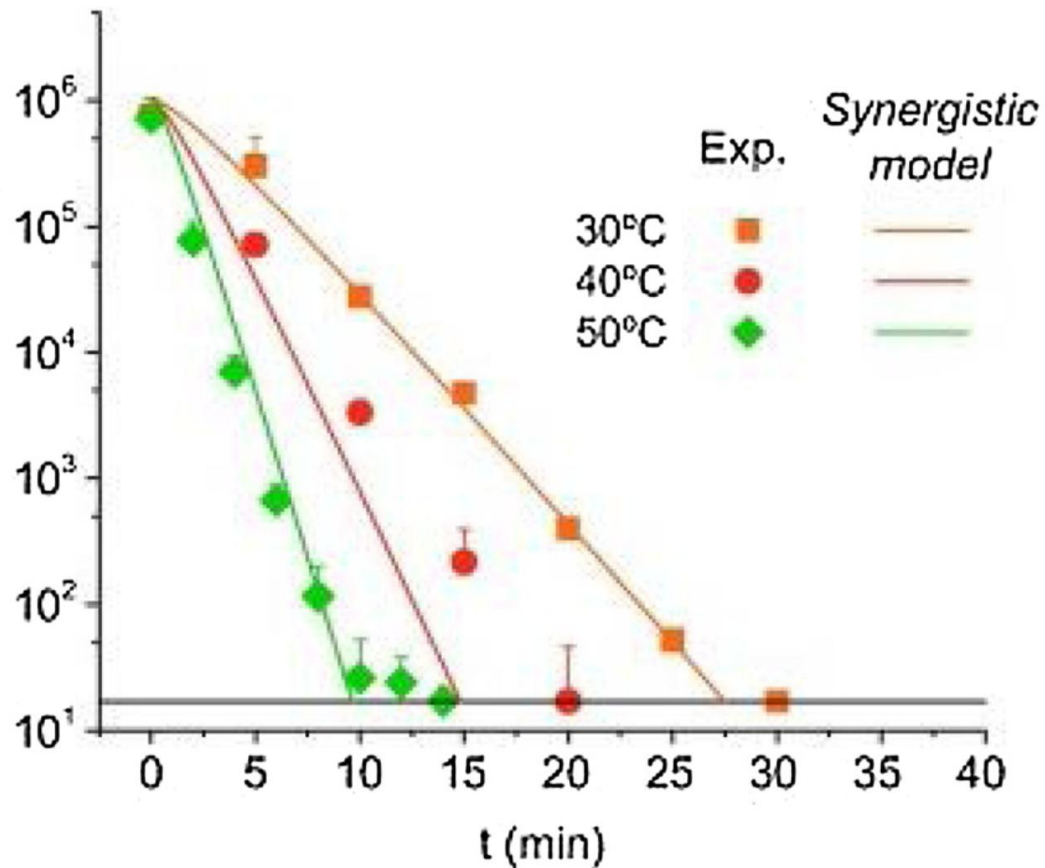
$C[H_2O_2] = 0.06$ мг/л,
Маса каталізатора = 0.5 г/л,
pH = 7,3,
 $[E. coli] = 10^6$ КУО/мл



Ефективність інактивації *E. coli* в залежності від наважки каталізатора [10].

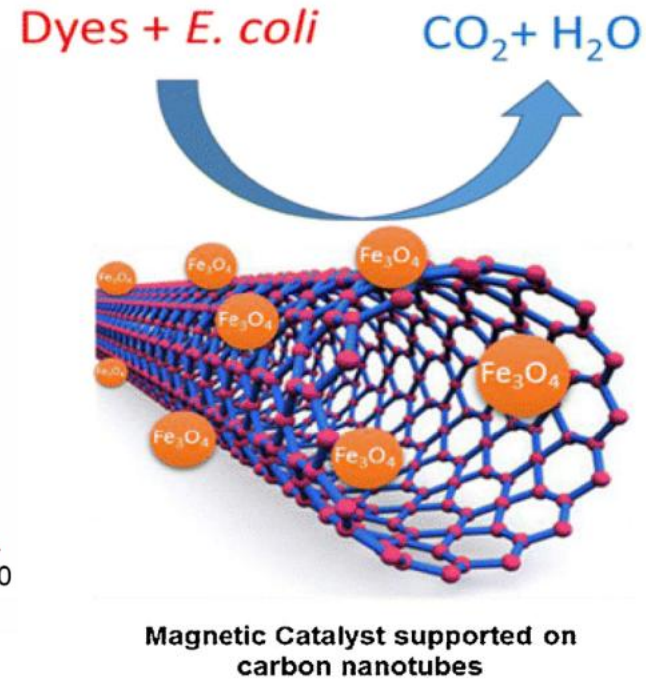
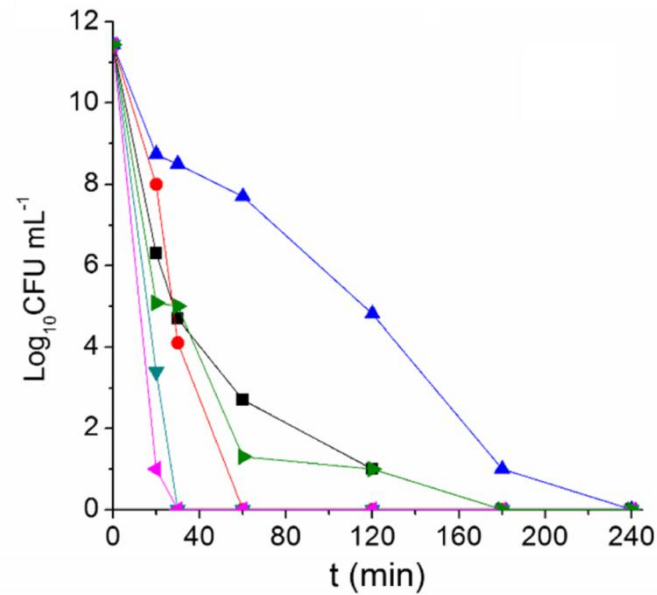
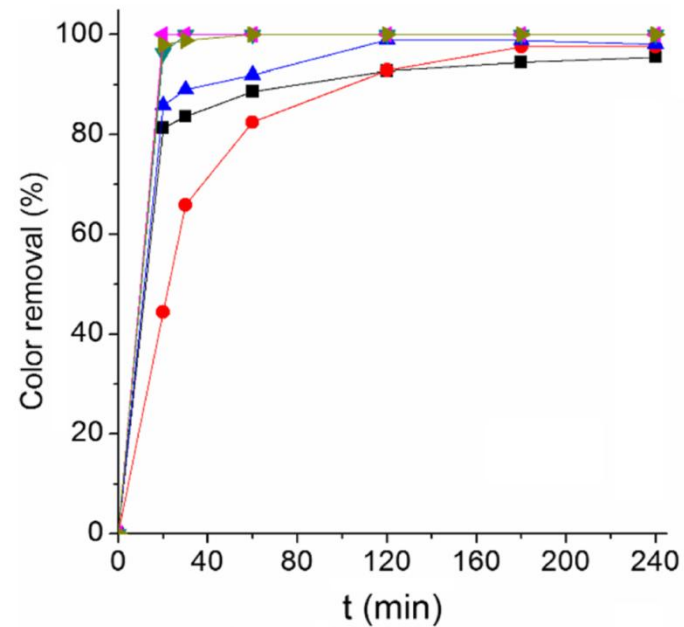
$C[H_2O_2] = 0.06$ мг/л,
Маса каталізатора = 5 г/л,
pH = 7.3,
 $[E. coli] = 10^6$ КУО/мл

Приклад графічного представлення результатів інактивації *E. coli* в процесі Фентона



Зміна інактивації *E. coli* при підвищенні температури від 30-50 °C [9,11]

Приклад графічного представлення результатів інактивації *E. coli* в процесі Фентона



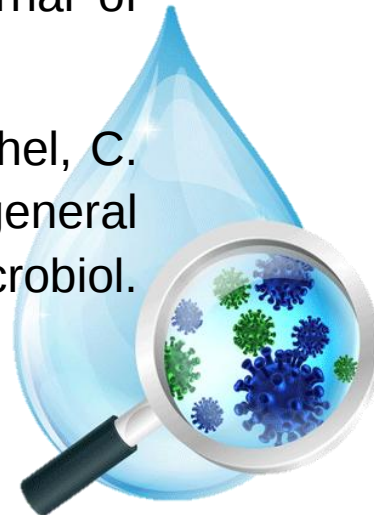
Fenton and photo-Fenton Reaction

Вуглецеві нанотрубки використано як основу для магнітних каталізаторів Фентона для очищення справжніх стічних вод, забруднених барвниками та кишковою паличкою [12].

Список використаних джерел



- [1] <https://roshanwater.com/water-testing/>
- [2] Pichel, N., Vivar, M., & Fuentes, M., The problem of drinking water access: A review of disinfection technologies with an emphasis on solar treatment methods. Chemosphere, 2018. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.11.205
- [3] https://about-ecoli.com/ecoli_transmission
- [4] João P. S. Cabral, Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water, International Journal of Environmental Research and Public Health, 2010. doi:10.3390/ijerph7103657
- [5] R. Wirth, A. Bellack, M. Bertl, Y. Bilek, T. Heimerl, B. Herzog, M. Leisner, A. Probst, R. Rachel, C. Sarbu, S. Schopf, G. Wanner, The mode of cell wall growth in selected archaea is similar to the general mode of cell wall growth in bacteria as revealed by fluorescent dye analysis, Appl. Environ. Microbiol. 77 (2011) 1556–1562. <https://doi.org/10.1128/AEM.02423-10>.
- [6] <https://conductscience.com/bacteria-enumeration/>



Список використаних джерел



- [7] T. Tatarchuk, N. Danyliuk, I. Lapchuk, W. Macyk, A. Shyichuk, R. Kutsyk, V. Kotsyubynsky, V. Boichuk, Oxytetracycline removal and E. coli inactivation by decomposition of hydrogen peroxide in a continuous fixed bed reactor using heterogeneous catalyst, J. Mol. Liq. 366 (2022) 120267. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.120267>.
- [8] L. Fernández, J. González-Rodríguez, M. Gamallo, Z. Vargas-Osorio, M. T. Moreira, Iron oxide-mediated photo-Fenton catalysis in the inactivation of enteric bacteria present in wastewater effluents at neutral pH, Environmental Pollution, 266 (2020) 115181.
- [9] K. O'Dowd, S.C. Pillai, Photo-Fenton disinfection at near neutral pH: Process, parameter optimization and recent advances, J. Environ. Chem. Eng. 8 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104063>.
- [10] K. Castro-Ríos, E.J. Corpas, V. Cárdenas, G. Taborda, Inactivation efficiency of total coliforms and Escherichia coli in doped natural water by heterogeneous Fenton: Effect of process factors, J. Mater. Environ. Sci. 8 (2017) 364–369.
- [11] E. Ortega-Gómez, P. Fernández-Ibáñez, M.M. Ballesteros Martín, M.I. Polo-López, B. Esteban García, J.A. Sánchez Pérez, Water disinfection using photo-Fenton: Effect of temperature on Enterococcus faecalis survival, Water Res. 46 (2012) 6154–6162. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.09.007>.
- [12]. J.C. García, A.M. Pedroza, C.E. Daza, Magnetic Fenton and Photo-Fenton-Like Catalysts Supported on Carbon Nanotubes for Wastewater Treatment, Water. Air. Soil Pollut. 228 (2017). <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3420-7>.

