

ІНСТИТУТ КОЛОЇДНОЇ ХІМІЇ ТА ХІМІЇ ВОДИ ім. А.В. ДУМАНСЬКОГО  
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**БОЛГОВА ОЛЕНА СЕРГІЇВНА**

УДК 628.16:579.22

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**ВИЯВЛЕННЯ ТА ВИДАЛЕННЯ ЖИТТЄЗДАТНИХ  
НЕКУЛЬТУРАБЕЛЬНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ З ПИТНОЇ ВОДИ**

05.17.21 – технологія водоочищення

технічні науки

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ О.С. Болгова

Науковий керівник Гончарук Владислав Володимирович, академік НАН України,  
доктор хімічних наук, професор

Київ – 2018

## АНОТАЦІЯ

*Болгова О.С.* Виявлення та видалення життєздатних некультурабельних мікроорганізмів з питної води. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 05.17.21 «Технологія водоочищення». – Інститут колоїдної хімії та хімії води ім. А.В. Думанського НАН України, Київ, 2018.

Дисертаційна робота присвячена вирішенню важливої задачі щодо очищення питної води від мікроорганізмів, які перебувають у життєздатному некультурабельному стані шляхом розробки технології для їх знешкодження та глибокого вилучення при застосуванні нових підходів оцінки та контролю якості води.

У роботі проаналізовано літературні джерела в яких досліджено умови переходу мікроорганізмів у життєздатний некультурабельний стан в якості реакції на будь-яку форму природного стресу, наприклад, голодування, потрапляння в несприятливий діапазон температури, висушування, підвищення осмотичного (морська вода) та гідростатичного тиску, аерація, зміна концентрації кисню, рН, рСО<sub>2</sub>, вплив ультрафіолету тощо. В результаті цього мікроорганізми втрачають здатність до розмноження на поживних середовищах, але при цьому виявляють дихальну і метаболічну активність, тобто залишаються живими, життєздатними.

Показано, що при попаданні в сприятливе середовище, або під впливом певних факторів такі мікроорганізми знову переходять від ЖНС в культурабельний стан і стають джерелом інфекції, що може викликати спалах епідемії. Такий життєздатний але некультурабельний стан несе небезпеку недооцінити кількість життєздатних патогенних мікроорганізмів і отримати помилково негативні результати при лабораторних дослідженнях, наприклад, води стандартизованими методами.

Розглянуто існуючі методи, які дозволяють виявляти мікроорганізми в життєздатному некультурабельному стані, а саме: прямий підрахунок клітин в

ЖНС методом флуоресценції, використання полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), ПЛР зі зворотною транскрипцією, проточна цитометрія, імуноферментний аналіз, FISH (fluorescence in situ hybridization). Показано, що дані методи дорогі, бо вимагають наявності високочутливих мікроскопів, барвників, маркерів і технологій, а також висококваліфікованого персоналу. Однак, показано, що для виявлення життєздатних некультурабельних мікроорганізмів також широко використовують методи відновлення їх культурабельності.

Ретельний огляд наукової та патентної літератури свідчить, що досліджень питної води на наявність у ній життєздатних некультурабельних мікроорганізмів, а також їх вилучення в Україні ще не проводили.

На основі проведеного аналізу літератури сформульовано мету та визначено основні напрямки досліджень.

У роботі досліджували вплив гіпохлориту натрію у різних концентраціях на здатність санітарно-показового мікроорганізму *Escherichia coli* та дріжджоподібного гриба *Candida albicans* перебувати у життєздатному некультурабельному стані у водному середовищі.

Показано, що антимікробний ефект гіпохлориту натрію зростає зі збільшенням його концентрації, а також залежить від ступеня зараження води культурою мікроорганізмів. Проведено вибір оптимальних концентрацій гіпохлориту натрію, що забезпечують повне знезараження води від культур *Escherichia coli* та *Candida albicans*, яке оцінювали класичним методом, шляхом висіву на агарові диференційно-діагностичні середовища.

Встановлено, що при контакті  $\text{NaOCl}$  в концентраціях 2-3 мг/дм<sup>3</sup> з культурою *Escherichia coli* та 5 мг/дм<sup>3</sup> – з *Candida albicans*  $1 \cdot 10^5$  КУО/см<sup>3</sup> утворюються клітини в ЖНС, які не визначаються загальноприйнятими методами, проте при встановленні сприятливих умов здатні повертатися в культурабельний стан.

Розроблено метод виявлення у питній воді мікроорганізмів, що перебувають у життєздатному некультурабельному стані. Метод базується на рекультивації клітин, які перебувають в життєздатному некультурабельному стані, у рідкому

поживному сольовому середовищі М-9 з подальшою їх культивацією на традиційному агаровому диференційно-діагностичному поживному середовищі (патент України № 113472). Даний спосіб покладено в основу створення державного нормативного документу (ДСТУ) щодо виявлення життєздатних некультурабельних мікроорганізмів у воді.

Порівняно ступінь реактивації життєздатних некультурабельних клітин культур *Escherichia coli* та *Candida albicans* в класичних поживних середовищах (поживний бульйон та бульйон Сабуро, відповідно) з запропонованим поживним середовищем М-9.

Відновлення культур майже на один порядок спостерігається вже на першу добу. В той час, як у класичних поживних середовищах рекультивация культур відсутня. Отримані дані показують, що використання живильного середовища М-9 сприяє більш швидкому прискоренню рекультивации культур *Escherichia coli* та *Candida albicans*, та підвищує інформативність мікробіологічних досліджень. Таким чином, усе це свідчить про необхідність внесення змін до методики визначення якості води, що надходить до споживача, а також розробки нових підходів її знезараження.

Враховуючи, що використання середовища М-9 дозволяє підвищити ступінь реактивації як *Escherichia coli*, так і *Candida albicans* у порівнянні з іншими живильними середовищами, у зв'язку з цим проведено оцінку впливу складових компонентів середовища М-9, а саме: іонів  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  та глюкози на рекультивацию некультурабельних клітин на прикладі *C. albicans*.

Показано, що сольове середовище М-9, яке містить лише базові компоненти (хлорид амонію, фосфат натрію, фосфат калію і хлорид натрію), не сприяє переходу клітин, що перебувають у некультурабельному стані, в нормальний культурабельний стан. Роздільне внесення в середовище М-9 додаткових компонентів, таких як  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  і глюкози, дозволяє виявити клітини, що перебувають в життєздатному некультурабельному стані. Показано, що іони  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Mg}^{2+}$  сприяють найвищому ступеню реактивації клітин. Однак, найбільш активне повернення культури у культурабельний стан відбувається при наявності всіх

додаткових компонентів в середовищі М-9. Встановлено оптимальні концентрацій іонів  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Mg}^{2+}$  у складі середовища М-9, які забезпечують найвищий ступінь реактивації клітин *Candida albicans*, що перебувають в некультурабельном стані.

Проведено оцінку впливу температури на відновлення і ріст клітин мікроорганізмів. Показано, що для досягнення оптимальних умов рекультивації культур *Escherichia coli* и *Candida albicans* проби води із середовищем М-9 слід термостатувати при температурі 37 °С для *Escherichia coli*, та при 27 або 37 °С для *Candida albicans*.

Підтверджено наявність клітин *Candida albicans* в життєздатному некультурабельном стані після впливу на них бактерицидних концентрацій (5 мг/дм<sup>3</sup>) NaOCl при застосуванні прямої мікроскопії. Ці клітини залишалися незабарвленими барвником трипановим синім, що свідчить про їх життєздатність. Однак, виявилось, що при посіві такої культури на класичне агарове диференційно-діагностичне середовище Сабуро її ріст відсутній.

Проведено порівняння класичного мікробіологічного методу, що використовується на станціях водопідготовки, із запропонованим методом виявлення мікроорганізмів, які перебувають в життєздатному некультурабельному стані при аналізі водопровідної води і води з бюветів м. Києва.

Встановлено, що у всіх пробах води, незалежно від терміну експлуатації трубопроводів, а також від місця відбору та пори року, загальна кількість мікроміцетів коливається від 3 до 25 КУО/100 см<sup>3</sup> – визначені класичним методом та від  $3 \cdot 10^2$  до  $1,2 \cdot 10^3$  – визначені запропонованим методом. При цьому домінують дріжджоподібні види. Найвища кількість грибів роду *Candida* та *Rhodotorula* виявлено в Солом'янському та Святошинському районах. Серед міцеліальних форм мікроміцетів найчастіше виявляли гриби, що належать до видів *Penicillium*, *Mucelia* та *Aspergillus*, які досить стійкі до дії дезінфікантів і мають токсикогенні, алергенні та мутагенні властивості. Всього виявлено 9 видів мікроміцетів, які можуть прямо впливати на здоров'я людини, оскільки вони відомі як алергенні,

патогенні та токсикогенні і вважаються потенційними збудниками мікозів та опортуністичних інфекцій.

За результатами досліджень видно, що навіть у воді із бюветів крім культурабельних форм мікроорганізмів, також присутні мікроорганізми, що перебувають в життєздатному некультурабельному стані.

Встановлено, що запропонований метод, у порівнянні з класичним методом, дає можливість виявити життєздатні некультурабельні мікроорганізми, а це в свою чергу виявляє реальну кількість мікроорганізмів, що містяться у пробі води.

У дисертаційній роботі розглянуто актуальність проблеми доочищення води від мікроорганізмів, що перебувають у ЖНС. Сучасні методи підготовки питної води не забезпечують знезараження її від мікроорганізмів, а сприяють їх переходу в некультурабельний стан, тим самим несуть потенційну небезпеку для здоров'я споживача такої води. Тому запропоновано ефективний спосіб доочищення питної води від життєздатних некультурабельних мікроорганізмів шляхом подачі на поверхню завантаження одночасно флокулянта і контамінованої мікроорганізмами води, тобто шляхом використання контактної флокуляції, з подальшою фільтрацією її крізь завантаження. Як флокулянт використовували катіонний флокулянт полідіалілдиметиламоній хлорид (ДБ-45), а як завантаження – Волгоградський кварцовий пісок (діаметром зерен 0,5-0,8 мм), або мезопористе кісточкове активоване вугілля (КАВ) (питомою площею поверхні 1036,4 м<sup>2</sup>/г).

Виявлено, що застосування запропонованого технологічного прийому забезпечує ефективне вилучення та інактивацію цих мікроорганізмів у питній воді. Встановлено, що вода після доочистки не містила залишків ДБ-45.

Показано, що вода, доочищена на контактній флокуляційній установці, згідно з результатами, отриманими методом біотестування, та за органолептичними та хімічними показниками якості питної води, не містить шкідливих домішок і не є токсичною.

Встановлено, що промивні води повністю відповідають вимогам приймання стічних вод підприємств у систему каналізації м. Києва (затверджені Київською

міською державною адміністрацією від 12.10.2011 №1879) і не несуть небезпеки. Концентрація флокулянту ДБ-45 у промивних водах нижча за гранично допустимі концентрації у воді, що становлять 0,1 мг/дм<sup>3</sup>.

Отже, перевага використання контактної флокуляції полягає в тому, що її застосування призводить не лише до повного вилучення з води широкого спектру мікроорганізмів, у тому числі й тих, що перебувають в життєздатному некультурабельному стані, а й до повної їх інактивації за рахунок наявності амонійних груп у структурі флокулянта, що спричиняють руйнівні процеси в клітині мікроорганізму, які призводять до розриву мембрани клітини, блокування дихальної системи та врешті респіраторної до загибелі мікроорганізму. Зернисті сорбенти в свою чергу затримують флокулянт, що містить інактивовані клітини мікроорганізмів.

Високу ефективність розробленої технології вилучення з питної води мікроорганізмів, що перебувають в життєздатному некультурабельному стані, підтверджено випробуваннями, проведеними в лабораторії мікробіології, мікології та вірусології Інституту урології АМН України.

**Ключові слова:** життєздатний некультурабельний стан мікроорганізмів, доочищення та знезараження води, поживні середовища, зернисті завантаження, флокулянти, контактна флокуляція.

*Bolgova O.S.* Identification and removal of viable but non-culturable microorganisms from drinking water. – Qualifying scientific work on the rights of manuscripts.

Dissertation to obtaining a scientific degree of a candidate of technical sciences (doctor of philosophy) on specialty 05.17.21 "Water treatment technology". – A.V. Dumansky Institute of Colloid Chemistry and Water Chemistry National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2018.

The dissertation is devoted to solving an important problem as to identifying microorganisms in the viable but non-culturable state in drinking water and finding an

effective technological scheme for extracting these microorganisms and obtaining good-quality drinking water.

In the paper, the literature sources were analyzed, in which the conditions for the transition of microorganisms to a viable but non-culturable state were investigated, and the existing methods of detecting microorganisms in this state were considered. The negative influence of these microorganisms on human health was evaluated. The microorganisms *Escherichia coli* and *Candida albicans* and their features were characterized.

The presence in the drinking water of microorganisms in a viable non-culturable state poses a serious threat to the health of the population. It is evident from the analysis of literature. The data presented in the literature shows the necessity of making changes to the method of determining the quality of water entering the consumer. Classical methods of drinking water preparation do not provide complete disinfection of water from microorganisms, but, on the contrary, facilitate their transition to a viable but non-culturable state.

A thorough review of scientific and patent literature suggests that research drinking water for the presence of viable but non-culturable microorganisms in Ukraine have not yet been conducted.

Existing methods of purification and disinfection of water were considered, and a limited amount of data on the use of these methods in relation to viable but non-culturable microorganisms has been noted.

On the basis of the analysis of the literature, the goal was formulated and the main directions of research were determined.

The influence of sodium hypochlorite in various concentrations on the ability of the Sanitary-Displaying Microorganism *Escherichia coli* and yeast-like *Candida albicans* to be in a viable but non-culturable state in an aquatic environment was investigated in this paper.

It has been shown that the antimicrobial effect of sodium hypochlorite increases with concentration, which is quite natural, and also depends on the degree of contamination of water culture of microorganisms. The choice of optimal



concentrations of sodium hypochlorite, which provides complete disinfection of water from cultures of *Escherichia coli* and *Candida albicans*, was evaluated by the classical method by seeding on agar differential diagnostic media. It has been established that at contact of NaOCl in concentrations of 2-3 mg/dm<sup>3</sup> with *Escherichia coli* culture and 5 mg/dm<sup>3</sup> - with *Candida albicans* 1×10<sup>5</sup> CFU/cm<sup>3</sup>, cells in the VBNC are formed which are not determined by generally accepted methods, but when established favorable conditions are capable return to a culturable state.

A method of detecting microorganisms in the viable non-cultured state in drinking water has been developed. The method is based on the recultivation of cells that are in a viable but non-culturable state in a liquid nutrient salt medium M-9, followed by cultivation on a traditional agar differential diagnostic nutrient medium. This method forms the basis for the creation of a state normative document (DSTU) on the identification of viable but non-culturable microorganisms in water, and got a patent of Ukraine No. 113472.

The degree of reactivation of viable but non-culturable cultures *Escherichia coli* and *Candida albicans* in classical nutrient media (Nutrient broth and Saburo broth, respectively) with the proposed nutrient medium M-9 was comparatively.

The obtained data show that the use of nutrient medium M-9 promotes faster acceleration of cultures *Escherichia coli* and *Candida albicans*, and also increases the informativeness of microbiological research. This indicates the need to introduce changes to the methodology for determining the quality of water entering the consumer, as well as to develop new approaches for its decontamination.

It is established that the degree of reactivation of culture also depends on its initial load. However, the *Candida albicans* reactivation in the M-9 medium is observed in all cases.

Taking into account that the use of M-9 medium allows to increase the degree of reactivation of both *Escherichia coli* and *Candida albicans* in comparison with other nutrient media, an estimation of the influence of Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and glucose ions, which are components of the medium of M-9, on the recultivation of non-culturable cells in the *Candida albicans* example.

It has been shown that the M-9 saline medium containing only basic components (ammonium chloride, sodium phosphate, potassium phosphate and sodium chloride) does not promote the transition of cells that are in a non-culturable state to normal culturable state. Separate introduction into the medium of M-9 additional components such as  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and glucose, can detect cells that are in a viable but non-culturable state. It has been shown that  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  ions contribute to the highest degree of cell reactivation. However, the most active return of the culture to the culturable state occurs in the presence of all additional components in the medium M-9. Optimal concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  ions in the medium of M-9 have been established, which provide the highest degree of reactivation of *Candida albicans* cells in non-culturable state.

An assessment of the effect of temperature on the recovery and growth of microorganism cells has been carried out. To obtain optimal conditions for the remediation of cultures of *Escherichia coli* and *Candida albicans*, samples of water with M-9 medium should be thermostated at 37 °C for *Escherichia coli* and at 27 or 37 °C for *Candida albicans*.

Direct microscopy confirmed the presence of *Candida albicans* cells in a viable but non-culturable state after exposure to bactericidal concentrations ( $5 \text{ mg/dm}^3$ ) NaOCl. These cells remained uncoloured with trypan blue, indicating their viability, and also decreased in size. However, it turned out that at the sowing of such a culture on the classical agar differential diagnostic environment Saburo its growth is absent.

A comparison of the classical microbiological method used at water treatment stations with the proposed method for the detection of microorganisms in a viable but non-culturable state, in the analysis of tap water and water from pump-rooms in the city of Kyiv has been carried out.

It has been established that in all samples of tap water, regardless of the period of operation of the pipelines, as well as from the place of selection and season, the total number of micromycetes is 3-25 CFU/100  $\text{cm}^3$  (defined by the classical method) and  $3 \cdot 10^2$ - $1,2 \cdot 10^3$  (determined by the proposed method). In this case, yeast-like species such as *Candida* and *Rhodotorula* dominate. Among the micelles of micromycetes,

fungi belonging to the species *Penicillium*, *Myselia* and *Aspergillus*, which are quite resistant to the action of disinfectants and have toxicogenic, allergenic and mutagenic properties, were most often detected. A total of 9 types of micromycetes have been identified which can have a direct impact on human health, since they are known as allergenic, pathogenic and toxicogenic and are considered to be potential pathogens for mycoses and opportunistic infections.

According to research results, it is evident that even in water from pump-rooms, in addition to culturable forms of microorganisms, microorganisms present in a viable but non- culturable state are also present.

It is established that the proposed method, in comparison with the classical method, makes it possible to detect viable but non-culturable microorganisms, which in turn reveals a real number of microorganisms contained in tap water.

In the dissertation work the urgency of the problem of water purification from microorganisms, which are in the VBNC, was considered. Modern methods of preparing drinking water do not provide disinfection of it from microorganisms, but contribute to their transition to an uncultured state, thus having a potential danger to the health of the consumer of such water. Therefore, an effective way to clean drinking water from viable but non-culturable microorganisms is proposed by feeding to the surface simultaneously loading of the flocculant and contaminated by microorganisms of water, that is, by using contact flocculation, followed by filtration through the loading. As a flocculant, cationic flocculant polydiallyldimethylammonium chloride (DB-45) was used, and as loading - Volgograd quartz sand (grain diameter 0.5-0.8 mm), or mesoporous bone activated carbon (specific area of the surface  $1036.4 \text{ m}^2/\text{g}$ ).

It has been found that the application of the proposed technological treatment ensures efficient removal and inactivation of these microorganisms in drinking water. It was established that water after refining did not contain residues of DB-45.

It was shown that water, which was purified on a contact-flocculating plant, according to the results obtained by biotesting, and according to organoleptic and chemical parameters of drinking water quality, contains no harmful impurities and is not toxic.

It was established that the washing water fully complies with the requirements for sewage reception of enterprises in the sewage system of Kyiv (approved by the Kyiv City State Administration dated October 12, 2011, No. 1879) and are not endangered. Concentration of flocculant DB-45 in washing waters is lower than the maximum permissible concentrations in water, which make up 0,1 mg / dm<sup>3</sup>.

Consequently, the advantage of using contact flocculation is that its application leads not only to the complete removal of a wide range of microorganisms from the water, including those in a viable but non-culturable state, but also to their complete inactivation due to the presence of ammonium groups in the structure of the flocculant, causing destructive processes in the microorganism's cell, which lead to a rupture of the cell membrane, blockage of the respiratory system, and ultimately the death of the microorganism. Grain sorbents, in turn, retain a flocculant containing inactivated microorganism cells.

The act of introduction in the laboratory of microbiology, mycology and virology of the Institute of Urology of the Academy of Medical Sciences of Ukraine, with the recommended technological parameters for the purification of drinking water from microorganisms in a viable but non-culturable state, has been received.

**Keywords:** viable but non-culturable state, post-treatment and disinfection of water, nutrient media, granular loadings, flocculants, contact flocculation.

#### **Список публікацій здобувача:**

1. Болгова Е.С., Сапрыкина М.Н., Гончарук В.В. Идентификация *Escherichia coli* в жизнеспособном некультурабельном состоянии под воздействием хлора. *Химия и технология воды*. 2015. Т. 37, № 6. С. 487–493.

2. Гончарук В.В., Саприкіна М.М., Болгова Е.С. Новые подходы к оценке обеззараживания питьевой воды. *Доповіді НАН України*. 2016. № 5. С. 80–84.

3. Сапрыкина М.Н., Болгова Е.С., Гончарук В.В. Образование жизнеспособного некультурабельного состояния *Candida albicans*. *Химия и технология воды*. 2016. Т. 38, № 3. С. 324–332.

4. Болгова Е.С., Сапрыкина М.Н., Гончарук В.В. Новый тест-объект для оценки качества обеззараженной воды. *Вода і водоочисні технології. Науково-технічні вісті*. 2016. №3 (20). С. 3–7.

5. Сапрыкина М.Н., Болгова Е.С., Гончарук В.В. Оптимальные условия рекультивации *Candida albicans*, пребывающей в некультурабельном состоянии. *Химия и технология воды*. 2017. Т. 31, № 5. С. 575–582.

6. Спосіб виявлення життєздатних некультурабельних мікроорганізмів у воді: пат. 113472 України; МПК С12Q 1/0492006/01. № 201511710; заявл. 26.11.15; опубл. 25.01.17, Бюл. № 2. 4 с.

7. Болгова Е.С., Сапрыкина М.Н., Гончарук В.В. Идентификация микроорганизмов в жизнеспособном некультурабельном состоянии под воздействием хлора. *Екологія – 2015*: зб. наук. праць V-ий Всеукраїнський з'їзд екологів з міжнародною участю (Вінниця, 23-26 травня 2015 р.). Вінниця. 2015. С. 120.

8. Болгова О.С., Саприкіна М.М., Гончарук В.В. Спосіб виявлення мікроорганізмів, що перебувають у життєздатному, однак некультурабельному стані (VBNC) у водопровідній воді. *Чиста вода. Фундаментальні, прикладні та промислові аспекти*: зб. тез. доп. IV Міжнародна науково-практична конференція (Київ, 26-28 жовтня 2016 р.). Київ. 2016. С. 55–56.

9. Болгова Е.С., Сапрыкина М.Н., Гончарук В.В. Рекультивация *Candida albicans*, пребывающей в некультивируемом состоянии. *Вода в харчовій промисловості*: матеріали VIII Всеукраїнська науково-практична конференція молодих учених, аспірантів і студентів (Одеса, 20-21 квітня 2017 р.). Одеса. 2017. С. 88–90.

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	17
РОЗДІЛ 1. ВИЗНАЧЕННЯ ЖИТТЄЗДАТНИХ НЕКУЛЬТУРАБЕЛЬНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ.....	22
1.1. Мікроорганізми в життєздатному некультурабельному стані та їх характеристика.....	22
1.2. Вплив мікроорганізмів, які перебувають в життєздатному некультурабельному стані, на людину.....	29
1.3. Методи виявлення мікроорганізмів, які перебувають в життєздатному некультурабельному стані.....	30
1.4. Характеристика мікроорганізмів <i>Escherichia coli</i> і <i>Candida albicans</i> та їх особливості.....	34
1.5. Виникнення мікроорганізмів у життєздатному некультурабельному стані в процесі знезараження питної води.....	38
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 1.....	41
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	43
2.1. Об'єкти досліджень.....	43
2.1.1. Джерела водопостачання та водопровідна вода.....	43
2.1.2. Ентеробактерії та дріжджоподібні гриби.....	43
2.2. Методики проведення експерименту.....	43
2.2.1. Методика відбору проб води та проведення мікробіологічних та мікологічних досліджень.....	43
2.2.2. Методика культивування мікроорганізмів.....	45
2.2.3. Методика переведення культур в життєздатний некультурабельний стан за допомогою гіпохлориту натрію.....	45
2.2.4. Методика проведення мікробіологічних досліджень при розробці способу виявлення клітин, що перебувають в життєздатному некультурабельному стані.....	46
2.2.5. Методика визначення впливу температури на реактивацію культур, що перебувають в життєздатному некультурабельному стані.....	47

2.2.6. Метод ідентифікації клітин в життєздатному некультурабельному стані шляхом прямої мікроскопії.....	47
2.2.7. Методика визначення рН води.....	48
2.2.8. Методика доочищення питної води за допомогою контактної флокуляції.....	48
2.2.9. Методика вимірювання залишкової концентрації солей полідиалілдиметиламоній хлориду.....	50
2.2.10. Оцінка достовірності результатів експерименту.....	51
2.2.11. Розрахунок похибки вимірювань.....	51
2.2.12. Математична модель досліджених процесів.....	51
<b>РОЗДІЛ 3. ВИЯВЛЕННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ У ЖИТТЄЗДАТНОМУ НЕКУЛЬТУРАБЕЛЬНОМУ СТАНІ У ВОДІ.....</b>	<b>52</b>
3.1 Дослідження впливу гіпохлориту натрію на санітарно-показовий мікроорганізм <i>Escherichia coli</i> .....	54
3.2 Дослідження впливу гіпохлориту натрію на дріжджоподібний гриб <i>Candida albicans</i> .....	55
3.3. Вибір методу рекультивації життєздатних некультурабельних мікроорганізмів.....	56
3.3.1. Вибір поживних середовищ для рекультивації життєздатних некультурабельних мікроорганізмів.....	57
3.3.2. Рекультивація клітин <i>Escherichia coli</i> , що перебувають в життєздатному некультурабельному стані.....	58
3.3.3. Рекультивація клітин <i>Candida albicans</i> , що перебувають в життєздатному некультурабельному стані.....	60
3.4. Вплив іонів $\text{Ca}^{2+}$ та $\text{Mg}^{2+}$ на рекультивацію некультурабельних клітин <i>Candida albicans</i> .....	62
3.5. Вплив температури на відновлення клітин, що перебувають у життєздатному некультурабельному стані.....	64
3.6. Мікроскопічні дослідження клітин <i>Candida albicans</i> після дії гіпохлориту натрію.....	66

3.7. Генетична стійкість мікроорганізмів.....	67
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3.....	68
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ПИТНОЇ ВОДИ МІСТА КИЄВА.....	70
4.1. Систематичний аналіз водопровідної води м. Києва.....	70
4.2. Аналіз води зі свердловин м. Києва.....	80
4.3. Систематичний аналіз доочищеної води м. Києва.....	83
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 4.....	89
РОЗДІЛ 5. РОЗРОБКА ТА ВИПРОБУВАННЯ КОНТАКТНО- ФЛОКУЛЯЦІЙНОГО ФІЛЬТРУ ДЛЯ ДООЧИЩЕННЯ ПИТНОЇ ВОДИ...	90
5.1. Вибір зернистого завантаження для видалення некультурабельних життєздатних мікроорганізмів з води.....	91
5.2. Вибір флокулянтів для знезараження некультурабельних життєздатних мікроорганізмів у воді.....	95
5.3. Використання флокулянту і зернистих загрузок для знезараження та видалення життєздатних некультурабельних мікроорганізмів з води.....	99
5.4. Розробка технології доочищення питної води від життєздатних некультурабельних мікроорганізмів .....	106
5.5. Математичні моделі процесів доочищення вихідної води .....	115
5.6. Розрахунок технологічного обладнання контактнo-флoкyляцiйнo фiльтру iндивiдуальнoгo кoристyвaння.....	120
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 5.....	123
ВИСНОВКИ.....	125
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	127
Додаток А .....	140
Додаток Б.....	141



## ВСТУП

### Актуальність теми

Якість питної води є одним із основних факторів, який впливає на здоров'я людей. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я близько 80% захворювань людей пов'язані саме з поганою якістю питної води. Вода може брати участь в розповсюдженні ряду інфекційних захворювань, таких як: черевний тиф, паратифи А і В, холера, дизентерія, сальмонельоз, ешеріхіоз та інші. Саме тому проблема водопостачання доброякісної води в достатній кількості є однією з головних проблем людства.

Мікробіологічний контроль якості питної води на станціях водопідготовки здійснюють загальноприйнятими класичними методами, за допомогою яких визначають загальну кількість бактерій і деяких патогенних збудників, вірусів, найпростіших і, віднедавна, – наявність у воді міцеліальних грибів.

Однак, останніми дослідженнями встановлено здатність мікроорганізмів переходити в життєздатний некультурабельний стан (ЖНС) під дією природних та антропогенних стрес-факторів, в результаті чого мікроорганізми не культивуються на класичних диференційно-діагностичних агарових середовищах і не виявляються у воді при використанні класичних методів мікробіологічного аналізу. Це несе небезпеку неповного врахування кількості життєздатних патогенних мікроорганізмів і отримання помилкових результатів при аналізі питної води на станціях водопідготовки, що, в свою чергу, може призвести до виникнення ряду важких захворювань у споживачів такої води.

Через здатність мікроорганізмів переходити у життєздатний некультурабельний стан, дослідження щодо виявлення мікроорганізмів у такому стані та видалення їх із води є вкрай актуальними. Постає нагальна потреба визначити можливість утворення життєздатного некультурабельного стану у санітарно-показових культур, які часто виявляються у воді; розробити надійну методику виявлення вказаних мікроорганізмів у життєздатному некультурабельному стані в природних та питних водах з подальшим її

впровадженням на водогонах та санітарно-епідеміологічних станціях України, запропонувати технологічну схему ефективного вилучення життєздатних некультурабельних мікроорганізмів з питної води.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами**

Дисертаційна робота виконувалась у відповідності до плану науково-дослідних робіт Інституту колоїдної хімії та хімії води ім. А.В. Думанського НАН України за відомчими темами НАН України: «Створення концепції управління біологічною активністю та фізико-хімічними властивостями води, у т.ч. її ізотопним складом, при очищенні природних вод з урахуванням сучасних вимог до якості питної води» (2012-2016 рр., № держреєстрації 0112U000038, виконавець); «Вплив хлорованої води на виживання мікрофлори на прикладі *Candida albicans*» (2015 р., № держреєстрації 0115U000816, виконавець); «Розвиток наукових основ хімії, фізики та біології води» (2017-2021 рр., № держреєстрації 0117U000014, виконавець) «Фундаментальні основи ефективного використання комплексу хімічних, фізичних і біологічних методів дослідження водних систем» (2017-2021 рр., № держреєстрації 0117U000016, виконавець).

### **Мета і завдання дослідження**

**Мета роботи:** розробити технологію для знешкодження та глибокого вилучення життєздатних некультурабельних мікроорганізмів з питної води при застосуванні нових підходів щодо оцінки та контролю її якості.

Для досягнення мети необхідно вирішити такі наукові та практичні завдання:

- оцінити здатність мікроорганізмів перебувати у життєздатному некультурабельному стані;
- розробити простий та ефективний метод виявлення життєздатних некультурабельних мікроорганізмів у воді, що дозволить отримати достовірну інформацію щодо кількісного складу мікроорганізмів у питній воді;
- здійснити контроль якості води з водорозподільних мереж та бюветів м. Києва з використанням запропонованого методу;

- розробити простий та ефективний спосіб доочищення питної води від життєздатних некультурабельних мікроорганізмів.

**Об'єкт дослідження** – процеси виявлення та видалення з водного середовища мікроорганізмів, що перебувають у життєздатному некультурабельному стані.

**Предмет дослідження** – вода з водорозподільної системи м. Києва, що містить потенційно небезпечні мікроорганізми, які перебувають у життєздатному некультурабельному стані.

**Методи дослідження:** для видалення мікроорганізмів з води використовували методи хлорування, коагуляції, флокуляції та фільтрування; спектрофотометричний метод використовували з метою встановлення кількісних характеристик приготовленої суспензії культур мікроорганізмів, а також для визначення залишкової концентрації флокулянту ДБ-45 у воді; титриметричний метод застосовували для визначення концентрації гіпохлориту натрію, що використовували в роботі, та його залишку у воді; кількісні підрахунки колоній мікроорганізмів здійснювали з використанням методів прямого посіву та мембранних фільтрів; світлову мікроскопію використовували для визначення видової належності мікроорганізмів та виявлення мікроорганізмів, що перебувають у життєздатному некультурабельному стані; статистичну обробку даних виконували для встановлення похибки експерименту; метод множинної кореляції використовували для побудови математичної моделі для усіх процесів фільтрування.

### **Наукова новизна одержаних результатів**

Досліджено умови переходу мікроорганізмів у воді у життєздатний некультурабельний стан. Показано, що застосування гіпохлориту натрію для знезараження води сприяє утворенню некультурабельних форм мікроорганізмів. Вперше розроблено інформативний метод виявлення у воді мікроорганізмів у життєздатному некультурабельному стані, шляхом рекультивації цих клітин у рідкому поживному середовищі М-9 з подальшою їх культивацією на традиційному агаровому диференційно-діагностичному поживному середовищі.

Додаткове використання поживного середовища М-9 сприяє більш швидкому відновленню і росту клітин культур. Вперше проведено порівняння класичного мікробіологічного методу, що використовується на станціях водопідготовки, із запропонованим методом виявлення мікроорганізмів при аналізі водопровідної води і води з бюветів м. Києва та встановлено, що запропонований метод дає можливість виявити мікроорганізми, які перебувають у ЖНС. Запропоновано ефективний спосіб доочищення питної води від мікроорганізмів, що перебувають в життєздатному некультурабельному стані, шляхом контактної флокуляції, при цьому як флокулянт використовували полідіалілдиметиламоній хлорид (ДБ-45), що має антимікробні властивості. Виявлено, що застосування запропонованого технологічного прийому забезпечує ефективне вилучення та інактивацію цих мікроорганізмів.

#### **Практичне значення одержаних результатів**

Вперше запропоновано використання нового тест-об'єкту, а саме *Candida albicans*, крім загальновідомого санітарно-показового мікроорганізму *Escherichia coli*, для оцінки якості знезараження води. Вперше розроблено метод виявлення мікроорганізмів, що перебувають у життєздатному некультурабельному стані у питній воді (Патент України № 113472). Даний спосіб покладено в основу створення державного нормативного документу (ДСТУ) щодо виявлення життєздатних некультурабельних мікроорганізмів у воді. Запропоновано технологічну схему доочищення води від життєздатних некультурабельних мікроорганізмів, яка базується на використанні контактної флокуляції, що включає фільтрування води крізь зернисті завантаження (кварцовий пісок, активоване вугілля) з використанням флокулянту ДБ-45, та забезпечує повне вилучення життєздатних некультурабельних мікроорганізмів з води. Високу ефективність технології вилучення мікроорганізмів, які перебувають у життєздатному некультурабельному стані, з води підтверджено практичними випробуваннями, проведеними в лабораторії мікробіології, мікології та вірусології Інституту урології АМН України.

### **Особистий внесок здобувача**

Аналіз літератури, основний обсяг експериментальної роботи, обробку та аналіз отриманих даних проведено особисто здобувачем. Постановка загальної задачі досліджень, трактування та узагальнення експериментальних результатів, обговорення висновків дисертації проводились спільно з науковим керівником – академіком НАН України, д.х.н., проф. Гончаруком В.В. Результати обговорювалися також з д.б.н., проф. Руденко А.В., к.б.н. Савлук О.С., к.т.н. Саприкіною М.М., н.с. Муравйовим В.Р.

### **Апробація результатів дисертації**

Матеріали дисертації доповідалися та обговорювалися на: V Всеукраїнському з'їзді екологів з міжнародною участю (м. Вінниця, Україна, 2015 р.), IV Міжнародній науково-практичній конференції (м. Київ, Україна, 2016 р.), VIII Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Вода в харчовій промисловості» (м. Одеса, Україна, 2017 р.)

### **Публікації**

За темою дисертації опубліковано 9 робіт: 5 статей, з них 4 у наукових фахових виданнях, 1 патент України та тези 3 доповідей.

### **Структура та обсяг дисертації**

Дисертація складається із вступу, 5 розділів, висновків, списку використаних джерел літератури та додатків. Роботу викладено на 142 сторінках друкованого тексту, з них 109 – основний текст. Дисертація містить 28 рисунків, 24 таблиці, список використаних джерел літератури з 134 найменувань на 13 сторінках та 2 додатків на 3 сторінках.

## РОЗДІЛ 1

### ВИЗНАЧЕННЯ ЖИТТЕЗДАТНИХ НЕКУЛЬТУРАБЕЛЬНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

#### 1.1 Мікроорганізми в життєздатному некультурабельному стані та їх характеристика

Мікроорганізми широко поширені в оточуючому середовищі та характеризуються дуже високою екологічною валентністю. Вони, зазвичай, існують у вигляді вегетативних клітин, але деякі види мають здатність утворювати досить стійкі структури, відомі як спори. Такі форми існування або неактивний стан допомагають мікроорганізмам тривалий час виживати за несприятливих умов. Однак, не всі мікроорганізми здатні утворювати спори, тому деякі з них переходять у «життєздатний, але некультурабельний стан» (ЖНС) [1]. Термін "життєздатні, але некультурабельні" мікроорганізми був вперше введений у 1984 році для бактерій, які проявляють метаболічну активність, але не ростуть на загальноприйнятих бактеріологічних середовищах (агар Ендо, агар мікробіологічний, середовище Гіса з лактозою, лактозо-пептонне середовище, поживний бульйон та інші) [2, 3].

Здатність бактеріальних клітин реагувати на зміни параметрів навколишнього середовища обумовлена різноманітними фенотиповими і генотиповими механізмами. Щоб залишатися життєздатними, бактерії змінюють синтез ферментів, пристосовуються до обмежуючих рівнів поживних речовин і корегують або змінюють маршрут метаболічних шляхів, щоб уникнути метаболічних або структурних збоїв [4, 5].

Клітини переходять в ЖНС в якості реакції на будь-яку форму природного стресу, наприклад, голодування, потрапляння в несприятливий діапазон температури, висушування, підвищення осмотичного (морська вода) та гідростатичного тиску, аерація, зміна концентрації кисню, рН, рСО<sub>2</sub>, вплив

ультрафіолету тощо. В результаті цього бактерії втрачають здатність до розмноження на поживних середовищах, але при цьому виявляють дихальну і метаболічну активність, тобто залишаються живими, життєздатними [6].

Бактерії можуть тривалий час перебувати в життєздатному некультурабельному стані [7]. Наприклад, виявлено високий рівень АТФ в клітинах *Listeria monocytogenes* через рік перебування їх в ЖНС, що свідчить про збереження ними метаболічної функції, однак, у некультурабельному стані вони були нездатні викликати інфекцію та після переходу в культурабельний стан відновлювали свої патогенні властивості [8, 9]. *Pseudomonas fluorescens* можуть залишатися життєздатними некультурабельними в ґрунті більше року [10]. Іншими словами, "життєздатність, але некультурабельність" – це явище, яке представляє стан спокою, виживання і стійкості в навколишньому середовищі.

Показано, що патогенні мікроорганізми – *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila*, *Shigella dysenteriae*, ентеропатогенні штами *Escherichia coli* та ін. при переході в некультурабельний стан здатні зберігати свій патогенний потенціал, у тому числі здатність до токсиноутворення [11, 12, 13, 14, 15].

В дослідженні [16] було висловлено припущення, що температура + 0,5 і + 7 °С є основним чинником, що індукує перехід у некультурабельний стан, як це було показано для *Campylobacter jejuni* та *Vibrio cholerae*. Але перехід у некультурабельний стан залежить не лише від температури культивування, але й від виду мікроорганізму, його фізіологічного стану, супутніх чинників. *Vibrio cholerae* переходять у некультурабельний стан при сприятливій температурі (25 °С), але в присутності високої концентрації солей [17].

Навіть незначні варіації хімічного складу середовища при оптимальній температурі можуть індукувати перехід у некультурабельний стан. Так, наприклад, при порівнянні двох зразків питної води, один з яких індукував перехід в ЖНС *Agrobacterium tumefaciens* і *Rhizobium meliloti*, було виявлено, що зразки збігалися за 39 хімічними елементами і відрізнялися лише вмістом міді. У

пробі, яка позитивно впливала на перехід в некультурабельний стан, концентрація міді була в кілька разів вищою [18].

Крім того, встановлено, що антимікробні агенти (пастеризація, хлорування, УФ-випромінювання, озонування та ін.) також можуть привести до появи ЖНС [19, 20, 21].

Бактеріальні клітини, переходячи в некультивований стан, можуть зменшуватися в розмірах, змінюватися морфологічно, у них активуються протеолітичні ферменти, РНК і рибосоми піддаються деградації. Такі мікроорганізми оточені досить товстим (0,15-0,40 мкм) аморфним електронопрозорим полісахаридним покривом, що складається з двох або трьох шарів.

Зовнішній шар органомінеральний, подібний до капсулярної речовини і слизу. Його полісахаридний матрикс включає мінерали та захищає клітини від ушкоджень кристалами льоду, від впливу токсичних агентів і служить для прикріплення до мінеральних часток [22]. Наприклад, в умовах нестачі або відсутності кисню для клітин *Mycobacterium tuberculosis* і *Mycobacterium bovis* в некультурабельному стані характерна сильно потовщена клітинна стінка, особливо її зовнішній шар [23].

Внутрішній шар, в свою чергу, так само поділяється на два шари, що розрізняються по електронній щільності – менш щільний внутрішній і більш щільний зовнішній. У мембрані життєздатної некультурабельної клітини спостерігається велика кількість інтрамембранних частинок, які у два рази більші, ніж в мембранах культурабельних клітин [24]. Вони поширені по мембрані нерівномірно та виконують роль іонних каналів чи ферментів [25]. У грамнегативних мікроорганізмів в такому стані збільшується піроплазматичний простір. Так під дією 2,4,6-тринітротолуолу клітини *Escherichia coli* стають меншими, їх форма стає майже сферичною, значно збільшується піроплазматичний простір та зменшується поверхня плазматичної мембрани за рахунок її потовщення [26].



Метаболічна активність в таких клітинах майже, або повністю відсутня. Синтези ДНК, РНК, білка, фосфоліпідів і активності всіх деполімераз інгібовано [27].

Крім зміни в структурі клітини, відбуваються так само зміни в її хімічному складі, а саме в складі основних елементів: калію (вторинний клітинний ефектор), кальцію (бере участь у створенні трансмембранного потенціалу), фосфору (входить до складу нуклеотидів) і сірки (компонент білка). При цьому вміст фосфору зазвичай знижений, а кальцію – підвищений, що мабуть, відображає зміну іонного гомеостазу в клітинах.

Перехід клітин мікроорганізмів у життєздатний некультурабельний стан здійснюється під дією аутоіндуктора, позначеного як фактор  $d_1$ . За своєю природою він відноситься до алкілоксибензолам. Фактор  $d_1$  накопичується в клітинах і культуральній рідині під час росту культури. Він являє собою суміш ізомерів і гомологів. Залежно від величини рН алкілоксибензоли розчиняються або у водній фазі (рН 7,0), або в мембранних ліпідах (рН <7). Завдяки цій властивості вони накопичуються в клітинах, викликаючи перехід в життєздатний некультурабельний стан, або виходять в навколишнє середовище, призводячи до ослаблення блокування метаболізму і, в підсумку – до повернення клітини в культурабельное стан [28].

Синтез алкілоксибензолів у клітин, що виділяються із природних джерел, істотно вищий, ніж у колекційних штамів, що, ймовірно, обумовлює їх високу виживаність у таких місцях існування як вічно холодні ґрунти [29].

Маючи антиоксидантну активність, алкілоксибензоли, що накопичуються в клітинах стаціонарної фази й у некультурабельному стані, беруть участь у формуванні неферментативного антиоксидантного захисту мембранних ліпідів та інших клітинних структур. Це є особливо важливим в умовах інгібування метаболічних активностей клітини, а так алкілоксибензоли грають важливу роль у захисті клітин мікроорганізмів від різних стресів. У відповідь на стресс-фактори, такі як, наприклад, тепловий шок, рівень їх біосинтезу різко підвищується. Фактор  $d_1$  здатний утворювати міжмолекулярні водневі зв'язки, вступати в

гідрофобні й іонні взаємодії. Ці властивості визначають механізм їх дії при формуванні метаболічного блоку в клітині [30, 31].

Алкілоксібензоли модифікують мембранні ліпіди, внаслідок чого збільшується мембранна мікров'язкість через утворення водневих зв'язків між ароматичним кільцем алкілоксібензолів і молекулами фосфоліпідів. Це призводить до збільшення проникності мембрани для одновалентних катіонів (Na, K), а потім до зневоднення протопласта клітини. У мембрані так само утворюються мікропори, через які відбувається вихід води з клітин. Внаслідок зниження рідини мембран – інгібуються їх транспортні, енергопродукуючої та інші функції, припиняються синтетичні процеси, а також активність пов'язаних з мембраною інтегрованих в неї ферментів (деполімераз і автолізинів). Це забезпечує структурну цілісність клітинних оболонок життєздатних некультурабельних клітин [32].

Обумовлене дегідратацією мембрани інгібування клітинних ферментів посилюється ще і тим, що молекули алкілоксібензолів утворюють комплекси з молекулами біополімерів за рахунок слабких фізико-хімічних взаємодій, змінюючи їх конформацію.

Крім того, фактор  $d_1$  взаємодіють з ДНК, надаючи компактність її структурі й сприяючи збереженню цілісності, при цьому попереджує зсув пар ДНК та запобігає мутації в клітинах.

При попаданні в сприятливі для росту і розмноження умови життєздатні некультурабельні клітини переходять в культурабельний стан. При цьому відбувається порушення фізико-хімічних зв'язків в комплексах клітинних біополімерів і мембранних структур з фактором  $d_1$ . Процес ініціюється умовами середовища і призводить до виходу алкілоксібензолів з клітин у середовище. Якщо щільність клітин занадто велика то концентрація фактора буде також високою, що стане на заваді його подальшої дифузії, це призведе до загибелі клітини, так як не відбудеться зняття метаболічного блоку [33].

Численні бактерії, такі як *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Campylobacter jejuni* та інші,

можуть переходити в ЖНС під впливом несприятливих умов навколишнього середовища та різних антропогенних факторів [34].

Фактори, які викликають стрес у бактерій і впливають на бактеріальну культурабельність, так само численні, як різноманітні екологічні умови, з якими стикається бактеріальна клітина в природі. Стресові фактори навколишнього середовища, що впливають на культурабельність, загальноновизнано вважаються індукторами ЖНС бактерій (табл. 1.1) [8].

Таблиця 1.1 – Фактори, які ініціюють перехід бактерій в життєздатний некультурабельний стан

Фактори індукції	Мікроорганізми
Голодування (оліготрофія) + температура (пониження)	<i>Campylobacter jejuni</i> <i>Helicobacter pylori</i> <i>Legionella pneumophila</i> <i>Shigella dysenteriae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Vibrio vulnificus</i> <i>Vibrio cholerae</i>
Температура (пастеризація)	<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas putida</i>
Опромінення: - світлове	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i>
- ультрафіолетове	<i>Escherichia coli</i>
Висушування	<i>Yersinia pestis</i> , <i>Serratia marcescens</i>
Гідростатичний тиск	<i>Listeria monocytogenes</i>
pH	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Осмотичний стрес	<i>Escherichia coli</i> <i>Campylobacter jejuni</i>
Аерація	<i>Campylobacter jejuni</i>
Мідь	<i>Escherichia coli</i>
Хлор	<i>Escherichia coli</i>

При попаданні в сприятливе середовище, або під впливом певних факторів такі бактерії знову переходять від ЖНС в культурабельний стан і стають джерелом інфекції, що може викликати спалах епідемії. Такий життєздатний але

некультурабельний стан (ЖНС) несе небезпеку недооцінити кількість життєздатних патогенних мікроорганізмів і отримати помилково негативні результати при лабораторних дослідженнях, наприклад, води стандартизованими методами [35].

Наприклад, *Vibrio vulnificus* стає некультурабельною в умовах голодування, при інкубації в штучній морській воді або в гирловій морській воді при низькій температурі. Повернення до кімнатної температури, без додавання поживних речовин, призводить до відновлення її культурабельності [36]. Культура *Micrococcus luteus*, яка піддавалася голодуванню протягом декількох місяців, показала надзвичайно низький ступінь культурабельності, і навіть після поміщення її в звичне молочнокисле живильне середовище не було відзначено її відновлення. Однак клітини повертали свою культурабельність тільки тоді, коли надсадову рідину зі стаціонарної фази культури додали в живильне середовище. Автори припустили, що життєздатні клітини продукують автоіндуктори, які стимулюють повернення до життя некультурабельних мікроорганізмів [37].

В роботі [38] досліджували здатність переходу ентерогеморагічної *Escherichia coli* O157: H7 (ЕНЕС) в ЖНС при температурі +5 і + 25 °С в штучній морській воді (ШМВ) і річковій воді (РВ). За температури 25 °С штамп залишався культивованим понад 40 днів в ШМВ та РВ. При 5 °С кількість культивованих клітин ЕНЕС поступово знижувалася в обох середовищах. Використовуючи BacLightMolecularProbe, дослідники змогли продемонструвати, що ці клітини, хоча і некультивовані, але були життєздатні [39].

На даний час відомо близько 45 видів мікроорганізмів, що відносяться до 30 родів, у яких виявлено ЖНС. З них 30 видів патогенні для людини, 15 видів умовно-патогенні. Серед бактерій, у яких виявлено ЖНС, є збудники таких небезпечних інфекцій як чума, холера, туляремія, легіонельоз. Більше 60% видів, що утворюють некультурабельну форму, грамнегативні. Близько 40% складають бактерії, що відносяться до трьох інших відділів царства *Procariotae*: грампозитивні бактерії, мікоплазми та архебактерії. Ці факти вказують на універсальність некультурабельного стану як загальнобіологічного явища і

наочно демонструють широке поширення феномена в природі [40].

Останніми дослідженнями встановлено, що крім бактерій ще ряд мікроорганізмів, при дії на них різних стрес-факторів, здатні переходити в життєздатний некультурабельний стан (ЖНС). До них відносяться мікроскопічні гриби (мікроміцети), такі як *Candida albicans* [41].

## **1.2 Вплив мікроорганізмів, які перебувають в життєздатному некультурабельному стані, на людину**

Життєздатні, проте некультурабельні патогенні бактерії є загрозою суспільному здоров'ю через неможливість їх визначення загальноприйнятими методами в харчових продуктах і при контролі якості води [1].

Відомо, що коли патогенні клітини в ЖНС проходять через організм людини, відбувається відновлення їх життєвих функцій і метаболічної активності, що призводить до інфекцій і хвороб [42, 43]. Наприклад, життєздатні але некультурабельні клітини *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Legionella pneumophila* та інші бактерії повертали культурабельність після того, як вони потрапляли в кишковий тракт тварин [44]. Так, після впорскування некультурабельних клітин *Legionella pneumophila* в курячі ембріони, ті загинули через добу, з чого можна зробити висновок, що клітини в ЖНС залишаються потенційно патогенними [45]. У некультурабельном стані *Aeromonas hydrophila* втрачає здатність лізувати еритроцити людини, але після реанімації вона відновлює свої вірулентні властивості. Так само і *Helicobacter pylori* в ЖНС, потрапивши в організм людини через питну воду, може легко відновити свою патогенність і викликати виразкову хворобу шлунку. Таким чином, наявність мікроорганізмів у життєздатному некультурабельному стані у питній воді є серйозною проблемою.

Дослідження зразків їжі або води загальноприйнятими методами, навіть при негативному результаті, не гарантує їх безпеки за мікробіологічними показниками, оскільки існує ймовірність не врахувати наявність в них патогенних бактерій, які перебувають в ЖНС. Таку продукцію вважають

безпечною для споживача, навіть при виникненні інфекції, її помилково відносять до вірусів, бо бактерії не були виявлені. Наприклад, *Vibrio cholerae* O1 в поверхневих шарах води, як правило, залишаються в некультурабельному стані. Однак, ці джерела води регулярно використовуються для побутових потреб і становлять небезпеку зараження [46].

Так само *Shigella*, перебуваючи в життєздатному некультурабельному стані у воді, представляє загрозу, оскільки при попаданні в людський організм викликає шигельоз, якому характерні загальна інтоксикація, ураження слизової оболонки товстого кишечника, що супроводжується різким болем і розладом [47]. Додаткові дослідження показали, що велика кількість патогенних бактерій може пережити технологічні процеси очищення продуктів харчування і води, а також зберегти вірулентність в оброблених харчових продуктах, пастеризованому молоці, питній воді, а також у навколишньому середовищі [48]. Одне дослідження показало, що рецидивні інфекції сечовивідних шляхів у багатьох людей були викликані уропатогенними клітинами *Escherichia coli*, які перебували в життєздатному некультурабельному стані [49]. Крім того, клітини в ЖНС продемонстрували стійкість до лікування антибіотиками і викликали повторне інфекційне зараження [50]. Інші дослідження показали, що уропатогенні *E. coli* в ЖНС зберігали ентеропатогенність, що виражалося в безперервному синтезі ентеротоксинів [51].

Таким чином, з огляду на наявність мікроорганізмів, що знаходяться в життєздатному, проте некультурабельному стані, а також їх здатність зберігати свої патогенні властивості, необхідно розробити і застосовувати додаткові методи оцінки якості питної води та продуктів харчування, з метою зниження ризику спалахів інфекційних захворювань.

### **1.3 Методи виявлення мікроорганізмів, які перебувають в життєздатному некультурабельному стані**

Існує ряд методів, які дозволяють виявляти мікроорганізми в життєздатному некультурабельному стані, такі як прямий підрахунок клітин в ЖНС методом

флуоресценції [52], використання полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [53], ПЛР зі зворотною транскрипцією [54], проточна цитометрія [55], імуноферментний аналіз [4], FISH (fluorescence in situ hybridization) [56].

Найбільш застосовуваний метод виявлення бактеріальних клітин в ЖНС – це флуоресцентна мікроскопія. Для цього використовують різні способи і флуоресцентні барвники (флюорохроми). Флюорохроми – специфічні барвники, що зв'язуються з різними компонентами бактеріальної клітини (цільовими біомолекулами), які стають маркерами життєздатності. Це дає чітке світіння певного кольору в ультрафіолетовій області спектру [57].

Часто використовувані флюорохроми – це акридіновий помаранчевий (живі клітини фарбуються в зелений колір, а мертві – в помаранчевий); 4,6-diamino-2-phenyl indole (DAPI) (під флуоресцентним мікроскопом живі клітини будуть зеленими); fluorescein isothiocyanate (FITC) (живі клітини фарбуються в фіолетовий або синій колір); indophenyl-nitrophenyl-phenyltetrazolium chloride (INT) (живі клітини будуть червоними) і 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC) [58].

Маркерами життєздатності в бактеріальній клітині можуть бути її структурні та функціональні елементи, такі як мембрана і мембранна прохідність, протеїни (ферменти) та їх активність, рибосоми, нуклеоїди та їх функціональність.

Одним з найбільш широко використовуваних маркерів життєздатності, що визначається за допомогою флюорохромів, є мембранна цілісність [59]. Для визначення мембранної цілісності використовується властивість деяких флюорохромів вибірково проникати тільки через пошкоджені мембрани клітин, фарбуючи внутрішньоклітинні структури у відповідний колір. Так, проникнення ряду нуклеоїдних барвників, таких як йодид пропідія або бромід етидія, всередину клітини відбувається тільки при пошкодженні клітинної мембрани, при цьому пов'язані з ними нуклеїнові кислоти дають емісію флуоресценції червоного кольору. На цій основі працює LIVE / DEAD (живий / мертвий) барвник BacLight, що представляє собою суміш фарб, за допомогою яких можна

відрізнити життєздатні клітини від мертвих [60]. Барвник містить два фарбувальних нуклеїдних компоненти. Зелений низькомолекулярний флюорохром (Syto 9) може проникати як в живі клітини з неушкодженою плазмалемою, так і в мертві клітини з порушеними плазматичними мембранами. Після надходження Syto 9 в клітини він зв'язується з нуклеїновими кислотами з утворенням зеленого флуоресцентного комплексу. Високомолекулярний червоний флюорохром йодид пропідія, в свою чергу, проникає тільки через пошкоджені мембрани. Після надходження він також зв'язується з нуклеїновими кислотами, що призводить до зниження флуоресценції в зеленій області, обумовленої комплексами Syto 9 з нуклеїновими кислотами, і появи флуоресценції в червоній області, спричиненої комплексами йодид пропідія. Таким чином, клітини, проінкубовані в присутності цих фарб одночасно, будуть флуоресценувати зеленим (життєздатні) або червоним (мертві), в залежності від їх життєздатності [61]. Далі можна провести підрахунок живих і мертвих клітин з використанням флуоресцентного мікроскопу [62].

Протягом останніх десятиліть були розвинені швидкі і точні методи індикації патогенів, засновані на полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР). Завдяки методу ПЛР можна дати якісну відповідь на питання про наявність в досліджуваному зразку ДНК мікроорганізму, що виявляємо, але не кількісну. Це істотно обмежує його використання. Наприклад, методи ПЛР застосовувалися для виявлення ЖНС *V. vulnificus*, але він показав сумнівну чутливість. Головна незручність таких методів – те, що вони також можуть ампліфікувати ДНК мертвих мікроорганізмів. В такому випадку, виявлення ДНК патогенів можна розглядати як хибнопозитивний результат, адже в зразках з навколишнього середовища завжди присутні мертві клітини, або вільна ДНК. Це особливо важливо, наприклад, для методів, що використовуються для контролю дезінфекції: інформацію про її ефективність можуть дати тільки життєздатні патогенні мікроорганізми (культурабельні і некультурабельні) [63].

Вперше запропоновано методичний підхід на основі послідовних реакцій зворотної транскрипції і розробленого кількісного варіанта ПЛР для виявлення і



доказу життєздатності бактерій в ЖНС. Метод виключає можливість індикації нежиттєздатних, мертвих клітин, що містять незруйнований генетичний матеріал, так як маркером присутності і життєздатності бактерій в цьому випадку є короткоживуча специфічна молекула мРНК свідомо експресованого в некультурабельній формі і відомого досліднику гена.

Вище перераховані методи дорогі, бо вимагають наявності високочутливих мікроскопів, барвників, маркерів і технологій, а також висококваліфікованого персоналу.

Також для виявлення мікроорганізмів, що перебувають в ЖНС, широко використовують методи відновлення їх культурабельності. Для цього іноді достатньо прибрати чинники, які несприятливо впливають на культуру, як, наприклад, показано для мікроорганізмів, що були під впливом гамма-променів [64]. Але в більшості випадків необхідно застосовувати індуктори реактивації (фізичні, хімічні, біотичні). Серед *фізичних факторів* найбільш часто до реактивації призводить підвищення температури з 0,5-6 °С до 20-22 °С або до 37 °С. Швидке збільшення колоній-утворюючих одиниць (КУО) в мікрокосмі розглядається як підтвердження реверсії, а не відновлення росту кількох клітин, що вижили [65]. Наприклад, *Vibrio vulnificus* стає некультурабельною в умовах голодування, при інкубації в штучній морській воді при низькій температурі. Повернення до кімнатної температури, без додавання поживних речовин, призводить до відновлення її культурабельності [36].

Як *хімічні індуктори* реактивації служать різні мікро- і макроеlementи, вітаміни, солі та інші речовини. Їх вводять безпосередньо в мікрокосм як протектор або до складу поживних середовищ, призначених для реактивації. Наприклад, для *Tenacibaculum sp.* бажаним компонентом середовища при реанімації некультурабельних форм є хлорид заліза [66]. *Vibrio parahaemolyticus* відновлюється при підвищенні температури до 25 °С в поєднанні з використанням мінімального сольового середовища. *Vibrio harveyi* і *Vibrio fischeri* відновлюють ріст при додаванні органічних або неорганічних джерел азоту, вуглецю або деструкторів перекису водню [67]. *Біотичними факторами* реактивації клітин,

що перебували в ЖНС, можуть бути: фетальна сироватка, супернатант зростаючої культури або виділений з неї рекомбінантний білок Rpf [68]. В результаті цього, життєздатні клітини продукують автоіндуктори, що стимулюють повернення до життя некультурабельних мікроорганізмів [69]. Іноді єдиний ефективний спосіб реактивації – це пасаж через сприйнятливий організм. Так, наприклад, рекультивація патогенних штамів сальмонел в ЖНС при введенні в організм чутливих тварин завжди приводила до позитивного результату [70].

#### **1.4 Характеристика мікроорганізмів *Escherichia coli* і *Candida albicans* та їх особливості**

Сьогодні мікробіологічний контроль якості води здійснюють, орієнтуючись на виявлення певних бактерій, вірусів і найпростіших. Серед них загально визнаним санітарно-показовим мікроорганізмом при оцінці якості знезараження води є кишкова паличка *Escherichia coli*, бо вона більш стійка у зовнішньому середовищі в порівнянні з іншими ентеробактеріями, зберігається тривалий час в ґрунті, воді, фекаліях і добре переносить висушування.

З одного боку, *Escherichia coli* – вид грамнегативних паличковидних бактерій, що входять до складу нормальної мікробіоти шлунково-кишкового тракту людини. Вона з'являється вже у новонароджених і живе в кишечнику все людське життя, виконуючи дуже важливі функції, такі як пригнічення росту шкідливих бактерій і участь в синтезі вітамінів В1, В2, В3, В5, В6, В9, В12; в обміні холестерину, білірубіну, холіну, жовчних і жирних кислот, впливає на всмоктування заліза і кальцію. Але з іншого боку, вона викликає ешеріхіози – інфекційні захворювання, що супроводжуються інтоксикацією і гарячкою. Хвороботворні, або патогенні, серотипи кишкових паличок, проникаючи через слизову кишечника в черевну порожнину (при порушенні цілості кишкової стінки), в сечовий міхур або кров – в ті тканини і органи, які в нормі стерильні, викликають захворювання цих органів або навіть сепсис [71].

Зараження ентеротоксичними штамми *Escherichia coli* зазвичай відбувається при вживанні неззараженої сирої води і сирих немитих овочів.

Тому, при контролі якості питної води дуже важливо визначати наявність *Escherichia coli*, оскільки вона, крім корисного впливу на організм людини, може спричинити ряд неприємних і навіть смертельних захворювань.

З іншого боку, останніми дослідженнями встановлено наявність мікроскопічних грибів (мікроміцетів) як в джерелах водопостачання, так і водопровідній воді. Однак кількісний показник мікроміцетів у водопровідній воді значно нижчий, особливо це стосується дріжджових форм. Так, якщо середнє значення грибів роду *Candida* в річці Дніпро становить  $1 \cdot 10^5$  КУО/100 см<sup>3</sup>, то у водопровідній воді цей показник змінюється в межах від 1 до 50 КУО/100 см<sup>3</sup>. Кількість міцеліальних видів грибів у воді річки Дніпро коливається в межах від 15 до 25 КУО/100 см<sup>3</sup>, тоді як для водопровідної води м. Києва це значення змінюється від 8 до 18 КУО/100 см<sup>3</sup>. При цьому в обох випадках виявлено роди *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium* та *Fusarium*, як стійкі до дії дезінфектантів і мають токсикогенні, алергенні і мутагенні властивості [72].

В даний час в навколишньому середовищі спостерігається заміна бактеріального компонента агресивнішим грибним, який звикли вважати умовно-патогенним, не враховуючи і не дооцінюючи його потенційних агресивних можливостей.

Мікроміцети здатні погіршувати органолептичні показники води, а також виділяти у водне середовище шкідливі для здоров'я людини речовини – мікотоксини [73].

Вживання їжі та води, забруднених мікотоксинами, супроводжується патологічними змінами в організмі людини і тварин – мікотоксикозами [74]. Зокрема, мікотоксини мають канцерогенну, мутагенну, тератогенну, ембріонотоксичну, алергенну, імуносупресивну дію. Різке збільшення кількості хворих, які страждають від системних і локальних мікозів, змушує фахівців приділяти цій проблемі максимум уваги і більш серйозно ставитися до виявлення окремих видів мікроміцетів при оцінці інфекційної небезпеки навколишнього

середовища [75]. Саме тому сьогодні багато авторів присвячують свої роботи дослідженню мікроміцетів у воді, продуктів їх життєдіяльності та їх впливу на здоров'я людини [76, 77, 78, 79].

Також слід зазначити, що як у випадку води джерел водопостачання, так і водопровідної води найчастіше виявляли гриби роду *Candida* [72].

На даний час відомо більше 150 видів кандід, в 95% випадків захворювання викликає *Candida albicans*.

*Candida albicans* – один з мікроорганізмів, що входить до складу нормальної мікробіоти ротової порожнини і шлунково-кишкового тракту людини. При нормальних обставинах, *Candida albicans* присутня у 80% людей, не викликаючи хвороб, хоча надзвичайне збільшення її кількості викликає кандидоз. Її розростанню сприяють токсини, в першу чергу хлор, фтор і ртуть, що містяться в продуктах харчування, воді, деяких ліках і косметичних засобах.

Ставши патогенною, кандіда пошкоджує стінку кишечника, і в кров починають проникати не лише токсичні продукти життєдіяльності мікроміцетів, а й окремі компоненти їжі. Це викликає цілий ряд загальних симптомів, як психічних (депресію, неспокій, зниження пам'яті і концентрації уваги, дратівливість), так і фізичних (болі в животі, порушення функцій кишечника, головні і суглобові болі, синусити, цистити, відчуття "розбитості", чутливість до окремих продуктів, тягу до солодкого і алкоголю, ін.). При активному розмноженні *Candida albicans* стає потенційно небезпечною для розвитку алергічних захворювань – специфічної бронхіальної астми, дерматиту, кропив'янки. Приблизно в 17% випадків кандіда виявляється в гастродуоденальних виразках, в 35% – при виразкових колітах і хворобі Крона, в 50% – при фіброміалгії, в 70% – при аутизмі. При важких формах *Candida albicans* може вражати навіть мозкові оболонки або клапани серця [80].

*Candida albicans* більш витривала і легше пристосовується до змін середовища, ніж бактерії. Виявляє високу резистентність до дезінфектантів, таких як хлор, озон і УФ-випромінювання. Тому, *Candida albicans* більш стійка у

порівнянні з *Escherichia coli*, яка на даний момент є основним загально визнаним санітарно-показовим мікроорганізмом при оцінці якості знезараження води.

Причинами такої стійкості *Candida albicans* можуть бути особливості будови її клітини. Вона, як і ссавці, відноситься до групи еукаріотів, тобто мають схожу з нами будову клітин і механізми їх розмноження, ділення і захисту.

Дріжджова клітина оточена досить товстою клітинною стінкою. Клітинна стінка – міцна, жорстка і водночас еластична структура, яка виконує ті ж функції, що і у бактерій. Однак, клітинна стінка дріжджів має тришарову структуру: перший, зовнішній, шар – ліпопротеїдний; середній – маннанпротеїновий комплекс; внутрішній, прилеглий до цитоплазматичної мембрани, – глюкановий. У хімічний склад стінки входять 60-90% полісахаридів (геміцелюлози, що складаються з рівних кількостей глюкану і манану), 3-10% ліпідів, 10-25% білків, 7-9% мінеральних речовин, 0,5-3% хітину.

Всередині розташовано багато органел: цитоплазматична мембрана, ендоплазматична мережа, ядро, мітохондрії, рибосоми, апарат Гольджі, лізосоми, вакуолі і включення. На відміну від бактеріальних клітин, такі внутрішні структури клітини, як мезосома, рибосоми, нуклеоїд мають мембрани, які відмежовують їх від цитоплазми і тим самим роблять клітину більш стійкою. Дріжджова клітина містить велику кількість мітохондрій, які утворюють АТФ і АДФ, вони являються «енергетичними станціями клітини».

Ще однією особливістю будови дріжджової клітини є наявність в ній апарату Гольджі, який керує багатьма фізіологічними процесами в клітині: транспортує різні речовини до місця їх використання або виділення з клітини, бере участь у формуванні клітинних перегородок, спор, видаляє з клітини токсичні речовини.

Запасними речовинами дріжджової клітини, що містяться в цитоплазмі і вакуолі, є гранули глікогену, цукор трегалоза, метахроматин і крапельки жиру. Глікоген накопичується в просторі між цитоплазматичною мембраною і клітинною стінкою, а жир в цитоплазмі та вакуолі виконує роль запасного

живильного матеріалу, являє собою суміш тригліцеридів з фосфоліпідами і стеролами (ергостеролами) [81, 82].

Таким чином, дріжджоподібна клітина *Candida albicans*, завдяки своїй складній будові, більш резистентна до дії дезінфектантів у порівнянні з *Escherichia coli* [83].

### **1.5 Виникнення мікроорганізмів у життєздатному некультурабельному стані в процесі знезараження питної води**

Ефективність технологій дезинфекції питної води має важливе значення для безпеки здоров'я людини. Для контролю бактерій та патогенних мікроорганізмів у питній воді, різними країнами і міжнародними організаціями розроблено строгі критерії [84, 85, 86]. З метою кількісної оцінки культивованих бактерій, які містяться в пробах аналізованої води, застосовуються метод Коха. Доцільність використання цього методу є присутність життєздатних бактерій, які культивуються, що свідчить про їх життєздатність. Проте, при наявності стрес-факторів багато, та навіть більшість бактерій можуть переходити в життєздатний, але некультурабельний стан. При застосуванні класичних підходів культивування ці мікроорганізми не утворюють колонії, проте залишаються живими і здатні до відновлення метаболічної активності при потраплянні в сприятливе середовище. Багато патогенних мікроорганізмів, що розвиваються у питній воді, здатні перебувати у життєздатному некультурабельному стані, а саме: *Helicobacter pylori* [87], *Legionella pneumophila* [88], *Pseudomonas aeruginosa* [89], *Listeria monocytogenes* [90], *Vibrio spp.*, *Yersinia enterocolitica* [91] і *Escherichia coli* [92]. Тому поява бактерій в життєздатному некультурабельному стані в питній воді є серйозною проблемою, що становить загрозу суспільному здоров'ю.

Для уникнення ряду неприємних захворювань, які викликають мікроорганізми, вже протягом багатьох десятиліть для знезараження води в світі широко використовують такі методи знезараження як хлорування, озонування і ультрафіолетового (УФ)-випромінювання (таб. 1.2) [93].

Таблиця 1.2 – Сучасні технології дезинфекції (%), що використовуються на водопроводах ряду країн світу

Технології, дезинфектанти	Японія	США	Італія	Норвегія	Україна
Хлор-газ	43	54	2	7	98
Гіпохлорит натрію	54	32	63	30	1,1
Диоксид хлору	-	4	31	-	<1
УФ-випромінювання	1,5	<1	3	62	<1
Озон	<1	9	<1	<1	<1
Інші технології	<1	<1	<1	<1	<1

Однак, дезинфікуючі речовини можуть стати хімічними індукторами переходу мікроорганізмів у ЖНС. Наприклад, дезинфекція хлором при вторинному очищенні стічних вод викликає перехід *Escherichia coli* і *Salmonella typhimurium* в ЖНС [94]. Крім того, дезинфекція ультрафіолетом [95] та озоном [96] також викликають перехід мікроорганізмів в ЖНС.

При застосуванні мінімальної рекомендованої знезаражуючої дози, яка становить  $45 \text{ мДж/см}^2$ , за результатами оцінки якості знезараження питної води стандартними методами (метод Коха), вода вважається знезараженою від санітарно-показового мікроорганізму *Escherichia coli*. Однак, показано, що така доза не забезпечує знезараження води від мікроорганізмів, а сприяє їх переходу в некультурабельний стан [95].

Також, у роботі [21] було показано, що навіть при УФ-дозі  $300 \text{ мДж/см}^2$  клітини *Escherichia coli* і *Pseudomonas aeruginosa* переходять у життєздатний некультурабельний стан. Ці результати свідчать про потенційні ризики для здоров'я після дезинфекції питної води УФ.

Як видно з таблиці 1.2, метод хлорування досі залишається найбільш вживаним для знезараження води.

Перевагою хлорування в технологіях водопідготовки є його висока бактерицидність, простота дозування і контролю, помірна вартість і, що особливо важливо, здатність зберігати свої антимікробні властивості тривалий час, що

дозволяє транспортувати знезаражену хлором воду трубопроводами на значні відстані.

Крім того, попереднє хлорування води дозволяє знизити кольоровість води, усунути її запах і присмак, зменшити витрату коагулянтів, а також підтримувати задовільний санітарний стан очисних споруд станцій водопідготовки.

Правильне визначення дози хлору при знезараженні води має виключно важливе значення. Недостатня доза хлору може мати низьку необхідну бактерицидну дію, надмірна – призводить до погіршення смакових якостей води. Тому необхідна концентрація хлору повинна бути встановлена в залежності від властивостей води, що очищається, на підставі попереднього лабораторного аналізу цієї води.

Показником достатності використаної дози хлору служить наявність у воді так званого залишкового хлору (що залишається у воді від введеної дози після окиснення речовин, які знаходяться у воді). Згідно з вимогами ГОСТ 2874-73, концентрація залишкового хлору у воді повинна складати: перед надходженням її в мережу – від 0,3 до 0,5 мг/дм<sup>3</sup>; для освітленої річкової води – в межах 1,5-3 мг/дм<sup>3</sup>; під час хлорування підземних вод – не перевищувати 1-1,5 мг/дм<sup>3</sup>. В окремих випадках може з'явитися необхідність в збільшенні дози хлору через наявність у воді закисного заліза. При підвищеному вмісті у воді гумінових речовин концентрація хлору також повинна зростати.

Хлор впливає, в основному, на вегетативні форми мікроорганізмів. При цьому грам-позитивні штами бактерій більш стійкі до впливу хлору, ніж грам-негативні.

Високу резистентність до дії хлору мають також віруси, спори і цисти найпростіших та яйця гельмінтів.

Ефективність дезінфекції, зазвичай, визначається контролем культурабельності коліформних бактерій. Однак, відсутність культурабельних бактерій не визначає дійсного стану вихідної популяції. Наприклад, після впливу на популяцію *Escherichia coli* K-12 гіпохлоритною кислотою (HOCl) утворюються життєздатні, але некультурабельні бактерії, які не здатні сформувати колонії, але



все ще проявляють дихальну або метаболічну активність, та піддаються виявленню пробами на життєздатність, такими як СТС (5-ціано-2,3-дитіол тетразоліум хлорид) і INT [2- (p-йодофеніл) -3- (p-нітрофеніл) - 5-феніл тетразоліум хлорид] [20].

Незважаючи на широке поширення в навколишньому середовищі життєздатних але некультурабельних мікроорганізмів, до теперішнього часу при оцінці якості води за мікробіологічними показниками визначають життєздатні клітини *Escherichia coli* методом прямого посіву на середовище Ендо згідно ДСанПіН 2.2.4-171-10. При цьому не враховується факт впливу хлору на появу життєздатних але некультурабельних клітин, які за певних умов можуть викликати спалахи інфекційних захворювань, що вже мало місце в м. Новосибірську (Російська Федерація), коли вода, яка відповідала ГОСТ 2874-82, призвела до появи захворювання у населення міста [97] .

У зв'язку з цим, виникає необхідність проведення циклу досліджень для визначення переходу в ЖНС культури *Escherichia coli*, як основного санітарно-показового мікроорганізму, використовуваного для оцінки безпеки питної води, а також мікроміцета, що повсюдно виділяється із води – *Candida albicans*, під впливом хлору. А також необхідно провести пошук нових ефективних методів для повного звільнення водопровідної води від мікроорганізмів, що можуть перебувати в життєздатному, однак некультурабельному стані.

## ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 1

Таким чином, з аналізу літератури видно, що наявність у питній воді мікроорганізмів, що перебувають у життєздатному некультурабельному стані, становить серйозну загрозу для здоров'я населення. Приведені у літературі дані свідчать про необхідність внесення змін до методики визначення якості води, що надходить до споживача. Класичні методи підготовки питної води не забезпечують повне знезараження води від мікроорганізмів, а навпаки сприяють їх переходу у життєздатний некультурабельний стан. Дані про видалення

мікроорганізмів, що перебувають у життєздатному некультурабельному стані, практично відсутні.

Саме тому експериментальна частина цієї дисертаційної роботи присвячена, по-перше, розробці надійної методики виявлення мікроорганізмів у життєздатному некультурабельному стані у питній воді, по-друге, розробці надійного способу вилучення цих мікроорганізмів з питної води.

## РОЗДІЛ 2

### ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1 Об'єкти досліджень

##### 2.1.1 Джерела водопостачання та водопровідна вода.

Проби води для дослідження відбирали в м. Києві зі свердловин, розташованих у Дарницькому та Святошинському районах, та водопровідних кранів за адресами: вул. Героїв Севастополя, вул. Волго-Донська, бульв. Вернадського, вул. Е. Потьє, вул. Підлісна.

##### 2.1.2 Ентеробактерії та дріжджоподібні гриби.

Бактеріальну культуру *Escherichia coli* 1257 отримали в Державному науково-дослідному Інституті стандартизації та контролю медичних біологічних препаратів ім. Л. А. Тарасевича.

Дріжджоподібний гриб *Candida albicans* 10231 отримали з Музею епідеміології інфекційних захворювань імені А.В. Громашевського АМН України.

#### 2.2 Методики проведення експерименту

##### 2.2.1 Методика відбору проб води та проведення мікробіологічних та мікологічних досліджень.

Проби води для дослідження відбираються загально прийнятими методами у спеціально призначені для такого відбору стерильні флакони місткістю не менше 500 см<sup>3</sup> зі щільно прилягаючими ковпачками згідно з [98]. Проби водопровідної води з кранів відбирають після стерилізації останніх шляхом

фламбування змоченим у спирті тампоном та наступним спусканням води впродовж 10-15 хвилин. Відібрані проби маркують, вказуючи дату, час та адресу. Проби доставляють в продезинфікованих термоконтейнерах при температурі  $6\pm 2$  °C. В холодний період року контейнери повинні мати терморегулюючі прокладки, що запобігають промерзанню проб. При дотриманні вказаних умов термін початку дослідження не повинен перевищувати 6 годин.

Перед дослідженням пробу води ретельно перемішують. Край ємності фламбують для запобігання можливого вторинного забруднення, яке може мати місце при транспортуванні. Проби води підлягають фільтруванню.

Для фільтрування використовують мембранні фільтри з діаметром пор 0,22 мкм (Владіпор). Перед фільтруванням в день посіву фільтри стерилізують кип'ятінням або іншим способом, рекомендованим фірмою-виробником. Підготовлені фільтри використовують впродовж робочого дня.

Лійку та столик фільтрувального апарату протирають ватним тампоном, змоченим спиртом, і стерилізують фламбуванням. Після охолодження на столик фільтрувального апарату стерильним пінцетом накладають підготовлений мембранний фільтр, притискуючи його лійкою, яку закріплюють пристроєм, передбаченим конструкцією приладу.

Після фільтрування лійку знімають, стерильним пінцетом фільтр переносять, не перевертаючи, на поверхню поживного середовища в чашках Петрі. На одній чашці розміщується один фільтр. На дні чашки роблять напис із зазначенням об'єму профільтрованої води, дати посіву і номера проби.

Об'єми води, які фільтрують крізь фільтр, залежать від передбачуваного ступеня контамінації води мікроорганізмами (від 10 до  $333 \text{ см}^3$ ). Чашки з фільтрами інкубують в термостаті при  $28\pm 1$  °C впродовж 7 діб чи при  $37\pm 1$  °C – 1 добу, в залежності від виду культури, яку сподіваються виявити. Колонії, що виростають в чашках Петрі, підраховують щоденно. Для запобігання висихання агару в чашках останні слід розміщувати в спеціальних контейнерах або целофанових пакетах.

### 2.2.2 Методика культивування мікроорганізмів.

Культивування бактеріальної культури *Escherichia coli* 1257 здійснювали в поживному бульйоні (ПБ) [99]. Одноденну бульйонну культуру центрифугували при швидкості 7000 обертів за хвилину протягом 15 хвилин. Отриманий осад тричі відмивали у ізотонічному розчині хлориду натрію та ресуспендували у тому ж розчині до густини  $1 \cdot 10^8$  КУО в одному  $\text{см}^3$ . Необхідний об'єм вихідної суспензії вносили у приготовлену дехлоровану водопровідну воду або стерильну дистильовану воду, встановлюючи певний ступінь зараження води, що вимірюється в КУО/ $\text{см}^3$ .

Культивування дріжджеподібних грибів *Candida albicans* здійснювали на рідкому живильному середовищі Сабуро [100]. Дводенну бульйонну культуру (бульйон Сабуро) центрифугували при швидкості 7000 об/хв протягом 15 хвилин. Отриманий осад тричі відмивали у ізотонічному розчині хлориду натрію та ресуспендували у тому ж розчині до густини  $1 \cdot 10^7$  КУО в одному  $\text{см}^3$ . Необхідний об'єм вихідної суспензії вносили у приготовлену дехлоровану водопровідну воду або стерильну дистильовану воду, встановлюючи певний ступінь зараження води.

### 2.2.3 Методика переведення культур в життєздатний некультурабельний стан за допомогою гіпохлориту натрію.

Переведення культури в життєздатний некультурабельний стан здійснювали з використанням гіпохлориту натрію (NaOCl) на стерильній дистильованій воді [101, 102].

Вживання мікроорганізмів після впливу на них NaOCl визначали за наявністю КУО при посіві відібраних проб води на агаризоване середовище. Для цього в стерильні флакони, що містять  $50 \text{ см}^3$  дистильованої води, додавали певну кількість свіжоприготовлених культур *Escherichia coli* або *Candida albicans*, щоб навантаження в робочій суспензії (р/с) становила  $1 \cdot 10^4$ - $1 \cdot 10^6$  КУО/ $\text{см}^3$ . Потім досліджували вплив NaOCl в діапазоні концентрацій від 0,1 до 6 мг/ $\text{дм}^3$ ,

попередньо посіявши контроль культури на чашки Петрі з середовищем Ендо або агаром Сабуро. Відбір проб проводили через 10, 30 і 60 хв. По закінченню цього часу вільний хлор в р/с зв'язували тіосульфатом натрію (0,1 н  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ). Чашки Петрі поміщали в термостат з  $t = 37 \text{ }^\circ\text{C}$  або  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ . Через 18-24 год для *Escherichia coli* і 48 год для *Candida albicans* проводили підрахунок колоній. Результат виражали як логарифм відношення концентрації тест-мікроорганізму, яка залишилася в суспензії після обробки гіпохлоритом натрію ( $N_t$ ), до вихідної його концентрації ( $N_0$ ).

Концентрацію хлору у робочій суспензії визначали титриметричним методом за стандартною методикою [103].

#### **2.2.4 Методика проведення мікробіологічних досліджень при розробці способу виявлення клітин, що перебувають в життєздатному некультурабельному стані.**

З метою виявлення клітин *Escherichia coli* і *Candida albicans* в життєздатному некультурабельному стані необхідно їх реактивувати, для чого р/с з культурою *Escherichia coli* вносили в поживний бульйон (ПБ), а з культурою *Candida albicans* – у бульйон Сабуро (БС) (оптимальні середовища для розмноження та зростання даних культур), а також, обидві робочі суспензії вносили в поживне середовище М-9.

Поживне середовище М-9 містить: хлорид амонію, який є джерелом азоту, фосфат натрію і фосфат калію – присутні в якості буферних агентів, а хлорид натрію забезпечує необхідні іони. Після додавання і розчинення всіх перерахованих вище солей, отриманий розчин стерилізували в автоклаві при 1 атм. ( $T = 121 \text{ }^\circ\text{C}$ ) протягом 15 хв. При приготуванні синтетичного живильного середовища М-9 жорстко контролювали  $\text{pH} = (6,85 \pm 0,15)$ .

Робочі суспензії відбирали в заздалегідь підготовлені пробірки, що містили поживні середовища ПБ або БС, а також середовище М-9 у співвідношенні 1:10, і ретельно перемішували. Перед внесенням робочих суспензій в середовище М-9

додавали стерильні 20 % розчини глюкози (являється джерелом енергії і вуглецю), а також розчини хлоридів магнію і кальцію (сприяють збільшенню росту мікроорганізмів). Попередньо перевіряли стерильність всіх складових компонентів середовища М-9. Ці пробірки з поживними середовищами, а також вихідні робочі суспензії поміщали в термостат з  $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Через 18-24 год проводили посіви як робочих суспензій, так і поживних середовищ з робочими суспензіями (1:10) на стерильні чашки Петрі по  $1\text{ см}^3$  і заливали поживним середовищем Ендо або Сабуро агаром, відповідно класифікації культур, після чого чашки поміщали в термостат. З метою визначення кінетики відновлення життєздатних некультурабельних клітин *Escherichia coli* і *Candida albicans* щодня протягом 4-5 діб р/с вносили в пробірки з середовищем ПБ або БС, а також з М-9. Після цього їх поміщали в термостат і висівали на поживні середовища, як описано вище.

### **2.2.5 Методика визначення впливу температури на реактивацію культур, що перебувають в життєздатному некультурабельному стані.**

Робочі суспензії, що містять інактивовані клітини *Escherichia coli* або *Candida albicans*, поміщали в поживні серед ПБ або СБ, а також в середовище М-9 у співвідношенні 1:10. Всі проби з інактивованими клітинами *Escherichia coli*, або *C. albicans* (р/с, р/с+ПБ і р/с+М-9) витримували при температурах  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $27\text{ }^{\circ}\text{C}$  і  $9\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Посіви проводили через кожну добу.

### **2.2.6 Метод ідентифікації клітин в життєздатному некультурабельному стані шляхом прямої мікроскопії.**

Щоб ідентифікувати живі, мертві клітини і клітини в життєздатному але некультурабельному стані застосували метод прямої їх мікроскопії. З цією метою був використаний розчин барвника трипанового синього (ТС марка НПФ Сінбіас, ЧДА). Для приготування 0,5%-ного розчину 500 мг барвника розчиняли в  $100\text{ см}^3$

гарячого (80-90 °С) 0,9%-ного розчину хлориду натрію. Розчин перемішували 10 хв на магнітній мішалці і фільтрували через фільтрувальний папір. Готовий розчин зберігали при 10-20 °С. Безпосередньо перед вживанням розчин барвника фільтрували через тонкий шар вати, щоб позбутися осаду.

Перед приготуванням препарату для мікроскопії, до культури клітин і барвнику додавали диметилсульфоксид  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$  (безбарвна рідина, важливий біполярний апротонний розчинник) марки ПанЕко, виробник США.

Препарати для мікроскопії готували за методом [104] і досліджували під світловим мікроскопом Carl Zeiss Axio ObserverA1 під збільшенням ок 10 х об 40, з використанням фотокамери Axio Cam ERc 5s (все -Carl Zeiss, Germany) і програмного забезпечення ZEN 2012.

### **2.2.7 Методика визначення рН води.**

Величину рН води визначали з використанням скляного електроду, для порівняння використовували хлор-срібний електрод [105].

### **2.2.8 Методика доочищення питної води за допомогою контактної флокуляції.**

Дослідження з відпрацювання технології контактної-флокуляційної доочистки питної води від мікробіологічних забруднень (бактерій, мікроскопічних грибів), що перебувають в життєздатному некультурабельному стані проводили на лабораторній установці, наведеній на рис. 2.1.

Вихідна вода, що підлягає доочищенню, подається в резервуар (2), звідки насосом-дозатором (3) через регулюючий запірний вентиль подається на контактну-флокуляційний фільтр із зернистим завантаженням (6). З резервуару (4) розчин флокулянта за допомогою насоса-дозатора (5) надходить на фільтр із зернистим завантаженням (6), з якого відводиться вже доочищена вода. Резервуаром вихідної води слугував скляний бутель місткістю 25 дм<sup>3</sup>, куди



поміщали 22 дм<sup>3</sup> попередньо підготовленої дехлорованої водопровідної води, з наступним додаванням необхідної кількості вихідної суспензії бактерій *Escherichia coli* або дріжджоподібних грибів *Candida albicans*, отриманих за вище описаною методикою.

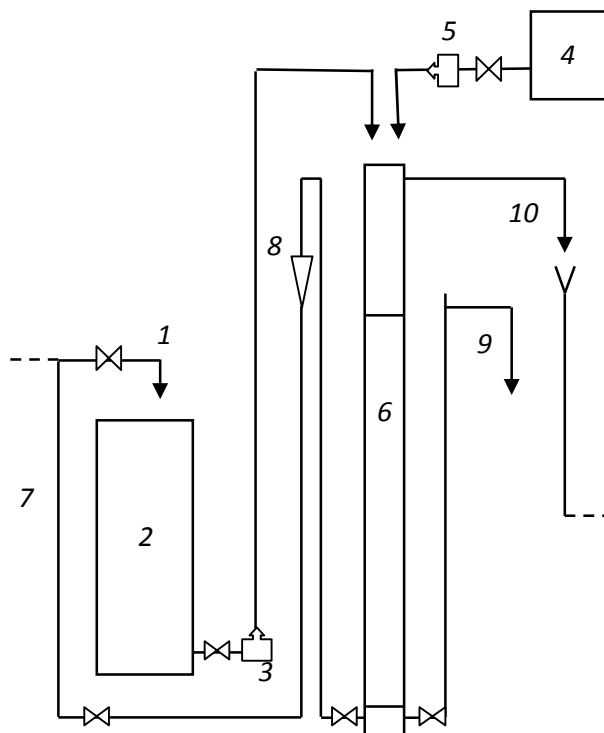


Рисунок 2.1 – Принципова схема контактно-флокуляційного фільтру для доочищення води, де 1 – подача вихідної води на доочищення; 2 – резервуар з водою на доочищення; 3 – насос-дозатор 1; 4 – резервуар з флокулянтном; 5 – насос-дозатор 2; 6 – контактно-флокуляційний фільтр; 7 – забор води для промивання; 8 – ротаметр води для промивання; 9 – відведення доочищеної води; 10 – відведення промивної води; X – запірні вентиля

Виявлення клітин *Escherichia coli* або *Candida albicans* у життєздатному некультурабельному стані здійснювали за вище згаданою методикою. Для цього, робочу суспензію після обробки NaOCl вносили у живильне середовище М-9 у співвідношенні 1:10, відповідно, і ретельно перемішували. Проби поміщали в термостат, при 37 °С на 24 год. Рекультивовані клітини визначали за наявністю КУО при посіві термостатованих проб на селективне агарове диференційно-діагностичне середовище через добу культивування при 37 °С.

Для подачі контамінованої води на доочистку використовували насос-дозатор з регулюванням його продуктивності подачі води. В якості фільтра з зернистою завантаженням використовували скляну колонку діаметром 3,4 см, площею – 9,61 см<sup>2</sup>. Як завантаження використовували Волгоградський кварцовий пісок (діаметром зерен 0,5-0,8 мм), або мезопористе кісточкове активоване вугілля (КАВ) (питомою площею поверхні 1036,4 м<sup>2</sup>/г). Висота завантаження фільтра становила 60 см. Швидкість подачі води – 5,5 м/год, продуктивність – 5,6 дм<sup>3</sup>/год доочищеної води.

Резервуаром розчину флокулянта слугувала скляна посудина місткістю 2 дм<sup>3</sup> з нижнім боковим відводом розчину флокулянта, який за допомогою насоса-дозатора подавався в фільтр із зернистим завантаженням. Як флокулянт використовували полідіалілдиметиламоній хлорид (ДБ-45) (молекулярна маса 20000...1000000, SNF S.A. (Франція), ТУ У 2227 – 184 – 00203312 – 1998), концентрація якого становила 0,5 чи 1 мг/дм<sup>3</sup>.

Відведення води з фільтра здійснювали на рівні висоти завантаження через трикутний з'єднувач з повітрям для запобігання засифонування відведення доочищеної води. Фільтрат відбирали щогодини.

Очищену воду аналізували за класичними мікробіологічним та мікологічним методами виявлення мікроорганізмів, а також за запропонованим способом виявлення життєздатних некультурабельних мікроорганізмів у воді. В доочищеній воді вимірювали також концентрацію залишкового флокулянту.

В кінці кожного експерименту проводили промивку фільтру протитоком водопровідної води. Інтенсивність подачі промивних вод контролювали ротаметром (8). Відведення доочищеної води здійснювали по трубопроводу (9) в приймальну ємність. Відведення промивної води здійснювали в каналізацію (10).

### **2.2.9 Методика вимірювання залишкової концентрації солей полідіалілдиметиламоній хлориду.**

Вимірювання масової концентрації солей полідіалілдиметиламоній хлориду у воді проводили спектрофотометричним методом за методикою [106].

### 2.2.10 Оцінка достовірності результатів експерименту.

Результати виражали, використовуючи модель Чіка – Ватсона (Chick-Watson), як від’ємний логарифм співвідношення колоній мікроорганізмів, що вижили після обробки води ( $N_t$ ), до вихідної їх кількості ( $N_0$ ) [107].

### 2.2.11 Розрахунок похибки вимірювань

Розраховували похибку вимірювань ступеня доочищення води від культур *Escherichia coli* та *Candida albicans*.

Розрахунки проводили за наступними рівняннями (2.1):

$$x_{cp} = (x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n) / n, \quad (2.1)$$

де  $x_{cp}$  – середній показник ступеня доочищення води;  $x_1, x_2, x_3 \dots x_n$  – показники вимірювань ступеня доочищення води;  $n$  – кількість вимірювань.

Знайшовши значення  $x_{cp}$ , обчислюють відхилення від середнього для кожного експерименту (2.2):

$$\varepsilon_1 = x_1 - x_{cp}, \quad (2.2)$$

де  $\varepsilon_1$  – відхилення від середнього значення, тобто різниця між експериментально встановленим значенням ( $x_1$ ) і середнім з серії значень, що включає дане значення ( $x_{cp}$ ).

Найбільш правильно вважати середньою похибкою середнє з усіх відхилень, взятих в абсолютному значенні (не враховуючи їх знака) (2.3), тобто:

$$\varepsilon_{c.n} = (\varepsilon_1 + \varepsilon_2 + \varepsilon_3 + \dots + \varepsilon_n) / n \quad (2.3)$$

Отримавши цю величину, ми можемо написати, що шукана величина дорівнює  $A \pm \varepsilon_{c.n}$  [108].

### 2.2.12 Математична модель досліджених процесів

Математичні моделі для усіх процесів фільтрування шукали за допомогою методу нелінійної регресії в офісному додатку Gnumerric, а для статистичного аналізу даних використовували програму PSPP [109].

## РОЗДІЛ 3

## ВИЯВЛЕННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ У ЖИТТЄЗДАТНОМУ НЕКУЛЬТУРАБЕЛЬНОМУ СТАНІ У ВОДІ

Сьогодні мікробіологічний контроль якості води здійснюють, орієнтуючись на виявлення певних бактерій, вірусів і найпростіших. Серед них, загально визнаним санітарно-показовим мікроорганізмом при оцінці якості знезараження води є *Escherichia coli* (кишкова паличка), яка є більш стійкою у зовнішньому середовищі в порівнянні з іншими ентеробактеріями, зберігається тривалий час (декілька місяців) в ґрунті, воді, фекаліях і добре переносить висушування.

Зараження ентеротоксичними штамами *Escherichia coli* зазвичай відбувається при вживанні незнезараженої сирової води. Тому, при контролі якості питної води дуже важливо визначати наявність *Escherichia coli*, бо вона та продукти її життєдіяльності (токсини) викликають різні інфекційні захворювання, що протікають з інтоксикацією, лихоманкою, зазвичай з ураженням шлунково-кишкового тракту, рідше – сечовивідних, жовчовивідних шляхів, інших органів або з розвитком сепсису. Ешерихіози частіше зустрічаються у дітей та у людей похилого віку [110].

Слід зазначити, що в даний час в навколишньому середовищі спостерігається заміна бактеріального компонента агресивнішим грибковим, який звикли вважати умовно-патогенним, не враховуючи і недооцінюючи його потенційних агресивних можливостей. Так, останніми дослідженнями встановлено широке розповсюдження мікроскопічних грибів (мікроміцетів) в джерелах водопостачання України. Такі роди як *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Candida* та *Fusarium* найчастіше виявлялись в процесі моніторингу води. Вони стійкі до дії дезинфектантів і мають токсикогенні, алергенні та мутагенні властивості [72]. Мікроміцети здатні погіршувати

органолептичні показники води, а також виділяти у водне середовище шкідливі для здоров'я людини речовини – мікотоксини [73].

Показано, що дріжджоподібні гриби роду *Candida* є найбільш поширеним видом серед мікроміцетів, а їх кількість коливається в межах від  $1 \cdot 10^2$  до  $10^5$  КУО/100 см<sup>3</sup> [72]. При аналізі води водорозподільних систем м. Києва виявлено, що дріжджоподібні гриби зустрічаються повсюдно, незалежно від періоду експлуатації трубопроводів, у кількості від одиниць до десятків КУО/100 см<sup>3</sup> [73].

Останніми дослідженнями встановлено, що ряд мікроорганізмів при дії на них різних стрес-факторів здатні переходити в життєздатний некультурабельний стан. При цьому, клітина не росте на класичних поживних середовищах, але залишається життєздатною [111]. Відомо, що клітини при встановленні оптимальних умов для росту і розвитку повертаються в культурабельний стан, відновлюючи свої патогенні властивості. Наявність культури в життєздатному некультурабельному стані збільшує ймовірність отримати помилково-негативні результати лабораторних досліджень стандартизованими методами [112].

Встановлено, що використання класичних методів знезараження води не забезпечує ефективного видалення цих мікроорганізмів або вимагає підвищених доз реагентів. Серед класичних методів знезараження води в практиці водопідготовки найбільш часто застосовують сполуки хлору.

Приймаючи до уваги з одного боку здатність *Escherichia coli* переходити в ЖНС під дією різних фізико-хімічних стрес-факторів, а з іншого – наявність як в поверхневих джерелах водопостачання, так і у водопровідній воді дріжджоподібних грибів *Candida albicans*, виникає необхідність оцінити можливість утворення некультурабельного стану у бактерій *Escherichia coli* та у грибів *Candida albicans* під впливом гіпохлориту натрію, а також визначити параметри їх реактивації шляхом встановлення оптимальних концентрацій складових поживних середовищ та умови культивування мікроорганізмів, що дозволить запропонувати простий і інформативний метод їх виявлення.

### 3.1 Дослідження впливу гіпохлориту натрію на санітарно-показовий мікроорганізм *Escherichia coli*

У зв'язку з тим, що *Escherichia coli* є загально визнаним санітарно-показовим мікроорганізмом при оцінці якості знезараженої води, нами проведено дослідження щодо виявлення виживаності бактерій при впливі на них NaOCl в різних концентраціях. Показано, що антимікробний ефект зростає зі збільшенням концентрації гіпохлориту натрію, що цілком закономірно, а також залежить від ступеня зараження води бактеріальною культурою. Тому було проведено вибір оптимальних концентрацій гіпохлориту натрію, що забезпечують повне знезараження води від культури *Escherichia coli*. Результативність дії гіпохлориту натрію оцінювали, застосовуючи стандартні мікробіологічні методи оцінювання якості знезараженої питної води [113].

Встановлено, що концентрації NaOCl за активним хлором в діапазоні 0,1-1 мг/дм<sup>3</sup> при початковому навантаженні *Escherichia coli* 1257 1·10<sup>6</sup> КУО/см<sup>3</sup> не призводять до повного знезараження води, а тільки частково зменшують ступінь забруднення, очевидно це пов'язано з недостатньою кількістю активного хлору, що інактивує клітини мікроорганізмів. Повне знезараження води від культури *Escherichia coli* 1257 спостерігається при концентрації NaOCl 2-5 мг/дм<sup>3</sup> (рис. 3.1).

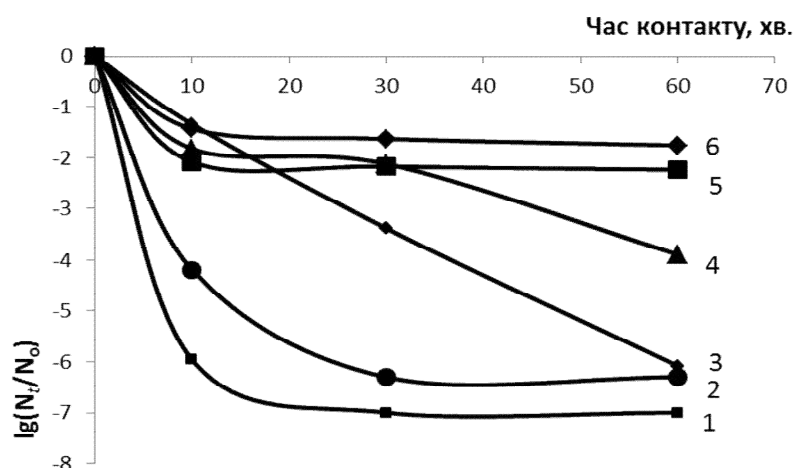


Рисунок 3.1 – Кінетика знезараження води від культури *Escherichia coli* NaOCl концентраціями, мг/дм<sup>3</sup>: 1 – 5; 2 – 3; 3 – 2; 4 – 1; 5 – 0,3; 6 – 0,1

Аналогічні експерименти проведено з культурою *Escherichia coli* K-12, які показали, що цей штам бактерій має схожий ступінь інактивації при впливі гіпохлориту натрію в аналогічному діапазоні концентрацій.

Отже для подальшої роботи з виявленням клітин в некультурабельному стані обрано робочі концентрації NaOCl, рівні 2-3 мг/дм<sup>3</sup>.

### **3.2 Дослідження впливу гіпохлориту натрію на дріжджоподібний гриб *Candida albicans***

У зв'язку з тим, що *Candida albicans* часто зустрічається як в поверхневих водах, так і у водопровідній воді, нами проведено дослідження щодо виявлення виживаності бактерій при впливі на них NaOCl в різних концентраціях. Результативність дії гіпохлориту натрію оцінювали, застосовуючи стандартні мікробіологічні методи оцінювання якості незараженої питної води [114].

Досліджено вплив гіпохлориту натрію в діапазоні концентрацій від 0,5 до 6 мг/дм<sup>3</sup> при незараженні води від культури *Candida albicans* з навантаженням  $1,5 \cdot 10^4 - 1 \cdot 10^5$  КУО/см<sup>3</sup>.

При проведенні серії експериментів встановлено, що NaOCl має слабку фунгіцидну дію, а для підвищення ступеня незараження виникає необхідність використання його в підвищених концентраціях. Показано, що збільшення ступеня інактивації культури пропорційне збільшенню концентрації дезінфектанту (рис. 3.2).

Так, при концентрації NaOCl 0,5 мг/дм<sup>3</sup> спостерігається слабе незараження води від *Candida albicans* з вихідним навантаженням  $1,5 \cdot 10^4$  КУО/см<sup>3</sup>. Водночас зростання концентрації гіпохлориту натрію до 2,0 мг/дм<sup>3</sup> дозволяє підвищити ступінь інактивації культури до чотирьох з половиною порядків через 30 хв контакту.

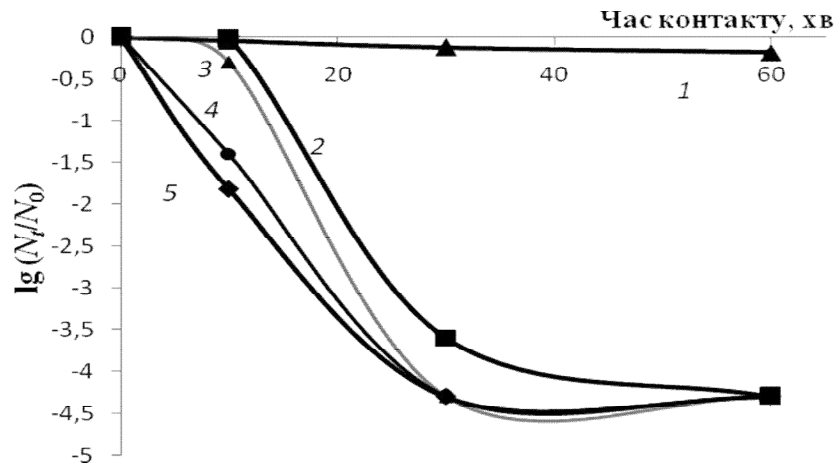


Рисунок 3.2 – Кінетика знезараження води від культури *Candida albicans* NaOCl концентраціями, мг/дм<sup>3</sup>: 1 – 0,5; 2 – 2,0; 3 – 3,0-4,0; 4 – 5,0; 5 – 6,0

При концентрації NaOCl 3-4 мг/дм<sup>3</sup> вже через 10 хв контакту дезінфектанта з культурою *Candida albicans* ступінь знезараження дорівнює півпорядку від початкового значення концентрації культури ( $4 \cdot 10^4$  КУО/см<sup>3</sup>), тоді як при 5 і 6 мг/дм<sup>3</sup> NaOCl він становить 1,4 і 1,7 порядки.

Подальше збільшення часу контакту культури з дезінфектантом призводить до повного знезараження води від мікроміцетів при використанні класичного мікробіологічного методу оцінки якості води. Однак, як показують подальші дослідження, застосування NaOCl сприяє утворенню життєздатного некультурабельного стану у культури *Candida albicans*.

### 3.3 Вибір методу рекультивації життєздатних некультурабельних мікроорганізмів

Існує ряд методів, які дозволяють виявляти мікроорганізми в ЖНС, такі як прямий підрахунок клітин в ЖНС методом флуоресценції, ПЛР-діагностика, ПЛР зі зворотною транскрипцією, проточна цитометрія, імуноферментний аналіз, FISH (fluorescence in situ hybridization).

Однак, вище перераховані методи досить дорогі, так як вимагають наявності високочутливих мікроскопів, барвників, маркерів і технологій, а також



висококваліфікованого персоналу. Тому, також для виявлення мікроорганізмів, що перебувають в ЖНС, широко використовують методи відновлення їх культурабельності, а для цього іноді достатньо прибрати чинники, які несприятливо впливають на них. Однак у більшості випадків необхідно застосовувати індуктори рекультивациі (фізичні, хімічні, біотичні).

Тому, з метою виявлення клітин *Escherichia coli* і *Candida albicans* в життєздатному некультурабельному стані нами розроблено та застосовано новий спосіб виявлення життєздатних некультурабельних мікроорганізмів у воді. На даний спосіб отримано патент України на винахід № 113472 [115].

### **3.3.1 Вибір поживних середовищ для рекультивациі життєздатних некультурабельних мікроорганізмів**

З метою рекультивациі мікроорганізмів, які перебувають в життєздатному некультурабельному стані, обрано і досліджено рідкі поживні середовища, такі як поживний бульйон (ПБ) (оптимальне середовище для культивациі *Escherichia coli*), бульйон Сабуро (БС) (оптимальне середовище для культивациі *Candida albicans*), а також поживне сольове середовище М-9 [116], яке використовують для культивациі багатьох мікроорганізмів. В роботі [117] поживне середовище М-9 використовували тільки для вирощування клітин *Escherichia coli*, для подальшої роботи з нею. А в роботі [118] М-9 використовували для рекультивациі культури *Salmonella enteritidis*, що перейшла в ЖНС після дії на неї  $H_2O_2$ .

В дослідженні [119] визначали вплив концентрацій глюкози, яка входить в склад середовища М-9, на здатність до культивациі *Salmonella enteritidis*. Було встановлено, що перевищення концентрації глюкози, у два рази (0,8%), в порівнянні з тим, скільки потребує культура (0,4%), призводить до зниження культурабельності останньої. Аналіз отриманого в результаті супернатанту культури показав, що вища в два рази доза глюкози викликає раптове зниження рН і накопичення великої кількості ацетату, форміату і пірувату, що обумовлено підвищеним метаболізмом клітин *Salmonella enteritidis*. Культура при цьому

переходить в життєздатний некультурабельний стан, а згодом починає відмирати. Таким чином, додавання в середовище М-9 вдвічі більше від нормованої кількості поживної глюкози спричиняє бактеристатичну дію на культуру *Salmonella enteritidis*, в результаті накопичення метаболітів.

Однак, введення середовища М-9 дозволяє розширити спектр хімічних речовин, які необхідні мікроорганізмам для нормальної життєдіяльності. До складу живильного середовища М-9 входять базові живильні компоненти, такі як хлорид амонію, який є джерелом азоту, фосфат натрію і фосфат калію – (буферні агенти), хлорид натрію, який забезпечує необхідні іони для підтримки життєздатності клітини; а також додаткові компоненти:  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$  і глюкоза, які життєво необхідні клітині для її нормального функціонування, оскільки є кофакторами багатьох ферментів.

### 3.3.2 Рекультивация клітин *Escherichia coli*, що перебувають в життєздатному некультурабельному стані

Проведено рекультивацию культури *Escherichia coli* після дії  $\text{NaOCl}$ , шляхом щоденного внесення робочої суспензії (р/с), що містить інактивовані клітини *Escherichia coli*, в середовище М-9 або ПБ з подальшим посівом на диференційно-діагностичне агарове середовище Ендо.

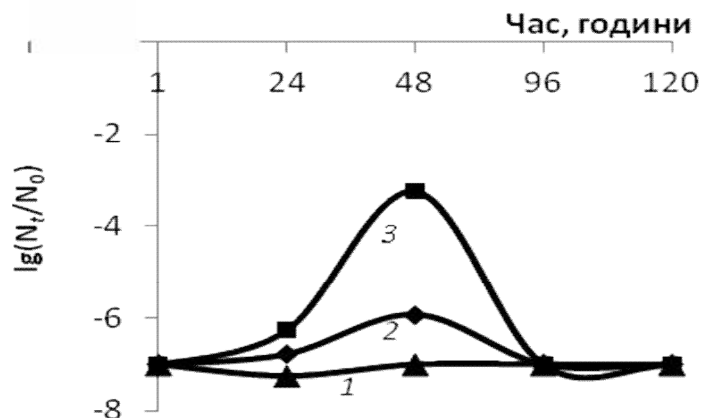


Рисунок 3.3 – Кінетика відновлення культури *Escherichia coli* після контакту з  $\text{NaOCl}$  концентрацією  $2 \text{ мг/дм}^3$ , 1 – р/с+ПБ; 2 – р/с; 3 – р/с+М-9

З результатів дослідження видно, що клітини в р/с після усунення дії стрес-фактора (після зв'язування хлору з концентрацією  $2 \text{ мг/дм}^3$  тіосульфатом натрію) і під впливом сприятливої температури  $t=37 \text{ }^\circ\text{C}$  починають поступово відновлюватися (до  $10 \text{ КУО/см}^3$ ) вже через добу (рис. 3.3., крива 2), що свідчить про перехід культури *Escherichia coli* під впливом NaOCl в життєздатний некультурабельний стан. Найвищий рівень рекультивації клітин, що перебували у ЖНС, спостерігається в середовищі М-9 та становить через 24 год майже один порядок від вихідного титру культури (рис. 3.3., крива 3). Пік відновлення культури в М-9 та р/с спостерігається через 48 годин. Встановлено, що в р/с відновлення культури сягає до одного порядку, а в М-9 – до чотирьох порядків. Кількість рекультивованих клітин в ПБ відсутня (рис. 3.3., крива 1). Очевидно, такий ефект може бути пов'язаний з присутністю інгібуючих вільних радикалів в рідкому збагаченому живильному середовищі, що утворилися в процесі його приготування. Відновлення та ріст культури *Escherichia coli* поступово знижується зі збільшенням часу термостатування її р/с. На 4 добу спостерігається значне зниження зростання культури. Такий ефект, очевидно, пов'язаний з недостатньою кількістю поживних речовин в робочій суспензії (дист. вода), з якого щодня проводили посіви в рідкі поживні середовища. Аналогічні залежності спостерігаються для NaOCl в концентрації  $3 \text{ мг/дм}^3$ .

Таким чином, при впливі NaOCl в концентраціях  $2-3 \text{ мг/дм}^3$  на культуру *Escherichia coli* утворюються клітини в ЖНС, які не визначаються загальноприйнятими методами, проте при встановленні сприятливих умов здатні повертатися в культурабельний стан.

Виявлено, що концентрація  $5 \text{ мг/дм}^3$  NaOCl повністю інактивує клітини *Escherichia coli* 1257, бо навіть після внесення в поживне середовище М-9 рекультивація культури була відсутня.

Встановлено, що в мінімальному живильному середовищі М-9 культура *Escherichia coli* 1257 відновлюється приблизно на три-чотири порядки більше ніж в р/с. Очевидно, що склад середовища М-9 сприяє більш швидкому відновленню і росту бактеріальних клітин *Escherichia coli*.

Таким чином, показано що *Escherichia coli* здатна переходити в ЖНС під дією стрес-фактора – NaOCl. Для виявлення *Escherichia coli* в ЖНС доцільно застосовувати живильне середовище М-9 перед посівом культури на стандартне агарове диференційно-діагностичне середовище Ендо. Отримані результати свідчать про необхідність внесення змін до методики визначення якості води, що надходить до споживача, а також розробки нових підходів до її знезараження.

### **3.3.3 Рекультивация клітин *Candida albicans*, що перебувають в життєздатному некультурабельному стані**

Встановлено, що клітини *Candida albicans*, інактивовані NaOCl в концентрації 4-6 мг/дм<sup>3</sup>, відновлюються в р/с вже через 48 годин (1-6 КУО/см<sup>3</sup>), а на п'яту добу в робочій суспензії спостерігається практично повне відновлення культури (1·10<sup>5</sup> КУО/см<sup>3</sup>) (рис. 3.4., крива 1). Однак, факт реактивації культури може бути не враховано при оцінці якості знезараження води, оскільки використання класичного підходу до визначення не дає можливості виявити мікроорганізми в некультурабельном стані в процесі аналізу. Тому з метою прискорення рекультивации культури, що перебуває в ЖНС, рекомендується використовувати рідкі поживні середовища. В даному дослідженні, з метою визначення оптимального середовища для найбільш повної та швидкої рекультивации культури, р/с, що містить інактивовані клітини *Candida albicans*, вносили в класичний поживний бульйон Сабуро, що використовується для культивування *Candida albicans*, а також в сольове живильне середовище М-9.

Показано, що кількість відновлених клітин культури в р/с і БС на першу добу відсутня, тоді як кількість відновлених клітин *Candida albicans* в живильному середовищі М-9 досягала десятків КУО/см<sup>3</sup> (рис. 3.4., крива 3). Оскільки в живильне середовище М-9 вносили р/с з інактивованими мікроорганізмами (за стандартним методом визначення), то прояв росту культури *Candida albicans* після культивации в середовищі М-9 через 24 год свідчить про активне відновлення культури, яка перебуває в некультурабельному стані. Однак,

вже на другу добу в самому р/с кількість рекультивованих клітин зростає ( $1-10$  КУО/см<sup>3</sup>), і при його внесенні в рідкі середовища (М-9 або БС), що містять поживні речовини, очевидно, спостерігається як відновлення так і розмноження відновленої в р/с культури *Candida albicans* ( $2,3 \cdot 10^2$  або  $1,9 \cdot 10^2$  КУО/см<sup>3</sup>, відповідно) (рис. 3.4., крива 2 і 3).

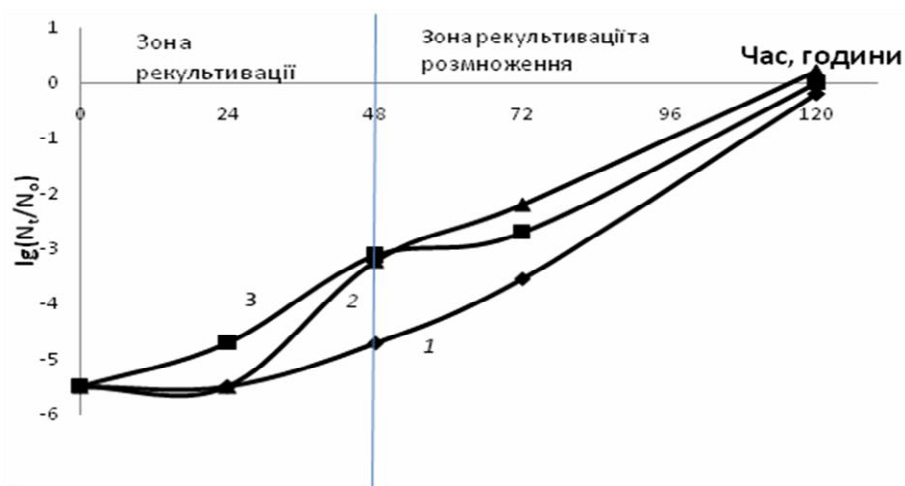


Рисунок 3.4 – Кінетика відновлення і зростання культури *Candida albicans*:  
1 – р/с, 2 – р/с+БС, 3 – р/с+М-9

Встановлено, що ступінь відновлення культури також залежить від її початкового навантаження. Однак, відновлення *Candida albicans* в живильному середовищі М-9 спостерігається у всіх випадках (рис. 3.5).

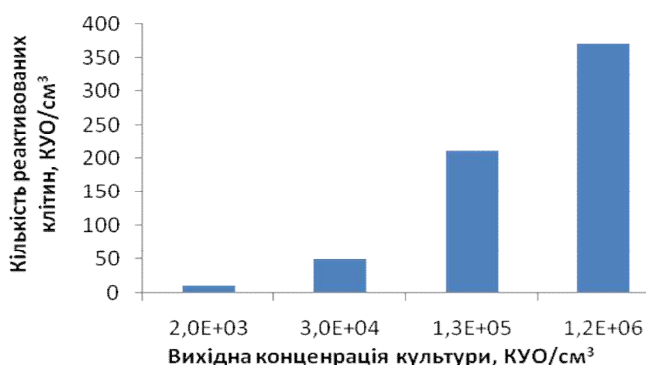


Рисунок 3.5 – Кількість рекультивованих клітин (КУО/см<sup>3</sup>) *Candida albicans* в залежності від вихідної її концентрації в живильному середовищі М-9. Температура 27 °С, за період 48 год

Показано, що через 48 год ступінь відновлення інактивованої NaOCl (6 мг/дм<sup>2</sup>) культури *Candida albicans*, при вихідній її кількості  $1 \cdot 10^5$  і

$1 \cdot 10^6$  КУО/см<sup>3</sup>, становить два порядки ( $2,2 \cdot 10^2$  і  $3,7 \cdot 10^2$  КУО/см<sup>3</sup>), тоді як при низькій їх концентрації –  $1 \cdot 10^3$  і  $1 \cdot 10^4$  КУО/см<sup>3</sup> – один порядок ( $2 \cdot 10$  і  $5 \cdot 10$  КУО/см<sup>3</sup>).

Таким чином, показано, що використання живильного середовища М-9 сприяє прискоренню рекультивації культури *Candida albicans* та при цьому підвищує інформативність мікробіологічних досліджень.

### **3.4 Вплив іонів $\text{Ca}^{2+}$ та $\text{Mg}^{2+}$ на рекультивацію некультурабельних клітин *Candida albicans***

У зв'язку зі здатністю середовища М-9 повертати життєздатні некультурабельні культури *Escherichia coli* та *Candida albicans* в культурабельний стан доцільно оцінити вплив компонентів середовища М-9 на рекультивацію некультурабельних клітин, на прикладі *Candida albicans*. До складу живильного середовища М-9 входять базові живильні компоненти, такі як хлорид амонію, фосфат натрію, фосфат калію і хлорид натрію, а також додаткові компоненти  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$  і глюкоза, які життєво необхідні клітині для її нормального функціонування, оскільки є кофакторами багатьох ферментів. Крім того, відомо, що кальцій знижує мембранну проникність клітини щодо шкідливих речовин, а клітина, ослаблена дією стрес-фактора, намагається максимально швидко відновитися. У середині клітини кальцій є універсальним вторинним месенджером і бере участь в ряді важливих метаболічних процесів, у тому числі і синтезі АТФ, в активації протеїнкінази С, фосфоліпаз А<sub>2</sub> і С. Магній, перебуваючи у складі живих клітин, впливає на їх ріст, розвиток і життєдіяльність [33].

Дослідження впливу цих компонентів на рекультивацію *Candida albicans* показало, що сольове середовище М-9, що містить тільки базові компоненти, не сприяє переходу клітин, що перебувають у некультурабельному стані, в нормальне культурабельне. Роздільне внесення в середовище М-9 додаткових компонентів, таких як  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  і глюкози сприяє відновленню культури. Показано, що йони  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Mg}^{2+}$  сприяють найвищому ступеню реактивації клітин.

Однак, найбільш активне відновлення культури відбувається при наявності всіх додаткових компонентів у середовищі М-9 (табл. 3.1).

Таблиця 3.1 – Вплив іонів  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  та глюкози на рекультивацію культури *Candida albicans* в робочій суспензії через 48 год після контакту з  $\text{NaOCl}$

Робоча суспензія	КУО/см <sup>3</sup>
вихідна нагрузка <i>Candida albicans</i>	$1,3 \cdot 10^5$
після дії $\text{NaOCl}$	0
М-9 (без $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ і глюкози)	0
М-9 (з $\text{Ca}^{2+}$ 0,00002 М)	$6,4 \cdot 10$
М-9 (з $\text{Mg}^{2+}$ 0,0002 М)	$1,1 \cdot 10^2$
М-9 (з глюкозою)	9
М-9 (з $\text{Ca}^{2+}$ 0,00002 М, $\text{Mg}^{2+}$ 0,0002 М і глюкозою)	$1,8 \cdot 10^2$

Оскільки йони  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Mg}^{2+}$  в найбільшій мірі сприяють відновленню культури, нами проведено цикл досліджень по встановленню оптимальних концентрацій цих іонів у складі середовища М-9 для рекультивації клітин *Candida albicans*, що перебувають в життєздатному некультурабельному стані (табл. 3.2).

Таблиця 3.2 – Вплив концентрацій іонів  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{Mg}^{2+}$  в складі середовища М-9 на рекультивацію інактивованих  $\text{NaOCl}$  клітин *Candida albicans* в робочій суспензії

Йони	Концентрації, М	Час	
		культивування, год	
		24	48
КУО/см <sup>3</sup>			
$\text{Ca}^{2+}$	0,000002	2	$1,3 \cdot 10$
	<b>0,00002</b>	<b>0</b>	$2 \cdot 10$
	0,00046	0	9
	0,0002	0	0
	0,0025	0	0
$\text{Mg}^{2+}$	0,00002	5	$1,3 \cdot 10$
	0,00005	0	$1,4 \cdot 10$
	<b>0,0002</b>	<b>5</b>	$1,1 \cdot 10^2$
	0,0005	3	$6 \cdot 10$
	0,002	0	3

Вибір оптимальних концентрацій йонів  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Mg}^{2+}$  проводили, досліджуючи широкий діапазон цих макроелементів, у тому числі досліджуючи концентрації, які зустрічаються у водопровідній воді, що надходить до споживача, згідно ДСТУ 7525:2014 «Вода питна» (оптимальний вміст  $\text{Ca}^{2+}$  в діапазоні 0,0006-0,002 М,  $\text{Mg}^{2+}$  – 0,0004-0,002 М).

Показано, що рекультивація культури спостерігається в присутності йонів  $\text{Ca}^{2+}$  в діапазоні концентрацій 0,000002-0,00046 М і йонів  $\text{Mg}^{2+}$  – 0,00002-0,002 М. Однак, найвищий ступінь реактивації культури спостерігається при концентраціях  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Mg}^{2+}$ , відповідно, 0,00002 М і 0,0002 М. Подальше підвищення або зниження концентрації сприяє зменшенню кількості рекультивованих клітин. Відомо, що стимулюючий ефект кальцію спостерігається до певних концентрацій. Це пов'язано з тим, що для нормального функціонування клітині необхідна низька концентрація йонів кальцію, тоді як накопичення його в цитоплазмі призводить до її загибелі [120]. Таким чином, визначено оптимальні концентрації компонентів середовища М-9, які найкраще впливають на процес рекультивації клітин *Candida albicans*, що перебувають в некультурабельном стані.

### **3.5 Вплив температури на відновлення клітин, що перебувають у життєздатному некультурабельному стані**

Температура – це важливий фізичний фактор, який сприяє як переходу клітин мікроорганізмів у життєздатний некультурабельний стан, так і їх відновленню до нормального культурабельного стану. Тому проведено оцінку впливу температури на відновлення і ріст клітин мікроорганізмів, що перебувають у життєздатному некультурабельному стані.

Отримані результати показали, що при температурі 37 °С культура *Escherichia coli* 1257 з вихідною кількістю  $1 \cdot 10^6$  відновлюється, тоді як при 27 і 9 °С відновлення не спостерігається (табл. 3.3). Очевидно, це пов'язано з тим, що температура 37 °С є оптимальною для росту і розвитку культурабельних клітин *Escherichia coli* 1257.



Таблиця 3.3 – Вплив температури на кінетику рекультивації та росту культури *Escherichia coli* (КУО/см<sup>3</sup>) після контакту з NaOCl

Проби	Температура, °C								
	37			27			9		
	24ч	48ч	72ч	24ч	48ч	72ч	24ч	48ч	72ч
p/c	12	248	10	0	0	0	0	0	0
p/c + М-9	30	3205	210	0	0	0	0	0	0
p/c + ПБ	2	9	0	0	0	0	0	0	0

Встановлено, що максимальний ступінь рекультивації *Candida albicans* спостерігається при 37 і 27 °C, тоді як знижена температура (9 °C) не призводить до помітного відновлення культури (табл. 3.4).

Таблиця 3.4 – Вплив температури на кінетику рекультивації та росту культури *Candida albicans* (КУО/см<sup>3</sup>) після контакту з NaOCl

Проба	Температура, °C					
	37		27		9	
	24ч	48ч	24ч	48ч	24ч	48ч
p/c	0	5	0	6	0	0
p/c + М-9	2	180	8	230	0	3
p/c + БС	0	110	0	190	0	0

Таким чином, для досягнення оптимальних умов рекультивації культур *Escherichia coli* та *Candida albicans* проби води із середовищем М-9 слід термостатувати при температурі 37 °C для *Escherichia coli*, та при 27 або 37 °C для *Candida albicans*.

Одержані при дослідженні впливу температури на рекультивацію *Escherichia coli* та *Candida albicans* результати підтверджують наведені у розділах 3.3.2 та 3.3.3 результати, які свідчать про найвищу ефективність середовища М-9 в порівнянні з іншими дослідженими середовищами в процесі переходу вказаних культур із ЖНС в культурабельний стан.

### 3.6 Мікроскопічні дослідження клітин *Candida albicans* після дії гіпохлориту натрію

Оскільки клітини у життєздатному некультурабельному стані не ростуть на загальноприйнятих середовищах, а для їх виявлення необхідно використовувати середовище М-9, що робить мікологічне визначення життєздатного некультурабельного стану досить тривалою процедурою, то доцільно визначити можливість використання прямої мікроскопії для їх виявлення.

У зв'язку з тим, що клітини бактеріальної культури *Escherichia coli* досить дрібні (0,5 мкм) їх важко визначати під світловим мікроскопом зі збільшенням ок 10 x об 40, тому мікроскопічні дослідження проводили лише на клітинах дріжджоподібного гриба *Candida albicans*, розміри котрих досягають 10 мкм.

Нами проведено попередні досліди з фарбування живих і мертвих (термічна обробка) клітин з використанням барвника трипанового синього (0,5%). Показано, що загиблі клітини в зв'язку з порушенням їх мембранної цілісності фарбувалися в темно-синій колір (трипанопозитивні), а клітини, які зберегли цілісність оболонки (живі), не пропускали барвник і залишалися прозорими (трипанонегативні) (рис. 3.6., а і б). Встановлено, що додаткове внесення в робочу суспензію диметилсульфоксиду (ДМСО) дозволяє ефективно розрізняти живі і мертві клітини культури.

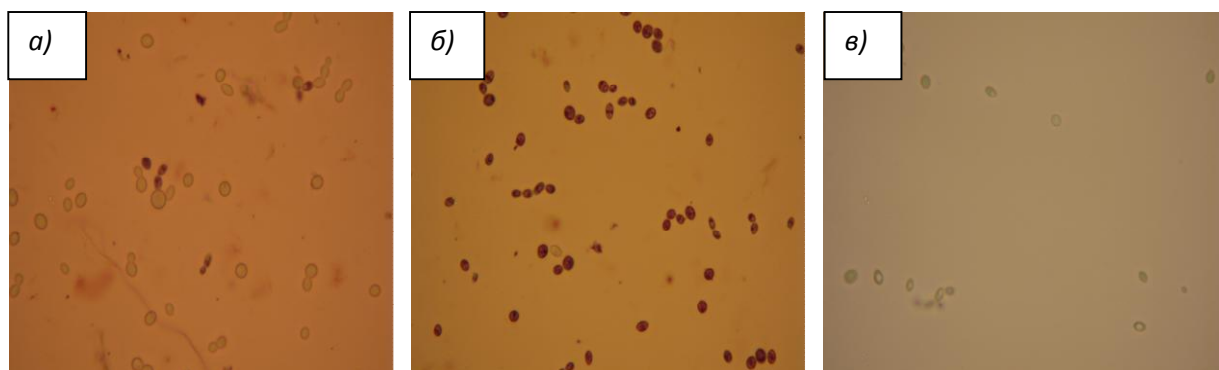


Рисунок 3.6 – Клітини *Candida albicans*, пофарбовані трипановим синім: а) живі; б) мертві (термічна обробка); в) життєздатні некультурабельні клітини, що утворилися після дії гіпохлориту

Прямою мікроскопією підтверджено наявність клітин *Candida albicans* в життєздатному некультурабельном стані після впливу на них бактерицидних концентрацій ( $5 \text{ мг/дм}^3$ ) NaOCl. Ці клітини залишалися незабарвленими барвником трипановим синім, що свідчить про їх життєздатність, а також зменшувалися у розмірі та мали візуально більш тонкі оболонки (рис. 3.6., в). Однак, виявилось, що при посіві такої культури на класичне агарове диференційно-діагностичне середовище Сабуро її ріст відсутній. Попереднє внесення культури в рідке поживне сольове середовище М-9, перед висівом у класичне агарове диференційно-діагностичне середовище, сприяє відновленню та росту культури дріжджоподібних грибів вже на наступну добу.

### 3.7 Генетична стійкість мікроорганізмів

Відомо, що первинна взаємодія культури зі стрес фактором впливає на збільшення стійкості клітини при подальшому їх контакті за рахунок перетворень, що відбуваються в білкових структурах клітини [33].

Оскільки культура *Escherichia coli*, виділена з водорозподільчих мереж, не один раз піддається дії активного хлору, то доцільно перевірити наявність збільшення її стійкості до дії NaOCl. З цією метою проведено експерименти по інактивації клітин *Escherichia coli*, що раніше перебували в життєздатному некультурабельному стані. Для цього культуру піддавали дії NaOCl в концентраціях 2 і  $3 \text{ мг/дм}^3$  і порівнювали отриманий ступінь інактивації *Escherichia coli* в ЖНС з дочірніми клітинами. Показано, що клітини не стали більш стійкими до даного стрес-фактору, ніж вихідні культурабельні клітини *Escherichia coli*. Так, при концентрації гіпохлориту натрію  $2 \text{ мг/дм}^3$  ступінь знезараження вихідної культури *Escherichia coli* дорівнює 99,99%, тоді як для *Escherichia coli*, що раніше піддавалася дії активного хлору і перебувала в ЖНС, він становить 99,98% за 60 хв контакту. Таким чином, нами не виявлено значного збільшення резистентності культури, яка перейшла в ЖНС, що може бути непрямим доказом відсутності генетичних змін в клітині.

При оцінці впливу NaOCl на клітини *Candida albicans* у вихідній формі, а також в життєздатному некультурабельному стані було виявлено незначне збільшення стійкості останніх. Таким чином, отримані результати вимагають проведення подальших більш детальних досліджень.

### ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3

Показано, що застосування класичних мікробіологічних методів оцінки якості знезараження води не дозволяє отримати достовірні результати, оскільки не виявляє мікроорганізми, які перебували в життєздатному некультурабельному стані. При попаданні в сприятливі умови ці мікроорганізми знову переходять в нормальний культурабельний стан і відновлюють свої патогенні властивості, тим самим викликають захворювання у споживачів такої води.

Розроблено метод виявлення у питній воді мікроорганізмів, що перебувають у життєздатному некультурабельному стані. Метод базується на рекультивації клітин, що перебувають в життєздатному некультурабельному стані, у рідкому поживному сольовому середовищі М-9, з подальшою їх культивацією на традиційному агаровому диференційно-діагностичному поживному середовищі.

Встановлено оптимальні концентрації компонентів середовища і параметри культивування, що сприяють збільшенню ступеня відновлення культури, яка перебуває в ЖНС. Показано, що йони  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Mg}^{2+}$  сприяють найвищому ступеню реактивації клітин. Однак, найбільш активне відновлення культури відбувається при наявності всіх додаткових компонентів у середовищі М-9. Найвищий ступінь реактивації культури спостерігається при концентраціях  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Mg}^{2+}$ , відповідно, 0,00002 М і 0,0002 М. Оптимальна температура відновлення культур *Escherichia coli* – 37 °С, час термостатування – 24 години, а *Candida albicans* – 27 і 37 °С, час термостатування – 48 і 24 годин, відповідно.

На основі отриманих результатів було отримано патент на винахід № 113472. Даний спосіб покладено в основу створення державного нормативного

документу (ДСТУ) щодо виявлення життєздатних некультивурабельних мікроорганізмів у воді.

Таким чином, на підставі проведених досліджень показана необхідність зміни методик мікробіологічного аналізу оцінки якості води у зв'язку з виявленням нових форм існування мікроорганізмів, а також розробки нових ефективних підходів до знезараження води.

## РОЗДІЛ 4

### АНАЛІЗ ПИТНОЇ ВОДИ МІСТА КИЄВА

#### 4.1 Систематичний аналіз водопровідної води м. Києва

Контроль якості води є актуальним завданням. Тільки за даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) щорічно у світі через низьку якість води вмирає близько 5 млн. чоловік. Інфекційна захворюваність населення, пов'язана з водопостачанням, сягає 500 млн. випадків на рік. Це дає підставу назвати проблему водопостачання доброякісної води в достатній кількості однією з головних проблем людства. Більше того, в світовій практиці доступність і якість питної води є однією з головних складових в оцінці екологічного благополуччя будь-якого регіону [121].

Проблеми, пов'язані з якістю питної води, також хвилюють мільйони людей і в Україні, незалежно від регіонів, в яких вони проживають.

Водоканал є однією з найстаріших комунальних споруд міста, що не дивно, адже централізований водопровід починали закладати ще в кінці XIX - початку XX століть. Велика протяжність водопровідної мережі одночасно є і перевагою, і недоліком. З одного боку, чим довша водопровідна мережа, тим більше будинків і підприємств можуть отримувати очищену воду, з іншого боку – тим складніше забезпечувати її бактеріологічну безпеку. Варто зазначити, що обладнання, яке використовується для очищення води у більшості випадків знаходиться в стані крайньої зношеності і вимагає невідкладної реконструкції [122].

Тому, з метою контролю якості води на станціях водопідготовки систематично проводять мікробіологічний аналіз питної води класичними методами. При цьому визначають: бактерії групи кишкових паличок, присутність яких свідчить про забруднення води виділеннями з кишечника теплокровних; термотолерантні кишкові бактерії, які є специфічним індикатором свіжого фекального забруднення; загальну кількість мікроорганізмів при температурі інкубації ( $22 \pm 1$ ) °C на 5 добу та ( $36 \pm 1$ ) °C через одну добу. Зростання числа

колоній при  $(22 \pm 1) ^\circ\text{C}$  свідчить про погіршення санітарно-гігієнічного стану системи водопідготовки або водопостачання, або ж про появу джерела забруднення, або виникнення умов для вторинного розмноження мікроорганізмів. Наявність колоній при  $36 \pm 1 ^\circ\text{C}$  свідчить про можливе забруднення води антропогенною мікробіотою.

Крім того, останнім часом, крім мікробіологічного аналізу питної води, актуальним є також її мікологічний аналіз, що дозволяє встановити наявність у питній воді мікроскопічних грибів – мікроміцетів [123].

Відомо, що мікроміцети широко розповсюджені в оточуючому середовищі, а також наявні у поверхневих джерелах водопостачання та водопровідній воді України [72]. Вони здатні погіршувати органолептичні показники води, а також виділяти у водне середовище речовини, небезпечні для здоров'я людини – мікотоксини, що володіють мутагенною, тератогенною, ембріонотоксичною, алергенною, імунносупресивною дією [124].

Як було показано в попередніх розділах ряд мікроорганізмів, у тому числі мікроміцети, під дією стрес-фактору, а саме голодування, окиснення, зміни температури тощо, здатні переходити у життєздатний некультурабельний стан. Такі клітини не культивуються на класичних диференційно-діагностичних агарових середовищах, що несе небезпеку недооцінити кількість життєздатних патогенних мікроорганізмів і отримати помилково негативні результати при аналізі питної води на станціях водопідготовки.

Нами було розроблено та запропоновано метод з виявлення мікроорганізмів у життєздатному некультурабельному стані. Запропонований метод (ЗМ) базується на введенні додаткового етапу рекультивування, що включає внесення аліквоти аналізованої проби води у середовище М-9 та утримування в термостаті протягом доби перед висівом на диференційно-діагностичне агарове середовище.

З метою виявлення достовірної кількості мікроорганізмів, що містяться у водопровідній воді, нами проведено порівняння класичних методів (КМ)

виявлення мікроорганізмів із запропонованим нами методом (ЗМ) виявлення мікроорганізмів у життєздатному некультурабельному стані.

Проведено систематичний мікробіологічний та мікологічний аналіз водопровідної води, відібраної з різних адміністративних районів м. Києва у різні періоди року. Воду відбирали з водопровідної мережі в Святошинському, Солом'янському і Дарницькому районах м. Києва. Термін експлуатації труб становив 25-40 років (багатопверховий житловий будинок на вул. Підлісна, 6 і Інститут КХХВ на бульв. Вернадського, 42), 35-45 років (житловий будинок на вул. Героїв Севастополя, 13 і гуртожиток на вул. Е. Потьє, 9) та 55-65 років (приватний будинок на вул. Волго-Донська, 62).

Таблиця 4.1 – Результати систематичного мікологічного аналізу **водопровідної води** у місті Києві у **зимовий** період року

Райони м. Києва	Місця забору зразків води	Метод аналізу	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium spp<sup>1</sup></i>	<i>Penicillium spp<sup>2</sup></i>	<i>Mycelia sterilia</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Candida albicans</i>	Бактерії
			КУО/100 см <sup>3</sup>							
Солом'янський район	вул. Героїв Севастополя, 13	КМ	–	–	–	–	3	–	10	+
		ЗМ	–	3·10 <sup>2</sup>	–	1·10 <sup>2</sup>	–	1·10 <sup>2</sup>	5·10 <sup>2</sup>	+
	вул. Е.Потьє, 9	КМ	–	1	5	–	–	–	–	–
		ЗМ	1·10 <sup>2</sup>	3·10 <sup>2</sup>	1·10 <sup>2</sup>	–	–	–	1·10 <sup>2</sup>	+
Дарницький район	вул. Волго-Донська, 62	КМ	–	–	–	–	–	–	13	+
		ЗМ	–	1·10 <sup>2</sup>	–	2·10 <sup>2</sup>	–	–	–	+
Святошинський район	вул. Підлісна, 6	КМ	–	–	–	–	–	–	1	+
		ЗМ	–	–	–	1·10 <sup>2</sup>	1,2·10 <sup>3</sup>	–	1·10 <sup>2</sup>	–
	бульв. Вернадського, 42	КМ	–	33	–	–	–	–	–	–
		ЗМ	1·10 <sup>2</sup>	–	–	–	–	–	–	+

У таблиці 4.1. представлено результати аналізу зразків водопровідної води у зимній період року, які було проаналізовано за допомогою класичного методу та запропонованого методів. Отримані класичним методом дані свідчать про наявність в зразках водопровідної води лише одного виду міцеліальних грибів – *Penicillium* у кількості від 1 до 33 КУО/100 см<sup>3</sup>, а також дріжджоподібних видів грибів, таких як *Rhodotorula* та *Candida*, кількісний показник яких становить



3 КУО/100 см<sup>3</sup> та 1-13 КУО/100 см<sup>3</sup>, відповідно. Таким чином, середній показник мікроміцетів у зразках води, досліджених класичним методом в зимовий період, складає 13 КУО/100 см<sup>3</sup>.

З даних, які отримано при використанні запропонованого методу, видно, що у зразках води, які аналізували, насправді міститься більше різноманіття мікроміцетів у більшій кількості, які не виявлено за допомогою класичного методу аналізу. Крім раніше виявленого виду *Penicillium*, були також виявлені інші міцеліальні гриби, такі як *Aspergillus*, *Mycelia* і *Alternaria*, кількісний показник яких становить  $1 \cdot 10^2$ - $4 \cdot 10^2$  КУО/100 см<sup>3</sup>. Кількість дріжджоподібних грибів становить для *Rhodotorula* –  $1,2 \cdot 10^3$  КУО/100 см<sup>3</sup>, для *Candida* –  $1 \cdot 10^2$ - $5 \cdot 10^2$  КУО/100 см<sup>3</sup>). Середній показник мікроміцетів у зразках води, досліджених запропонованим методом в зимовий період, складає  $6,8 \cdot 10^2$  КУО/100 см<sup>3</sup>.

При великій кількості різних видів мікроорганізмів, деякі можуть пригнічувати ріст інших.

За результатами аналізу видно, що найбільша контамінація мікроміцетами водопровідної води у зимовий період спостерігається у Святошинському районі за адресою вул. Підлісна, 6, де найбільше було виявлено дріжджоподібних видів грибів (*Rhodotorula* –  $1,2 \cdot 10^3$  КУО/100 см<sup>3</sup> та *Candida* –  $1 \cdot 10^2$  КУО/100 см<sup>3</sup>). Найбільшу кількість міцеліальних грибів було виявлено у Солом'янському районі за адресою вул. Героїв Севастополя, 13 ( $5 \cdot 10^2$  КУО/100 см<sup>3</sup>) та вул. Є. Потьє, 9 ( $5 \cdot 10^2$  КУО/100 см<sup>3</sup>).

Аналогічні дослідження водопровідної води проведено у весняний період (табл. 4.2). За класичним методом було виявлено міцеліальні види грибів – *Aspergillus*, *Penicillium* і *Mycelia* в кількості від 1 до 3 КУО/100 см<sup>3</sup>, та дріжджоподібні – *Candida* в кількості від 7 до 23 КУО/100 см<sup>3</sup>, тоді як за запропонованим методом виявлено міцеліальні види грибів – *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mycelia* і *Fusarium*, кількісний показник яких коливається від 1 до  $3 \cdot 10^2$  КУО/100 см<sup>3</sup>, та дріжджоподібні – *Candida* в кількості від  $1 \cdot 10^2$  до  $1 \cdot 10^3$  КУО/100 см<sup>3</sup>. Таким чином, середній показник мікроміцетів у зразках води,

досліджених класичним методом, у весняний період складає  $8 \text{ КУО}/100 \text{ см}^3$ , а за запропонованим методом –  $4,8 \cdot 10^2 \text{ КУО}/100 \text{ см}^3$ .

Таблиця 4.2 – Результати систематичного мікологічного аналізу **водопровідної води** у місті Києві у **весняний** період року

Райони м. Києва	Місця забору зразків води	Метод аналізу	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium implicatum</i>	<i>Penicillium ssp</i>	<i>Mycelia sterilia</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Cladosporium ssp</i>	<i>Fusarium solani</i>	Бактерії
			КУО/100 см <sup>3</sup>							
Солом'янський район	вул. Героїв Севастополя, 13	КМ	1	–	–	–	–	–	–	+
		ЗМ	$1 \cdot 10^2$	$3 \cdot 10^2$	–	$1 \cdot 10^2$	–	–	–	+
	вул. Е.Потьє, 9	КМ	–	–	3	–	7	–	–	+
		ЗМ	–	–	–	–	–	–	–	+
Дарницький район	вул. Волго-Донська, 62	КМ	–	–	–	–	–	–	–	+
		ЗМ	–	$3 \cdot 10^2$	–	$1 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^2$	–	$1 \cdot 10^2$	+
Святошинський район	вул. Підлісна, 6	КМ	–	–	–	–	4	–	–	–
		ЗМ	–	–	–	–	$1 \cdot 10^3$	–	–	–
	бульв. Вернадського, 42	КМ	1	–	–	1	23	1	–	–
		ЗМ	$1 \cdot 10^2$	–	–	–	$1 \cdot 10^2$	–	–	+

Отже, за результатами аналізу видно, що найбільша контамінація мікроміцетами водопровідної води у весняний період спостерігається знову у Святошинському районі за адресою вул. Підлісна, 6, де найбільше було виявлено дріжджоподібних видів грибів (*Candida* –  $1 \cdot 10^3 \text{ КУО}/100 \text{ см}^3$ ). Зразки водопровідної води, які містять найбільше міцеліальних видів грибів (по  $5 \cdot 10^2 \text{ КУО}/100 \text{ см}^3$ ), відібрано в Солом'янському районі, вул. Героїв Севастополя, 13 та в Дарницькому районі, вул. Волго-Донська, 62.

Варто звернути увагу, що зразок водопровідної води, відібраний в Солом'янському районі, за адресою вул. Е. Потьє, 9, при аналізі за класичним методом містив мікроміцети (*Penicillium* та *Candida*), а при запропонованому – ріст мікроскопічних грибів взагалі був відсутній (табл. 4.2). Таку залежність можна пояснити великою кількістю реактивованих бактерій (суцільний ріст на фільтрі), що подавили ріст інших мікроорганізмів. У таких випадках до

диференційно-діагностичних агарових середовищ слід вносити антибіотики бактеріостатичної чи бактерицидної дії. Це дає можливість попередити їх вплив на виявлення та кількісний підрахунок мікроскопічних грибів [125].

За результатами досліджень зразків водопровідної води у літній період року (табл. 4.3) одразу можна помітити, що кількість дріжджоподібних грибів значно переважає кількість міцеліальних, при класичному (*Rhodotorula* – 2 КУО/100 см<sup>3</sup>, *Candida* – 24-45 КУО/100 см<sup>3</sup> і *Aspergillus*, *Rhizopus* – 1 КУО/100 см<sup>3</sup>) та запропонованому (*Candida* – 5·10<sup>2</sup>-3·10<sup>3</sup> КУО/100 см<sup>3</sup> і *Penicillium*, *Mycelia*, *Rhizopus*, *Cladosporium* – 1·10<sup>2</sup>-2·10<sup>2</sup> КУО/100 см<sup>3</sup>) методах виявлення. Встановлено, що кількісний і видовий показники міцеліальних видів грибів у весняно-літній та осінньо-зимовий періоди відрізняються незначно, тоді як кількість дріжджоподібних видів зростає при підвищенні температури. Середній показник мікроміцетів у зразках води, досліджених класичним методом, в літній період складає 15 КУО/100 см<sup>3</sup>, а за запропонованим методом – 1·10<sup>3</sup> КУО/100 см<sup>3</sup>.

Таблиця 4.3 – Результати систематичного мікологічного аналізу **водопровідної води** у місті Києві в літній період року

Райони м. Києва	Місця забору зразків води	Метод о аналізу	<i>Aspergillus spp</i>	<i>Penicillium spp<sup>1</sup></i>	<i>Mycelia sterilia</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Candida albicans</i>	Бактерії
			КУО/100 см <sup>3</sup>							
Солом'янський район	вул. Героїв Севастополя, 13	КМ	1	–	–	–	–	–	–	+
		ЗМ	–	–	–	–	–	–	3·10 <sup>3</sup>	+
	вул. Е.Потьє, 9	КМ	–	–	–	–	1	–	24	+
		ЗМ	–	–	–	–	–	–	1,3·10 <sup>3</sup>	–
Дарницький район	вул. Волго-Донська, 62	КМ	–	–	–	–	–	–	–	+
		ЗМ	–	–	–	–	–	–	–	+
Святошинський район	вул. Підлісна, 6	КМ	–	–	–	2	–	–	45	–
		ЗМ	–	–	2·10 <sup>2</sup>	–	–	1·10 <sup>2</sup>	5·10 <sup>2</sup>	–
	бульв. Вернадського, 42	КМ	–	–	–	–	–	–	–	–
		ЗМ	–	1·10 <sup>2</sup>	–	–	1·10 <sup>2</sup>	–	–	–

Найбільш контамінованими зразками водопровідної води дріжджоподібними грибами у літній період виявилися ті, що були відібрані у Солом'янському районі за обома адресами. Кількість виявлених грибів *Candida albicans* становила від  $1,3 \cdot 10^3$  до  $3 \cdot 10^3$  КУО/100 см<sup>3</sup>. Високий вміст *Candida albicans* відмічено також в зразках водопровідної води, відібраних на вул. Підлісна, –  $5 \cdot 10^2$  КУО/100 см<sup>3</sup> (Святошинський район).

Досліджено зразки водопровідної води, відібраної в осінній період року (табл. 4.4).

Таблиця 4.4 – Результати систематичного мікологічного аналізу **водопровідної води** у місті Києві в **осінній** період року

Райони м. Києва	Місця забору зразків води	Метод аналізу	<i>Aspergillus spp</i>	<i>Penicillium spp</i> <sup>1</sup>	<i>Mycelia sterilia</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>	<i>Candida albicans</i>	Бактерії
			КУО/100 см <sup>3</sup>						
Солом'янський район	вул. Героїв Севастополя, 13	КМ	–	–	–	2	1	–	–
		ЗМ	–	$1 \cdot 10^2$	–	–	–	–	–
	вул. Е.Потьє, 9	КМ	–	–	1	–	–	10	–
		ЗМ	–	$1 \cdot 10^2$	–	$1 \cdot 10^2$	–	$1 \cdot 10^2$	–
Дарницький район	вул. Волго-Донська, 62	КМ	–	–	–	–	–	2	–
		ЗМ	–	–	$1 \cdot 10^2$	–	–	$1 \cdot 10^2$	–
Святошинський район	вул. Підлісна, 6	КМ	–	–	3	–	–	40	–
		ЗМ	$3 \cdot 10^2$	–	–	–	–	$2 \cdot 10^2$	–
	бульв. Вернадського, 42	КМ	–	–	–	–	–	25	+
		ЗМ	–	–	$3 \cdot 10^2$	–	$1 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^2$	–

Класичним методом встановлено наявність мікроміцетів родів *Mycelia* і *Rhizopus*, в кількості 1-3 КУО/100 см<sup>3</sup>, дріжджоподібні гриби представлено, в основному, видом *Candida* 2-40 КУО/100 см<sup>3</sup> і *Rhodotorula* – 2 КУО/100 см<sup>3</sup>. Кількість і видовий склад мікроскопічних грибів зростає при використанні аналізу води за запропонованим методом. Так, виявлено види міцеліальних грибів, такі як *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mycelia* і *Rhizopus*, кількісне значення яких коливається в

межах  $1 \cdot 10^2$ - $3 \cdot 10^2$  КУО/100 см<sup>3</sup>. А також, в порівнянні з літнім періодом року, виявлено меншу кількість (на один порядок) дріжджоподібних грибів –  $1 \cdot 10^2$ - $5 \cdot 10^2$  КУО/100 см<sup>3</sup>, що пов'язано зі зниженням температури навколишнього середовища. Середній показник мікроміцетів у зразках води, досліджених класичним методом, в осінній період складає 17 КУО/100 см<sup>3</sup>, а за запропонованим методом –  $4 \cdot 10^2$  КУО/100 см<sup>3</sup>.

Зразки води з місць відбору у Святошинському районі в осінній період року, виявилися найбільш контаміновані мікроскопічними грибами порівняно з іншими районами. Загальна кількість міцеліальних та дріжджоподібних грибів у зразку відібраному в багатоповерховому жилому будинку на вул. Підлісна, 6, складає  $3 \cdot 10^2$  КУО/100 см<sup>3</sup> та  $2 \cdot 10^2$  КУО/100 см<sup>3</sup>, відповідно, а у зразку, що був відібраний в Інституті КХХВ на бульв. Вернадського, 42, складає  $4 \cdot 10^2$  КУО/100 см<sup>3</sup> та  $5 \cdot 10^2$  КУО/100 см<sup>3</sup>, відповідно.

Встановлено, що у всіх пробах води, незалежно від терміну експлуатації трубопроводів, а також від місця відбору та пори року, середня кількість мікроміцетів становить 3-25 КУО/100 см<sup>3</sup> (визначені класичним методом) (табл. 4.5) та  $3 \cdot 10^2$ - $1,2 \cdot 10^3$  КУО/100 см<sup>3</sup> (визначені запропонованим методом) (табл. 4.6).

Таблиця 4.5 – Загальна кількість мікроміцетів у **водопровідній воді** міста Києва, визначена **класичним методом**

Місце відбору зразка води (2016 рік)	<i>Aspergillus</i> <i>spp.</i>	<i>Penicillium</i> <i>spp.</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Mycelia</i> <i>sterilia</i>	<i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i>	<i>Candida</i> <i>albicans</i>	<i>Rhodotorula</i> <i>glutinis</i>	Загальна кількість
	КУО/100 см <sup>3</sup>							
Святошинський район, період експлуатації труб – 28-40 років								
вул. Підлісна, 6	–	–	–	1	–	23	1	25
бульв. Вернадського, 42	–	8	–	–	–	12	–	20
Солом'янський район, період експлуатації труб – 35-45 років								
вул. Героїв Севастополя, 13	1	–	–	–	–	3	1	5
вул. Е. Потьє, 9	–	2	–	–	–	10	–	12
Дарницький район, період експлуатації труб – 55-65 років								
вул. Волго-Донська, 62	–	–	–	–	–	3	–	3

В результаті було виявлено, що домінують дріжджоподібні види. Найвища кількість грибів роду *Candida* та *Rhodotorula* виявлено в Солом'янському та Святошинському районах. Серед міцеліальних форм мікроміцетів найчастіше виявляли гриби, що належать до видів *Penicillium*, *Mycelia* та *Aspergillus*, які досить стійкі до дії дезінфіктантів і мають токсикогенні, алергенні та мутагенні властивості.

Таблиця 4.6 – Загальна кількість мікроміцетів у **водопровідній воді** міста Києва, визначена **запропонованим методом**

Місце відбору зразка води (2016 рік)	<i>Aspergillus spp.</i>	<i>Penicillium spp.</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>	<i>Mycelia sterilia</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Загальна кількість
	КУО/100 см <sup>3</sup>									
Святошинський район, період експлуатації труб – 28-40 років										
вул. Підлісна, 6	75	–	–	–	75	25	–	450	300	925
бульв. Вернадського, 42	50	25	–	50	75	–	–	150	–	350
Солом'янський район, період експлуатації труб – 35-45 років										
вул. Героїв Севастополя, 13	25	175	–	–	50	–	25	875	–	1150
вул. Е. Потьє, 9	25	150	–	–	–	–	–	375	25	575
Дарницький район, період експлуатації труб – 55-65 років										
вул. Волго-Донська, 62	–	100	25	–	100	–	–	75	–	300

Запропонований метод, у порівнянні з класичним методом, дає можливість виявити мікроорганізми, що перебувають у життєздатному некультурабельному стані. Це було підтверджено на основі дослідів з санітарно-показовим мікроорганізмом *Escherichia coli* та дріжджоподібним грибом *Candida albicans*, які після дії гіпохлориту натрію переходили в життєздатний некультурабельний стан і не здатні були культивуватися на диференційно-діагностичних агарових середовищах, які використовують при класичному методі аналізу води. Однак, за допомогою запропонованого методу, а саме, використання з метою рекультивації клітин мікроорганізмів рідкого поживного середовища М-9, з подальшою культивацією на диференційно-діагностичних агарових середовищах, культури

*Escherichia coli* та *Candida albicans* відновлювали свою культурабельність вже через добу. Це дає можливість виявляти реальну кількість мікроорганізмів, що містяться у водопровідній воді.

Окрім того в лабораторних умовах показано, що збільшення кількості мікроорганізмів у середовищі М-9 відбувається за рахунок рекультивації клітин, що перебувають у життєздатному некультурабельному стані, та частково за рахунок розмноження клітин, наявних у вихідній воді. Показано, що внесення мікроорганізмів *Candida albicans* ( $1 \cdot 10^3$  КУО/100 см<sup>3</sup>) у культивованому стані в середовище М-9 і Сабуро, та термостатування цих зразків протягом доби призводить до збільшення їх кількості у середовищі Сабуро до  $1 \cdot 10^7$  КУО/100 см<sup>3</sup>, а у середовищі М-9 через добу їх кількість зростає до  $1 \cdot 10^4$  КУО/100 см<sup>3</sup>. Однак, якщо у ці середовища на одну добу помістити мікроорганізми, що перебувають у життєздатному некультурабельному стані, то у середовищі Сабуро відмічається відсутній ріст клітин, тоді як в середовищі М-9 їх кількість досягає десятків КУО/см<sup>3</sup>.

Виявлено, що використання стандартного мікробіологічного методу, що базується на застосуванні класичних живильних середовищ, з метою оцінки якості водопровідної води не виявляє мікроорганізми, що знаходяться у життєздатному некультурабельному стані. Однак, застосування мінімального поживного середовища М-9 як додаткового етапу виявлення сприяє реактивації бактерій та мікроміцетів, що перебували у ЖНС. В процесі мікологічного аналізу води з використанням стандартного середовища Сабуро у воді виявляються поодинокі клітини мікроміцетів, тоді як введення додаткового етапу культивування у середовищі М-9 дозволяє виявляти ширший спектр мікроміцетів, а саме виділено: *Aspergillus niger*, *Penicillium spp*, *Rhodotorula glutinis*, *Alternaria alternate*, *Candida albicans* та *Cladosporium spp*. Запропонований підхід щодо оцінки якості води дозволяє отримати більш достовірні результати лабораторних досліджень, а це в свою чергу дає можливість запобігти багатьом інфекційним захворюванням, які передаються водним шляхом.

Одночасно з мікологічним аналізом водопровідної води м. Києва, відібраної з розподільної мережі різних районів, в різні періоди року, проведено також аналіз води за мікробіологічними показниками. Між собою були порівняні класичній та запропонований метод. Показано, що протягом періоду моніторингу, незалежно від місця відбору проб води та методу, не спостерігалось відхилення мікробіологічних показників від допустимих норм.

#### **4.2 Аналіз води зі свердловин м. Києва**

Ступінь забруднення води підземних джерел залежить від багатьох причин: від глибини, з якої забирається вода, попадання в водоносний шар забруднень від промислових підприємств, звалищ, сільськогосподарських полів тощо. Важливо відзначити, що до першої групи ризику відносяться неглибокі (20-40 метрів), піщані свердловини і джерела, тому що саме ці води найбільш схильні до техногенного забруднення. Більш захищені та безпечні артезіанські свердловини, глибина яких починається від 100 метрів, вони в основному захищені плащем водонепроникних глин і суглинків. Однак, зважаючи на наявність регіональних водозаборів з артезіанських горизонтів, зустрічаються місця, де надлишковий тиск артезіанських вод практично вироблено. В результаті утворюються депресивні воронки, які приводять до інфільтрації поверхневих і ґрунтових вод в артезіанські водоносні горизонти. Це, в свою чергу, веде до забруднення водоносного горизонту, який вважався раніше досить чистим.

Незважаючи на ці можливі ризики, все-таки споживач, в основному, надає перевагу воді не з водорозподільної мережі міста, а із свердловин. Виходячи з цього, рекомендується систематично проводити аналіз якості води із свердловин, бо така вода може містити небезпечні для людини мікроорганізми, залишаючись чистою і прозорою на вигляд.

Тому нами проведено аналіз проб води з декількох свердловин. Відбір зразків води зі свердловин здійснювали у Дарницькому районі в осінньо-зимній період. Аналізували відібрані зразки води класичним методом, а також



запропонованим методом виявлення мікроорганізмів у життєздатному некультурабельному стані (табл. 4.7).

Встановлено, що у всіх пробах води, які досліджували класичним методом, було виявлено бактерії в межах допустимої норми. А також було виявлено не дуже багато мікроміцетів, таких родів як *Rhodotorula* (60 КУО/100 см<sup>3</sup>), *Penicillium* та *Absidia* по 5 КУО/100 см<sup>3</sup>.

Показано, що застосування запропонованого методу дає можливість виявити більше видів та їх кількість порівняно з класикою. Так, майже у всіх зразках води із свердловин було виділено різновидність міцеліального гриба роду *Penicillium*, що може негативно впливати на стан здоров'я людини, а саме викликати такі розлади як підвищена стомлюваність, загальну слабкість, головний біль, мігрені, нудоту, запаморочення. В деяких зразках води було виявлено міцеліальні гриби роду *Cladosporium*, *Mycelia* та *Aspergillus* в кількості від 1 до 3·10<sup>2</sup> КУО/100 см<sup>3</sup>, що можуть стати причиною розвитку респіраторних захворювань, дерматозів. Також, виявлено дріжджоподібні гриби роду *Rhodotorula* і *Candida*, кількість яких становить від 1 до 8·10<sup>2</sup> КУО/100 см<sup>3</sup>, які можуть стати причиною мікозів різних органів. Всього виявлено 6 родів міксоміцетів. Особливо небезпечних видів мікроскопічних грибів нами виявлено не було.

Таблиця 4.7 – Аналіз зразків води із свердловин Дарницького району

Місце відбору зразків води, вул.	Класичний метод	Запропонований метод
	КУО/100 см <sup>3</sup>	
М. Драгоманова, 29	60 - <i>Rhodotorula glutinis</i> , бактерії	1·10 <sup>2</sup> - <i>Rhodotorula glutinis</i> , 1·10 <sup>2</sup> - <i>Penicillium spp</i> <sup>1</sup> , 1·10 <sup>2</sup> - <i>Penicillium spp</i> <sup>2</sup> , 1·10 <sup>2</sup> - <i>Penicillium spp</i> <sup>3</sup>
Здолбунівська, 7	бактерії	1·10 <sup>2</sup> - <i>Penicillium spp</i> <sup>2</sup> , 1·10 <sup>2</sup> - <i>Candida albicans</i>
Григоренка, 41	бактерії	1·10 <sup>2</sup> - <i>Cladosporium cladosporioides</i> , 2·10 <sup>2</sup> - <i>Mycelia sterilia</i> , бактерії
Ревуцького, 5/7	бактерії	1·10 <sup>2</sup> - <i>Penicillium spp</i> <sup>1</sup> , 8·10 <sup>2</sup> - <i>Candida albicans</i> , 1·10 <sup>2</sup> - <i>Mycelia sterilia</i> , бактерії
А. Ахматової, 16-в	5- <i>Penicillium spp</i> <sup>1</sup> , 5- <i>Absidia spp</i> , бактерії	3·10 <sup>2</sup> - <i>Aspergillus spp</i> , 1·10 <sup>2</sup> - <i>Penicillium spp</i> <sup>1</sup> , бактерії

Наочно результати аналізу зразків води із свердловини на вулиці М. Драгоманова, 29 показано на рис. 4.1. Класичним методом виявлено мікроміцети *Rhodotorula glutinis* ( $60 \text{ КУО}/100 \text{ см}^3$ ) і бактерії, що на момент аналізу знаходилися в культурабельному стані (рис. 4.1. а), а запропонованим (рис. 4.1. б) – *Rhodotorula glutinis* у кількості  $1 \cdot 10^2 \text{ КУО}/100 \text{ см}^3$ , що може бути результатом як розмноження так і часткового відновлення культури, а також три види *Penicillium*, що напевно є результатом відновлення культури в поживному середовищі М-9, бо за класичним методом не були виявлені.

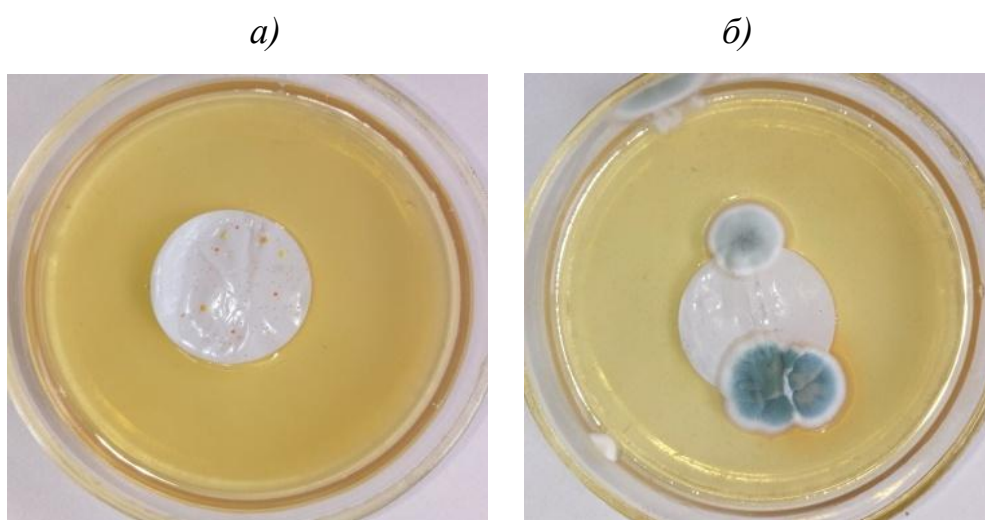


Рисунок 4.1 – Результати аналізу зразків води із свердловини на вулиці М. Драгоманова, 29, Дарницький район: а) класичний метод; б) запропонований метод

Отже, за результатами, які наведені в таблиці 7, видно, що навіть у воді із свердловин крім культурабельних форм мікроорганізмів, також присутні мікроорганізми, що перебувають в життєздатному некультурабельному стані.

Варто зазначити, що особи з ослабленими імунною і дихальною системами можуть бути більш сприйнятливі до наявності мікроскопічних грибів у воді.

### 4.3 Систематичний аналіз доочищеної води м. Києва

В процесі доставки води від очисної станції, де вона пройшла необхідну обробку, до споживача вода піддається впливу великої кількості різних забруднень в трубопроводах розвідних мереж (вторинні забруднення).

Пересічний споживач навряд чи здатний якимось реально вплинути на ситуацію з технічним станом систем водопостачання, тому єдино можливий вихід з ситуації, що склалася – доводити водопровідну воду до належної якості, використовуючи установки та побутові фільтри для доочистки води.

З метою виявлення реальної кількості мікроорганізмів, що містяться у доочищеній воді, нами було проведено порівняння класичних методів (КМ) виявлення мікроорганізмів з запропонованим методом (ЗМ) виявлення мікроорганізмів, що перебувають у життєздатному некультурабельному стані.

Проведено систематичний мікробіологічний та мікологічний аналіз зразків води з установок доочищення водопровідної води, принцип роботи яких базується на сорбційній очистці на природних і синтетичних сорбентах та знезараженні води ультрафіолетовим опроміненням. Зразки відібрано у різні періоди року, в різних державних установах м. Києва, де використовували дані установки доочищення. У процесі аналізу води проведено порівняння результатів отриманих за класичним методом виявлення мікроорганізмів і запропонованим методом виявлення мікроорганізмів, що перебувають у життєздатному некультурабельному стані.

Зразки відбирали з установок доочищення водопровідної води, що знаходяться за адресами: вул. Володимирська, 54; бульв. Вернадського, 42; вул. Академіка Доброхотова, 13 та вул. Академіка Заболотного, 154.

При аналізі доочищеної води, відібраної за вказаними адресами, класичним методом у весняний період (табл. 4.8) виявлено від 1 до 5 КУО/100 см<sup>3</sup> міцеліальних видів грибів, таких як *Aspergillus* і *Penicillium*, а також 1-24 КУО/100 см<sup>3</sup> дріжджоподібних грибів – *Candida*. Встановлено, що кількісний показник дріжджоподібних видів грибів зростає при підвищенні температури.

Відзначено, що при збільшенні дріжджоподібних видів грибів кількісний і видовий показники міцеліальних форм мікроміцетів знижуються, що добре видно з даних, отриманих у весняний період. За даними, отриманими при ЗМ, видно, що у зразку доочищеної води з вул. Володимирська, 54 було виявлено велику кількість дріжджоподібних грибів *Candida*, що, скоріш за все, є результатом рекультивації та розмноження культури, бо вони були визначені і класичним методом. А в зразку води, відібраному на бульв. Вернадського, 42, наявна *Candida*, що є результатом реактивації культури в поживному середовищі М-9.

Таблиця 4.8 – Результати систематичного мікологічного аналізу доочищеної води у місті Києві у весняний період (2016 рік)

Зразки води з установок доочищення водопровідної води		<i>Aspergillus</i> spp <sup>1</sup>	<i>Penicillium</i> spp <sup>1</sup>	<i>Candida globrata</i>	<i>Candida albicans</i>	Бактерії
Місця забору зразків води	Метод аналізу	КУО/100 см <sup>3</sup>				
вул. Володимирська, 54	КМ	–	–	–	24	+
	ЗМ	–	–	–	1·10 <sup>3</sup>	+
бульв. Вернадського, 42	КМ	–	–	–	–	++
	ЗМ	–	–	5,7·10 <sup>3</sup>	–	+
вул. Академіка Доброхотова, 13	КМ	1	5	1	6	+
	ЗМ	–	–	–	–	++
вул. Академіка Заболотного, 154	КМ	1	–	–	10	+
	ЗМ	–	–	–	–	++

У літній період року (табл. 4.9) класичним методом аналізу води з доочистних установок виявлено міцеліальні гриби *Aspergillus*, *Myselia* і *Cladosporium* у кількості від 1 до 3 КУО/100 см<sup>3</sup>, та дріжджоподібні гриби *Candida* – 8 КУО/100 см<sup>3</sup>.

Використовуючи запропонований метод аналізу води, виявлено мікроміцети *Aspergillus*, *Fuzarium*, *Rhizopus*, *Gilmaniella*, *Cladosporium*, а також *Candida* в кількості від 1·10<sup>2</sup> до 4·10<sup>2</sup> КУО/100 см<sup>3</sup>.

Таблиця 4.9 – Результати систематичного мікологічного аналізу доочищеної води у місті Києві у літній період (2016 рік)

Зразки води з установок доочищення водопровідної води		<i>Aspergillus spp.</i>	<i>Fuzarium solani</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>	<i>Gilmaniella humicola</i>	<i>Myselia sterilia</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Candida albicans</i>	Бактерії
Місця забору зразків води	Метод аналізу	КУО/100 см <sup>3</sup>							
вул. Володимирська, 54	КМ	–	–	–	–	3	1	–	–
	ЗМ	–	–	–	–	–	1·10 <sup>2</sup>	–	+
бульв. Вернадського, 42	КМ	–	–	–	–	–	–	–	+
	ЗМ	1·10 <sup>2</sup>	–	1·10 <sup>2</sup>	–	–	–	4·10 <sup>2</sup>	–
вул. Академіка Доброхотова, 13	КМ	1	–	–	–	–	–	8	+
	ЗМ	1·10 <sup>2</sup>	–	–	–	–	–	3·10 <sup>2</sup>	–
вул. Академіка Заболотного, 154	КМ	–	–	–	–	–	–	–	+
	ЗМ	–	1·10 <sup>2</sup>	–	1·10 <sup>2</sup>	–	1·10 <sup>2</sup>	–	–

Результати аналізу доочищеної води в осінній період (табл. 4.10) за класичним методом показали присутність мікроміцетів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* і *Candida* в кількості від 1 до 2 КУО/100 см<sup>3</sup>. А при запропонованому методі виявили *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Phoma*, *Acremaniella* і *Candida* – від 1·10<sup>2</sup> до 4·10<sup>2</sup> КУО/100 см<sup>3</sup>.

Більшість мікроорганізмів, що знаходяться у воді – мезофіли, тобто температурні межі їх росту знаходяться в межах 20-45 °С. Тому у весняний, літній та частково осінній період з підвищенням температури в навколишньому середовищі у зразках води виявляється найбільша різновидність та кількість мікроорганізмів. Це може сприяти швидкому забрудненню фільтра-адсорбера мікроорганізмами, які почнуть розмножуватись, і при таких умовах УФ лампа не зможе повноцінно знезаражувати воду, що призведе до проскоків клітин бактерій та мікроміцетів. Тому, бажано вчасно регенерувати та замінювати очистні елементи доочистних установок.

Таблиця 4.10 – Результати систематичного мікологічного аналізу доочищеної води у місті Києві в осінній період (2016 рік)

Зразки води з установок доочищення водопровідної води		<i>Aspergillus spp</i>	<i>Penicillium spp</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Phoma epyrena</i>	<i>Acremaniella atra</i>	<i>Candida albicans</i>	Бактерії
Місця забору зразків води	Метод аналізу	КУО/100 см <sup>3</sup>							
вул. Володимирська, 54	КМ	1	1	2	–	–	–	–	–
	ЗМ	1·10 <sup>2</sup>	1·10 <sup>2</sup>	2·10 <sup>2</sup>	–	4·10 <sup>2</sup>	–	2·10 <sup>2</sup>	–
бульв. Вернадського, 42	КМ	–	–	–	–	–	–	–	+
	ЗМ	–	–	1·10 <sup>2</sup>	1·10 <sup>2</sup>	–	1·10 <sup>2</sup>	–	–
вул. Академіка Доброхотова, 13	КМ	–	–	–	–	–	–	2	–
	ЗМ	–	–	–	–	–	–	1·10 <sup>2</sup>	–
вул. Академіка Заболотного, 154	КМ	–	–	–	–	–	–	–	+
	ЗМ	–	–	–	–	–	–	3·10 <sup>2</sup>	–

В таблиці 4.11 представлено дані відбору зразків води з установок доочищення водопровідної води у зимовий період року, які були проаналізовані за допомогою класичного методу, а також запропонованого методу. За класичним методом загалом всі зразки виявились чистими від мікологічного забруднення, однак, були виявлені бактерії в зразках з вул. Володимирської, 54 і вул. Академіка Заболотного, 154. При застосуванні ЗМ на вул. Володимирська, 54 було виявлено чималу кількість дріжджоподібних грибів роду *Candida* і *Rhodotorula*, в кількості  $9 \cdot 10^2$  та  $5 \cdot 10^2$  КУО/100 см<sup>3</sup>, відповідно, а також міцеліальні види грибів, такі як *Alternaria* та *Myselia*, загальною кількістю –  $2 \cdot 10^2$  КУО/100 см<sup>3</sup>. За адресою вул. Академіка Заболотного, 154 було виявлено мікроміцети роду *Candida* –  $1 \cdot 10^2$  КУО/100 см<sup>3</sup>. Позитивні результати аналізу зразків води з установки доочищення водопровідної води за адресою бульв. Вернадського, 42 пояснюються тим, що установка систематично обслуговується, з належною заміною її компонентів. А також відомо, що установку на вул. Академіка Доброхотова, 13 було нещодавно відремонтовано.

Таблиця 4.11 – Результати систематичного мікологічного аналізу доочищеної води у місті Києві у зимовий період (2017 рік)

Зразки води з установок доочищення водопровідної води		<i>Alternaria alternata</i>	<i>Mycelia sterilia</i>	<i>Rhodotorula glutines</i>	<i>Candida albicans</i>	Бактерії
Місця забору зразків води	Метод аналізу	КУО/100 см <sup>3</sup>				
вул. Володимирська, 54	КМ	–	–	–	–	+
	ЗМ	1·10 <sup>2</sup>	1·10 <sup>2</sup>	5·10 <sup>2</sup>	9·10 <sup>2</sup>	+
бульв. Вернадського, 42	КМ	–	–	–	–	–
	ЗМ	–	–	–	–	–
вул. Академіка Доброхотова, 13	КМ	–	–	–	–	–
	ЗМ	–	–	–	–	–
вул. Академіка Заболотного, 154	КМ	–	–	–	–	+
	ЗМ	–	–	–	1·10 <sup>2</sup>	–

Встановлено, що у всіх пробах води, відібраних з установок доочищення, присутні мікроскопічні гриби, середня кількість яких становить 3-8 КУО/100 см<sup>3</sup> (визначені класичним методом) (табл. 4.12) та 1,2·10<sup>2</sup>-1,6·10<sup>3</sup> КУО/100 см<sup>3</sup> (визначені запропонованим методом) (табл. 4.13).

Таблиця 4.12 – Результати систематичного мікологічного аналізу доочищеної води у місті Києві класичним методом

Місце відбору проби води (2016 рік)	<i>Aspergillus spp</i>	<i>Penicillium spp</i> <sup>1</sup>	<i>Mycelia sterilia</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Candida albicans</i>	Загальна кількість
	КУО/100 см <sup>3</sup>					
вул. Володимирська, 54	–	–	1	1	6	8
бульв. Вернадського, 42	–	–	–	–	–	0
вул. Академіка Доброхотова, 13	1	1	–	–	4	6
вул. Академіка Заболотного, 154	–	–	–	–	3	3

При цьому домінують дріжджоподібні види. Найвища кількість грибів роду *Candida* та *Rhodotorula* виявлено за адресами бульв. Вернадського, 42 та вул. Володимирська, 54. Серед міцеліальних форм мікроміцетів найчастіше виявляли гриби, що належать до видів *Aspergillus*, *Cladosporium* та *Alternaria*, які можуть викликати алергічні реакції, що зазвичай обумовлені вдиханням або потраплянням на слизові оболонки частинок мікроскопічних грибів.

Таблиця 4.13 – Результати систематичного мікологічного аналізу доочищеної води у місті Києві запропонованим методом

Місце відбору проби води (2016 рік)	<i>Aspergillus spp</i>	<i>Penicillium spp</i> <sup>1</sup>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>	<i>Gilmaniella spp.</i>	<i>Mycelia sterilia</i>	<i>Acremaniella atra</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Alternaria lternata</i>	<i>Candida globrata</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Загальна кількість
	КУО/100 см <sup>3</sup>												
вул. Володимирська, 54	25	25	–	–	–	25	–	75	25	–	525	125	825
бульв. Вернадського, 42	25	–	–	25	–	–	25	25	25	1425	100	–	1650
вул. Академіка Доброхотова, 13	25	–	–	–	–	–	–	–	–	–	100	–	125
вул. Академіка Заболотного, 154	–	–	25	–	25	–	–	25	–	–	100	–	175

Результати за запропонованим методом показали, що вода після доочисних установок містить значну кількість мікроскопічних грибів, деякі з яких перебували у життєздатному некультурабельному стані. Однак, при умові систематичної чистки та заміни дезінфікуючих елементів установок можна отримати звільнену від мікроміцетів питну воду. Прикладом цього можуть бути результати аналізу доочищеної води, отримані у зимовий період з установок, що знаходяться за адресами бульв. Вернадського, 42 та вул. Академіка Доброхотова, 13, де напередодні взяття проб води було здійснено обслуговуючі роботи установок.



## ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 4

Запропонований нами метод, у порівнянні з класичним методом, дає можливість виявити мікроорганізми, що перебувають у життєздатному некультурабельному стані. Показано, що застосування запропонованого методу дає можливість виявити ширший видовий спектр мікроорганізмів та встановити реальні кількісні показники у порівнянні з класичним методом.

Отримані результати переконливо свідчать про необхідність розробки нормативних документів для контролю життєздатних некультурабельних мікроорганізмів у воді і технологій їх вилучення з води безпосередньо на місці її споживання населенням.

## РОЗДІЛ 5

### РОЗРОБКА ТА ВИПРОБУВАННЯ КОНТАКТНО-ФЛОКУЛЯЦІЙНОГО ФІЛЬТРУ ДЛЯ ДООЧИЩЕННЯ ПИТНОЇ ВОДИ

Роль води в поширенні інфекційних захворювань важко переоцінити. Відомо, що забруднена вода, потрапляючи в організм людини, викликає 70-80% всіх відомих захворювань, на 30% прискорює його старіння. Відомо також, що багато захворювань, особливо у дітей та у людей із послабленим імунітетом, залежать і розвиваються через вживання неякісної води.

Причинами порушення якості питної води є скидання у відкриті водойми неочищених стічних вод, попадання неочищених поверхневих стоків, незадовільний санітарно-технічний стан водопроводів, ризик повторного забруднення вже очищеної води у водопровідних трубах. Висока концентрація у воді фунгіцидів, гербіцидів, мінеральних добрив та інших хімічних речовин сприяє збільшенню ступеня вірулентності та стійкості патогенних мікроорганізмів. Крім того, методи, які застосовують для знезараження води у процесі її підготовки (хлорування, озонування, УФ-опромінення), сприяють переходу мікроорганізмів в життєздатний некультурабельний стан, в якому вони не виявляються загальноприйнятими лабораторними методами, а при потраплянні в організм людини відновлюють свою культурабельність та патогенність.

Тому є нагальна потреба доочищення питної води від мікроорганізмів та мікроорганізмів, що перебувають у ЖНС, саме в місцях її безпосереднього вживання і особливо в установах, де перебувають діти (дитячі садочки, школи, літні табори) та люди з послабленим імунітетом (лікарні, поліклініки, санаторії, будинки для літніх людей). Для цього необхідно розробити ефективні способи, які забезпечували б повне видалення мікроорганізмів з води.

Ефективним і доступним фізико-хімічним способом доочищення води є сорбційний метод. Відомий спосіб доочищення питної води фільтруванням останньої крізь шар активованого вугілля. Активоване вугілля ефективно видаляє

з води органічні та хлорорганічні токсичні сполуки, що надають воді присмак і запах [126]. Однак воно непридатне для видалення мікроорганізмів з води, тобто, активоване вугілля не забезпечує знезараження, тому рекомендується подальше використання фізико-хімічних способів для повного знезараження води [127].

В доступній нам літературі ми не знайшли робіт щодо очищення води від мікроорганізмів, що перебувають у ЖНС. Саме тому нами поставлена задача розробити ефективний спосіб доочищення води від життєздатних некультурабельних мікроорганізмів, використовуючи їх природну здатність до адгезії на різних поверхнях, що забезпечило б повне видалення мікроорганізмів з води.

### **5.1 Вибір зернистого завантаження для видалення некультурабельних життєздатних мікроорганізмів з води**

З метою створення простих та надійних способів очищення води від мікроорганізмів в ЖНС вирішено використати природну здатність цих мікроорганізмів до іммобілізації на різних поверхнях. Як відомо, в практиці водопідготовки широко використовуються різні фільтруючі завантаження (найчастіше застосовують піщані та/чи вугільні фільтри), а також деякі реагенти. Тому саме такі матеріали обрано для оцінки ефективності їх застосування при видаленні життєздатних некультурабельних мікроорганізмів з води.

Доочищенню піддавали водопровідну дехлоровану воду.

В дослідженнях використовували санітарно-показові мікроорганізми *Escherichia coli*, а також дріжджоподібні гриби *Candida albicans*, які в значній кількості зустрічається у воді та є одними з найчастіше виділяємих видів *Candida* у хворих. Ці тест-організми заздалегідь переведено в життєздатний некультурабельний стан шляхом використання відповідних концентрацій гіпохлориту натрію.

Контаміновану життєздатними некультурабельними клітинами воду фільтрували крізь колонки, діаметром – 3,50 см, площею – 9,61 см<sup>2</sup>, завантажені

одна – кварцовим піском з діаметром зерен 0,5-0,8 мм та друга – мезопористим кісточковим активованим вугіллям (КАВ), з розміром пор 2-50 нм та питомою площею поверхні 1036,4 м<sup>2</sup>/г. Лінійна швидкість фільтрування води становила 5,5 м/год.

Встановлено, що ступінь очищення води від мікроорганізмів при фільтруванні через кварцовий пісок залежить від вихідної концентрації культури. Виявлено, що кварцовий пісок в середньому затримує 1,0-1,5 порядки культури. Так, при вихідній концентрації *Escherichia coli* 9,6·10<sup>2</sup> КУО/см<sup>3</sup> ступінь очищення води становить 1,5 порядки протягом 6-ти годин (рис. 5.1., крива 1). Однак, у випадку підвищення концентрації культури до 5·10<sup>3</sup> КУО/см<sup>3</sup> в першу годину фільтрування на поверхні фільтру затримується лише приблизно 0,7 порядки культури (рис. 5.1., крива 2).

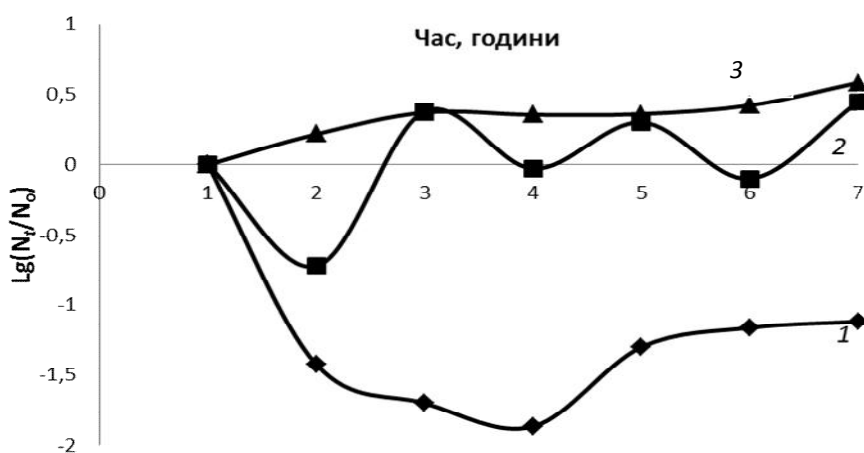


Рисунок 5.1 – Кінетика видалення клітини *Escherichia coli* в процесі фільтрування води через шар кварцового піску. Вихідні концентрації культури: 1) 9,6·10<sup>2</sup>; 2) 5·10<sup>3</sup>; 3) 3,4·10<sup>4</sup> КУО/см<sup>3</sup>

Починаючи з другої години фільтрування забрудненої культурою води, відбувається накопичення мікроорганізмів на поверхні фільтруючого завантаження, а також їх наступний відрив. При подальшому фільтруванні спостерігається чергування затримки культури та її накопичення на поверхні фільтруючого завантаження з подальшим її відривом. Фільтрування води з титром культури *Escherichia coli* 3,4·10<sup>4</sup> КУО/см<sup>3</sup> через шар кварцового піску

відбувається рівномірне накопичення культури на завантаженні (рис. 5.1., крива 3).

Показано, що активоване вугілля як завантаження при фільтруванні води, забрудненої культурою *Escherichia coli*, в порівнянні з піском має схожий ступінь затримки культури. Так, при концентрації *Escherichia coli* у воді  $6,7 \cdot 10^2$  КУО/см<sup>3</sup> затримувалося в середньому 0,6-1,4 порядки культури протягом 6 годин (рис. 5.2., крива 1). А при концентрації  $4 \cdot 10^3$  та  $3,3 \cdot 10^4$  КУО/см<sup>3</sup> відбувається як накопичення культури, так і її відрив (рис. 5.2., крива 2 та 3, відповідно).

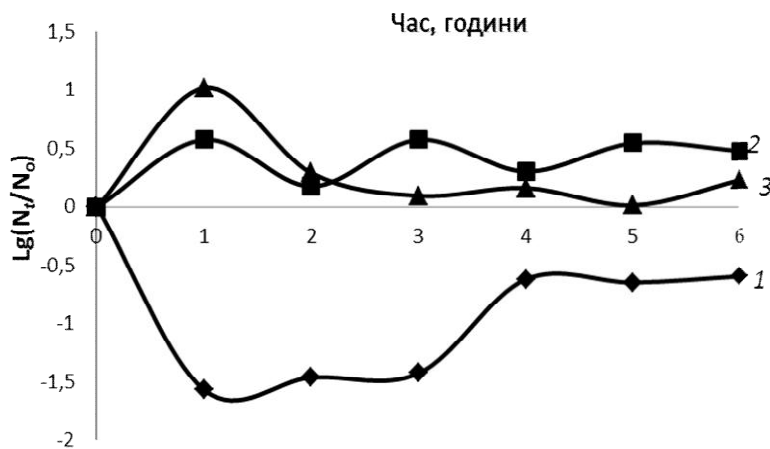


Рисунок 5.2 – Кінетика видалення клітини *Escherichia coli* в процесі фільтрування води через шар активованого вугілля. Вихідні концентрації культури: 1)  $6,7 \cdot 10^2$ ; 2)  $4 \cdot 10^3$ ; 3)  $3,3 \cdot 10^4$  КУО/см<sup>3</sup>

Отже, для фільтрування води, забрудненої кишковою паличкою, завантаженням для фільтру можна використовувати як кварцовий пісок, так і активоване вугілля, бо різниця їх здатності затримувати культуру невелика.

Також було досліджено зернисті завантаження (кварцовий пісок та активоване вугілля) на здатність затримувати клітини *Candida albicans*.

Показано, що незалежно від ступеня забруднення води культурою *Candida albicans* затримка культури відбувається на 0,3-0,4 порядки. Такий ступінь видалення культури спостерігається при концентраціях  $1 \cdot 10^2$ ,  $2,3 \cdot 10^3$  та при  $1,7 \cdot 10^4$  КУО/см<sup>3</sup> (рис. 5.3).

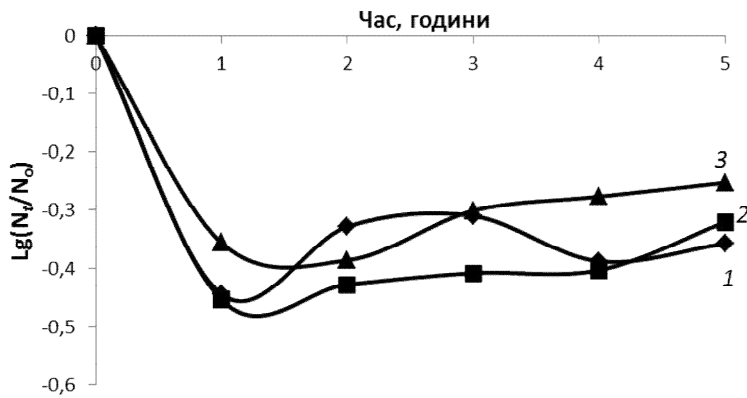


Рисунок 5.3 – Кінетика видалення клітини *Candida albicans* в процесі фільтрування води через шар кварцового піску. Вихідні концентрації культури: 1)  $1 \cdot 10^2$ ; 2)  $2,3 \cdot 10^3$ ; 3)  $1,7 \cdot 10^4$  КУО/см<sup>3</sup>

Результати фільтрування забрудненої дріжджоподібною культурою *Candida albicans* води через активоване вугілля показали, що зернисте завантаження саме по собі здатне досить добре затримувати клітини *Candida albicans*, так при початковій концентрації культури  $1 \cdot 10^2$  КУО/см<sup>3</sup> затримуються всі два порядки культури, при підвищенні титру культури до  $3,6 \cdot 10^3$  КУО/см<sup>3</sup> – ступінь вилучення становить 1,8-2 порядки, при  $1,5 \cdot 10^4$  КУО/см<sup>3</sup> – 1,2 порядки культури *Candida albicans* (рис. 5.4).

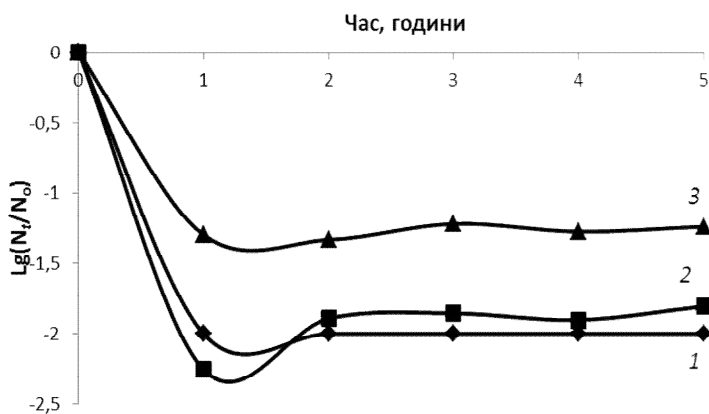


Рисунок 5.4 – Кінетика видалення клітини *Candida albicans* в процесі фільтрування води через шар активованого вугілля. Вихідні концентрації культури: 1)  $1 \cdot 10^2$ ; 2)  $3,6 \cdot 10^3$ ; 3)  $1,5 \cdot 10^4$  КУО/см<sup>3</sup>

Як видно з отриманих нами результатів, взаємодія дріжджоподібних грибів з поверхнею вугілля значно вища, ніж з поверхнею піску, ймовірно це пов'язано з тим, що поверхня активованого вугілля має підвищену шорсткість. Хоча мікропори та мезопори і недоступні для грибів, сорбція також можлива з участю макропор, проникнення в котрі дещо збільшує процес адсорбції, а також затрудняє змив дріжджоподібних грибів з поверхні активованого вугілля. Очевидно, що зовнішня поверхня зерен однакової форми пористого матеріалу завжди більша, ніж непористого. Також слід враховувати те, що поверхня піску є гідрофільною, тоді як переважаючі гідрофобні ділянки поверхні клітин дріжджоподібних грибів та активованого вугілля підвищують їх взаємодію у порівнянні з взаємодією цих грибів з піском.

Таким чином, ефективність закріплення *Candida albicans* пов'язана з шорсткістю поверхні зернистого завантаження, а також з поверхневими характеристиками як самої клітини, так і зернистих загрузок.

Тому для видалення з води життєздатних некультурабельних клітин *Candida albicans* концентрацією  $1 \cdot 10^2$  КУО/см<sup>3</sup>, можна використовувати повільне фільтрування на активованому вугіллі. У випадку культури *Escherichia coli*, для повного видалення її з води одного фільтрування недостатньо. Також, слід взяти до уваги, що адсорбовані мікроорганізми залишаються життєздатними на поверхні фільтруючого завантаження, що в свою чергу призводить до їх росту та розмноження і підвищує ризик повторного забруднення води. Щоб запобігти цьому необхідно застосовувати допоміжні методи.

## **5.2 Вибір флокулянтів для знезараження некультурабельних життєздатних мікроорганізмів у воді**

Враховуючи високу стійкість життєздатних некультурабельних мікроорганізмів до класичних методів знезараження, а також їх здатність, як і у мікроорганізмів в культурабельному стані, до адгезії на різних поверхнях,

доцільно вивчити їх видалення, використовуючи катіонні флокулянти, які набули широкого розповсюдження в практиці водопідготовки.

Традиційна технологія підготовки питної води включає процеси знебарвлення та освітлення, зазвичай, з використанням коагуляції, фільтрування та знезаражування сполуками хлору. Відомо, що знезараження води сполуками хлору зумовлює утворення в очищеній воді токсичних, канцерогенних сполук. А також, як показано дослідженнями, сполуки хлору не повністю виконують свою роль знезараження мікроорганізмів у воді, бо сприяють переходу їх у життєздатній некультурабельний стан.

Тому, в останні роки увага дослідників у деяких країнах світу прикута до полімерних реагентів неокиснювальної дії, що стали певною альтернативою хлору в технології підготовки питної води з поверхневих водойм [128, 129]. До таких реагентів належать флокулянти, які широко використовуються на станціях водопідготовки. Зазвичай процес коагуляції поєднують з флокуляцією. За допомогою флокулянтів можливо підвищити та прискорити дію коагулянтів. Завдяки великій молекулярній масі флокулянти надзвичайно ефективно утворюють місточки між мікропластівцями, що виникли під час коагуляції, утворюючи більш крупні макропластівці (флокули), які швидко випадають в осад. Однак, використання традиційних коагулянтів не завжди дозволяє отримувати питну воду високої якості за фізико-хімічними показниками, наприклад, при використанні сульфату алюмінію у воді залишаються високі концентрації залишкового алюмінію [130]. Тому все частіше застосовують флокулянти катіонного походження у підготовці питної води без коагулянтів. Катіонна флокуляція представляє собою комплекс хімічних та фізичних взаємодій між негативно зарядженими клітинами мікроорганізмів та позитивно зарядженими хімічними реагентами. При цьому залучаються різні сили, а саме, електростатичні сили, сили Ван-дер-Ваальса, сила тяжіння. Позитивно заряджені катіони нейтралізують негативний заряд на поверхні мікроорганізмів. Коли заряд таких часточок нейтралізований, відбувається їх поступове зближення та зіткнення. При



зіткненні часточки з'єднуються за рахунок водневих зв'язків чи сил Ван-дер-Ваальса, при цьому утворюючи флокули, які здатні випадати в осад [131].

Катіонні флокулянти мають антимікробні властивості за рахунок наявності амонійних груп у структурі флокулянта. Відомо, що катіонні електроліти мають позитивний поверхневий заряд, за рахунок чого відбувається їх адсорбція на поверхні клітини мікроорганізму, що призводить до блокування дихання, живлення та транспорту метаболітів крізь клітинну стінку. Порушуючи проникаючу здатність клітинної стінки мікроорганізмів, катіонні флокулянти надходять всередину клітини, де вступають в електростатичну та гідрофобну взаємодію з фосфоліпідами та білками цитоплазматичної мембрани. Ці процеси призводять до розриву мембрани клітини, блокуванню дихальної системи та врешті решт до загибелі мікроорганізму.

З метою визначення ефективності катіонних флокулянтів щодо знезараження культури, що перебуває в життєздатному некультурабельному стані, при доочищенні води проведено серію експериментів з використанням наступних реактивів: полідіалілдиметиламонію хлориду (ДБ-45), хлориду та фосфату полігексаметиленгуанідину (ПГМГ) (Валеус), суміш ДБ-45 та гуанідоснови (Дезавід). Обрані флокулянти часто застосовують на станціях водопідготовки (ДБ-45), у виробництві бутильованих вод (Валеус) та для знезараження води у плавальних басейнах (Дезавід).

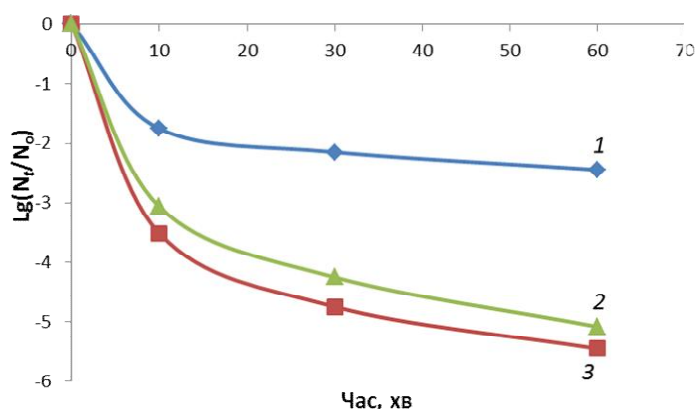


Рисунок 5.5 – Порівняльна дія флокулянтів при доочищенні води від *Escherichia coli*: 1 – ДБ-45; 2 – Дезавід; 3 – Валеус

В досліджах використовували катіонні флокулянти (ДБ-45, Валеус та Дезавід) у концентрації  $0,5 \text{ мг/дм}^3$ , концентрація культури *Escherichia coli* становила  $8,4 \cdot 10^5 \text{ КУО/см}^3$ . Тривалість взаємодії зараженої води з флокулянтом становила 60 хв. З даних на рис. 5.5. видно, що Валеус та Дезавід мають близьку ефективність видалення *Escherichia coli*, яка складає 5,4 та 5,0 порядки, відповідно, а використання ДБ-45 забезпечує ступінь видалення лише – 2,4 порядки.

Аналогічні результати отримано і при інактивації дріжджоподібних грибів *Candida albicans*. Використовуючи ті самі катіонні флокулянти у концентрації  $0,5 \text{ мг/дм}^3$ , при концентрації культури *Candida albicans*  $2,5 \cdot 10^5 \text{ КУО/см}^3$ , з даних на рис. 5.6. ми дійшли висновку, що Валеус та Дезавід також мають схожий ступінь видалення *Candida albicans*, який складає 3,0 та 2,8 порядки, відповідно, а ДБ-45 має менший ступінь видалення – 2,1 порядку.

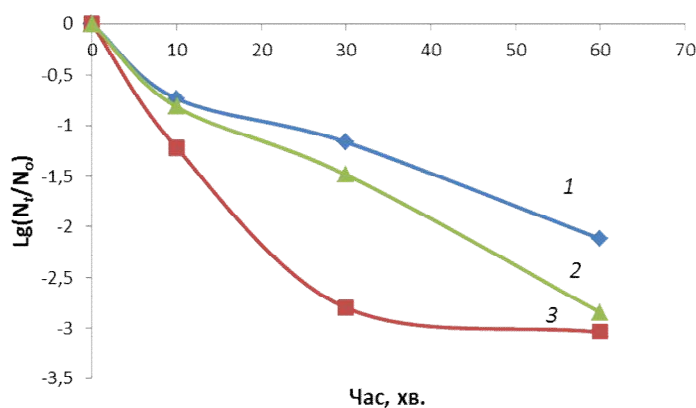


Рисунок 5.6 – Порівняльна дія флокулянтів при доочищенні води від *Candida albicans*: 1 – ДБ-45; 2 – Дезавід; 3 – Валеус

На дію флокулянтів має великий вплив рН води, що очищається. Так Валеус належить до слабких основ, у зв'язку з цим при рН 8,2 він менш дисоційований, ніж ДБ-45, що є сильною основою, добре дисоційованою в усьому діапазоні рН. Флокулянт Дезавід також має вузький діапазон дії – 7,2-7,8 рН. Тому, у зв'язку з широким використанням ДБ-45 на станціях водопідготовки питної води та з широким діапазоном його дії (6,5-8,0 рН), для подальших експериментів нами обрано катіонний флокулянт ДБ-45.

### 5.3 Використання флокулянту і зернистих загрузок для знезараження та видалення життєздатних некультурабельних мікроорганізмів з води

З метою покращення ступеня знезараження та видалення життєздатних некультурабельних мікроорганізмів з води нами запропоновано поєднати та дослідити спільне застосування зернистих завантажень, а саме кварцовий пісок або активоване вугілля, що широко використовують як на станціях водопідготовки, так і в локальних водоочисних апаратах, оскільки вони є економічно доступними та здатними затримувати в певних кількостях життєздатні некультурабельні мікроорганізми з води, так і катіонні флокулянти, що у свою чергу, мають виражений бактерицидний та фунгіцидний ефект. Для цього застосували метод контактної флокуляції, суть якого полягала в одночасній подачі на поверхню зернистого завантаження флокулянта і контамінованої води.

Контаміновану життєздатними некультурабельними клітинами культур *Escherichia coli* або *Candida albicans* воду фільтрували крізь колонку діаметром – 3,50 см, площею – 9,61 см<sup>2</sup>, завантажену кварцовим піском з діаметром зерен 0,5-0,8 мм або мезопористим кісточковим активованим вугіллям (КАВ), з питомою площею поверхні 1036,4 м<sup>2</sup>/г. Швидкість фільтрування води становила – 5,5 м/год, продуктивність фільтрування – 5,6 дм<sup>3</sup>/год. Одночасно на поверхню зернистого завантаження автоматично подавали флокулянт ДБ-45, концентрація якого становила 0,5 і 1,0 мг/дм<sup>3</sup>. Фільтрат відбирали щогодини протягом 6-ти годин.

При фільтруванні бактеріальної культури *Escherichia coli* у концентрації  $1,1 \cdot 10^2$  КУО/см<sup>3</sup> через кварцовий пісок з одночасною подачею флокулянта ДБ-45 концентрацією 0,5 мг/дм<sup>3</sup> досягнуто повне видалення культури з води, а при концентрації культури  $7,7 \cdot 10^3$  КУО/см<sup>3</sup> (це майже чотири порядки) флокулянт у заданій концентрації прибирає лише 1,4-1,6 порядки культури (рис. 5.7).

Попередніми дослідженнями водопровідної води м. Києва, а також свердловин на наявність мікроорганізмів, встановлено, що в середньому

контамінованість води мікроорганізмами сягає двох порядків. У таких випадках концентрації флокулянту  $0,5 \text{ мг/дм}^3$  буде достатньо для доочищення води.

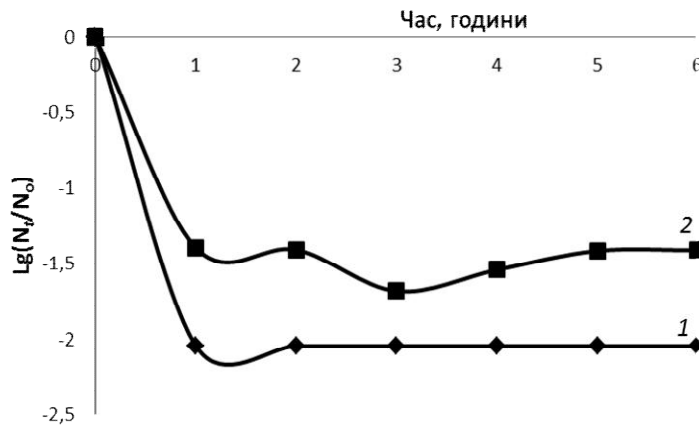


Рисунок 5.7 – Кінетика очищення води від клітин *Escherichia coli* при застосуванні контактної флокуляції (ДБ-45  $0,5 \text{ мг/дм}^3$ ), де в якості контактного завантаження слугує кварцовий пісок. Вихідні концентрації культури: 1)  $1,1 \cdot 10^2$ ; 2)  $7,7 \cdot 10^3 \text{ КУО/см}^3$

Аналогічні результати отримано при фільтруванні води через активоване вугілля. Так, якщо концентрація культури *Escherichia coli* становить  $1,4 \cdot 10^2 \text{ КУО/см}^3$ , при заданих параметрах фільтрування, ступінь видалення сягає 2 порядки, а при  $4 \cdot 10^2 \text{ КУО/см}^3$  – 1,3-1,7 порядки видалення культури (рис. 5.8).

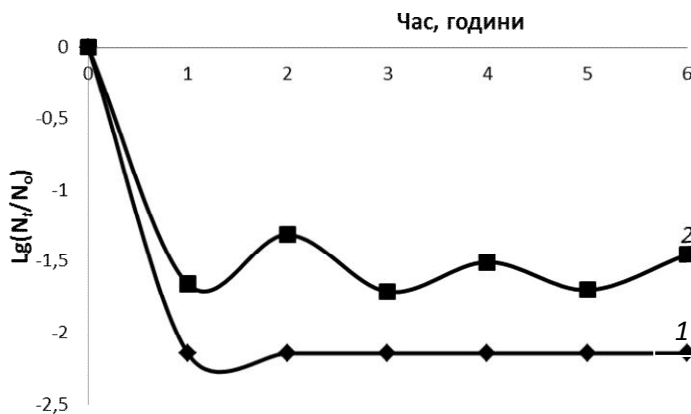


Рисунок 5.8 – Кінетика очищення води від клітин *Escherichia coli* при застосуванні контактної флокуляції (ДБ-45  $0,5 \text{ мг/дм}^3$ ), де в якості контактного завантаження слугує активоване вугілля. Вихідні концентрації культури: 1)  $1,4 \cdot 10^2$ ; 2)  $4 \cdot 10^3 \text{ КУО/см}^3$

Отриманні результати свідчать, що хоча і відбувається вилучення культури мікроорганізмів з води, однак обрана концентрація флокулянту є недостатньою і з часом в усіх випадках фільтрування води при зростанні концентрації культури спостерігається проскок.

Саме тому нами проведено експерименти зі збільшенням концентрації флокулянта ДБ-45 до 1 мг/дм<sup>3</sup>. Встановлено, що підвищена концентрація флокулянту повністю видаляє культуру *Escherichia coli* у концентрації  $8,9 \cdot 10^2$  та  $4,1 \cdot 10^3$  КУО/см<sup>3</sup> з води при фільтруванні її через піщаний фільтр. А при збільшенні концентрації культури до  $3,9 \cdot 10^4$  та до  $5,4 \cdot 10^5$  КУО/см<sup>3</sup> в середньому видаляється 2,1 та 2,4 порядки, відповідно (рис. 5.9).

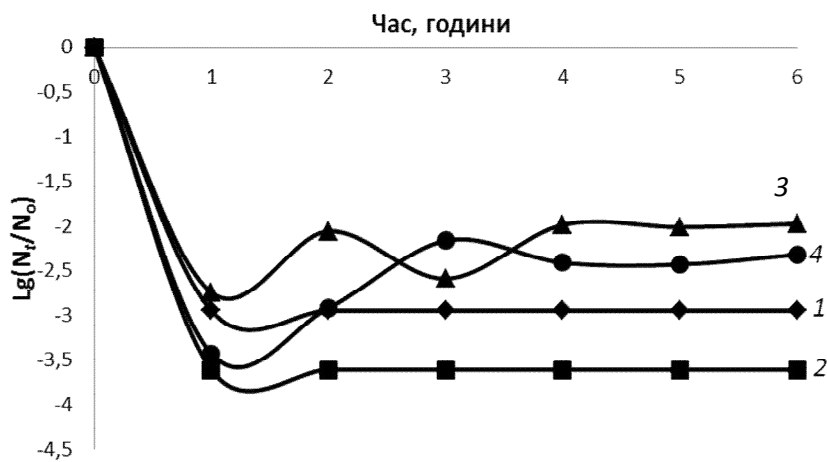


Рисунок 5.9 – Кінетика очищення води від клітин *Escherichia coli* при застосуванні контактної флокуляції (ДБ-45 1 мг/дм<sup>3</sup>), де в якості контактного завантаження слугує кварцовий пісок. Вихідні концентрації культури: 1)  $8,9 \cdot 10^2$ ; 2)  $4,1 \cdot 10^3$ ; 3)  $3,9 \cdot 10^4$ ; 4)  $5,4 \cdot 10^5$  КУО/см<sup>3</sup>

Аналогічні результати отримано при фільтруванні контамінованої води через активоване вугілля. Культура *Escherichia coli* у концентрації  $8,6 \cdot 10^2$  та  $5 \cdot 10^3$  КУО/см<sup>3</sup> видаляється повністю з води, а збільшення концентрації до  $2,2 \cdot 10^4$  КУО/см<sup>3</sup> – на 2,2-2,4 порядки, а при  $1 \cdot 10^5$  КУО/см<sup>3</sup> – в першу годину на 3,6 порядки, а далі знезаражуюча дія зменшується (рис. 5.10).

Відмічено, що в першу годину ступінь затримки культури найвищий, при подальшому фільтруванні води з титром забруднення культурою  $10^2$ - $10^3$  КУО/см<sup>3</sup>

він тримається на певному рівні, а при  $10^4$ - $10^5$  КУО/см<sup>3</sup> спостерігається просок і зниження ступеня знезараження. Отримані результати можна пояснити зростанням титру культури на поверхні фільтруючого завантаження та нестачею кількості флокулянту, що надходить на поверхню фільтру.

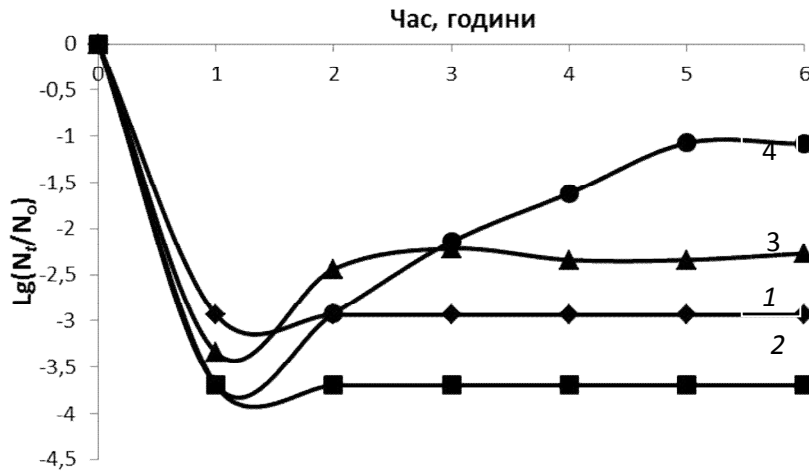


Рисунок 5.10 – Кінетика очищення води від клітин *Escherichia coli* при застосуванні контактної флокуляції (ДБ-45 1 мг/дм<sup>3</sup>), де в якості контактного завантаження слугує активоване вугілля. Вихідні концентрації культури: 1)  $8,6 \cdot 10^2$ ; 2)  $5 \cdot 10^3$ ; 3)  $2,2 \cdot 10^4$ ; 4)  $1 \cdot 10^5$  КУО/см<sup>3</sup>

Аналогічні експерименти проведено й з дріжджоподібними грибами *Candida albicans*. Застосовуючи контактну флокуляцію, а саме одночасно подаючи флокулянт ДБ-45 у концентрації 0,5 мг/дм<sup>3</sup> та контаміновану воду життєздатними некультурабельними клітинами *Candida albicans* у концентрації  $1 \cdot 10^2$  КУО/см<sup>3</sup> на піщане завантаження, досягаємо повне видалення культури. При концентрації культури  $1,2 \cdot 10^3$  КУО/см<sup>3</sup> вдається видалити 1,8-2,4 порядки, а при  $2,5 \cdot 10^4$  КУО/см<sup>3</sup> – 2,2-2,3 порядки (рис. 5.11).

Встановлено ступінь знезараження води від *Candida albicans* при фільтруванні через активоване вугілля при концентрації ДБ-45 0,5 мг/дм<sup>3</sup>. Так, коли титр культури дріжджоподібних клітин становив  $7 \cdot 10^2$  та  $1 \cdot 10^3$  КУО/см<sup>3</sup> спостерігали повне видалення життєздатних некультурабельних клітин з води. Підвищення концентрації культури до  $2,5 \cdot 10^4$  КУО/см<sup>3</sup> зменшувало ступінь її інактивації до 2,2-2,3 порядків (рис. 5.12).

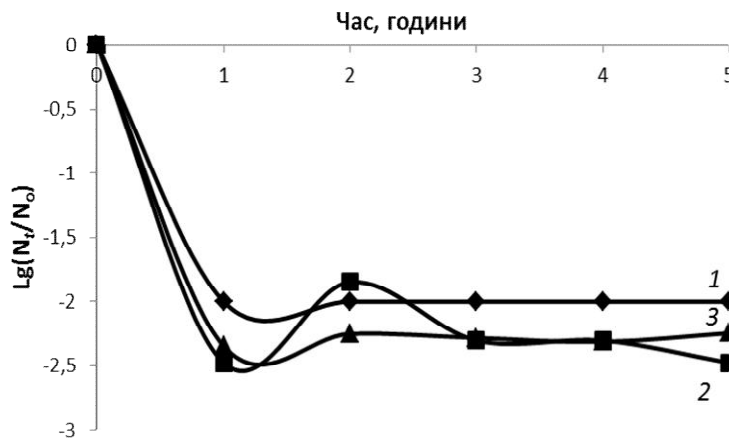


Рисунок 5.11 – Кінетика очищення води від клітин *Candida albicans* при застосуванні контактної флокуляції (ДБ-45 0,5 мг/дм<sup>3</sup>), де в якості контактного завантаження слугує кварцовий пісок. Вихідні концентрації культури: 1)  $1 \cdot 10^2$ ; 2)  $1,2 \cdot 10^3$ ; 3)  $2,5 \cdot 10^4$  КУО/см<sup>3</sup>

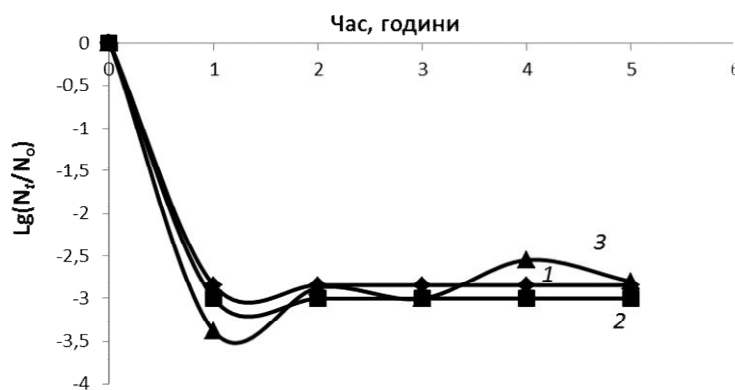


Рисунок 5.12 – Кінетика очищення води від клітин *Candida albicans* при застосуванні контактної флокуляції (ДБ-45 0,5 мг/дм<sup>3</sup>), де в якості контактного завантаження слугує активоване вугілля. Вихідні концентрації культури: 1)  $7 \cdot 10^2$ ; 2)  $1 \cdot 10^3$ ; 3)  $1,2 \cdot 10^4$  КУО/см<sup>3</sup>

Підвищення концентрації флокулянта ДБ-45 до 1 мг/дм<sup>3</sup> при фільтруванні води, що містить життєздатні некультурабельні клітини *Candida albicans*, через шар піску сприяє підвищенню ступеня знезараження води. Відмічалось повне видалення культури при її концентрації  $1,5 \cdot 10^3$  КУО/см<sup>3</sup>, тоді як 2,4-3 порядки видалялось при початковій концентрації культури  $2,6 \cdot 10^4$  КУО/см<sup>3</sup> та 1,9-2,5 порядки видалялось при  $1 \cdot 10^5$  КУО/см<sup>3</sup> (рис. 5.13).

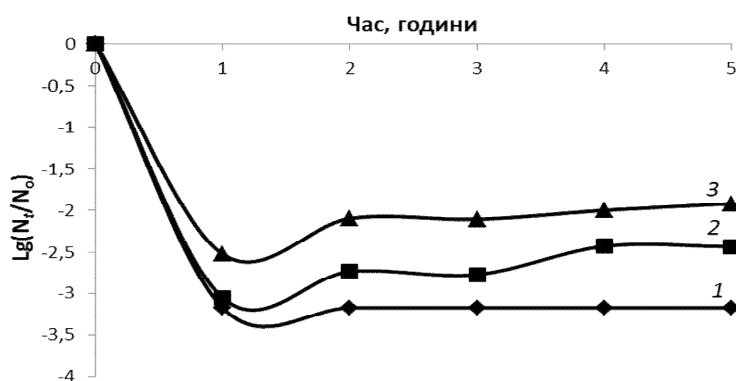


Рисунок 5.13 – Кінетика очищення води від клітин *Candida albicans* при застосуванні контактної флокуляції (ДБ-45 1 мг/дм<sup>3</sup>), де в якості контактного завантаження слугує кварцовий пісок. Вихідні концентрації культури: 1)  $1,5 \cdot 10^3$ ; 2)  $2,6 \cdot 10^4$ ; 3)  $1 \cdot 10^5$  КУО/см<sup>3</sup>

Використання активованого вугілля як фільтруючого матеріалу для вилучення з води культури *Candida albicans*, що перебуває у життєздатному некультурабельному стані, з одночасним поданням на завантаження флокулянту ДБ-45 у концентрації 1 мг/дм<sup>3</sup> сприяє зростанню ступеня очищення води. Встановлено, що повне видалення культури *Candida albicans* досягається при її титрі  $1,5 \cdot 10^3$  КУО/см<sup>3</sup>, у випадку коли титр культури становить  $2 \cdot 10^4$  КУО/см<sup>3</sup> – 3,4-4 порядки, а при  $1 \cdot 10^5$  КУО/см<sup>3</sup> – 2,1-2,5 порядки видалилось культури при очищенні води (рис. 5.14).

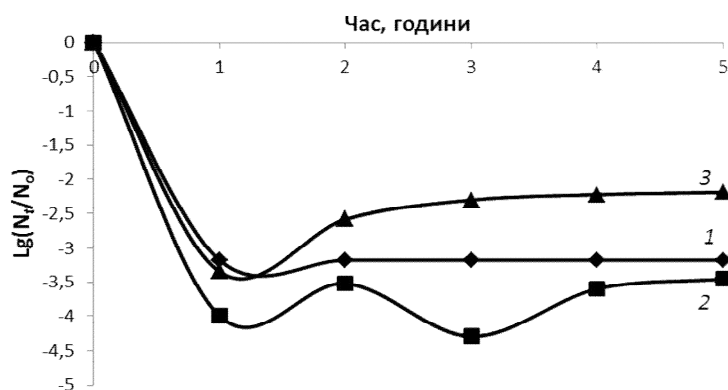


Рисунок 5.14 – Кінетика очищення води від клітин *Candida albicans* при застосуванні контактної флокуляції (ДБ-45 1 мг/дм<sup>3</sup>), де в якості контактного завантаження слугує активоване вугілля. Вихідні концентрації культури: 1)  $1,5 \cdot 10^3$ ; 2)  $2 \cdot 10^4$ ; 3)  $1 \cdot 10^5$  КУО/см<sup>3</sup>



За результатами проведених експериментів встановлено, що дріжджоподібні гриби краще затримуються на зернистих завантаженнях, особливо на активованому вугіллі, у порівнянні з бактеріальною культурою *Escherichia coli*. Очевидно, це пов'язано з розміром клітин дріжджоподібних грибів (до 5 мкм) у порівнянні з бактеріальними клітинами (1-2 мкм), що в свою чергу сприяє їх кращій затримці на поверхні зернистого завантаження і збільшує час взаємодії з флокулянтом. А також, переважаючі гідрофобні ділянки поверхні клітин *Candida albicans* та гідрофобна поверхня активованого вугілля підвищують їх взаємодію, це також збільшує час взаємодії клітин з флокулянтом.

Отже, зернисті завантаження та катіонні флокулянти самі по собі можуть протистояти мікробіологічним забрудненням у воді, однак їхнє поєднання покращує знезараження та видалення життєздатних некультурабельних мікроорганізмів з води. Перевага поєднання цих фізико-хімічних методів полягає в тому, що за рахунок наявності амонійних груп у структурі флокулянту внаслідок їх взаємодії з клітиною мікроорганізму відбувається її інактивація, тобто спостерігаються руйнівні процеси в клітині мікроорганізму, які призводять до розриву мембрани клітини, блокуванню дихальної системи та врешті решт до загибелі мікроорганізму. А зернисті завантаження, в свою чергу, затримують як живі клітини так і зруйновані, відфільтровуючи при цьому чисту питну воду. Після такого фільтрування із застосуванням флокулянта не відбувається повторного росту клітин мікроорганізмів, що підтверджується як класичним способом виявлення клітин так і запропонованим нами із застосуванням рідкого поживного середовища М-9 по виявленню клітин, що перебувають в життєздатному некультурабельному стані. Однак, застосування цих методів потребує певних технологічних рішень.

#### **5.4 Розробка технології доочищення питної води від життєздатних некультурабельних мікроорганізмів**

Метою даної частини роботи є розробити спосіб доочищення води від життєздатних некультурабельних мікроорганізмів, в якому проведення фільтрування з одночасною обробкою води реагентом забезпечило б повне видалення культури з води.

На станціях водопідготовки перед фільтруванням використовують об'ємну коагуляцію. В якості коагулянтів широко використовують солі алюмінію (сульфат алюмінію, хлорид та гідроксохлориди алюмінію) та заліза (сульфати та хлориди заліза), а також алюмінат натрію. У нашій країні та закордоном найчастіше використовують сульфат алюмінію (АС): він добре очищає воду від дрібних зважених часток. Однак, використання традиційних коагулянтів не завжди дозволяє отримувати питну воду високої якості за фізико-хімічними показниками, наприклад, при використанні сульфату алюмінію у воді залишаються високі концентрації залишкового алюмінію. До недоліків застосування коагуляції також належить те, що: необхідно застосовувати великі концентрації коагулянту; необхідно завжди додавати флокулянт, що забезпечує та прискорює утворення пластівців та їх осадження; не забезпечується інактивація мікроорганізмів; виникає вторинний ріст та розмноження мікроорганізмів на завантаженні фільтру; необхідна велика кількість промивних вод; коагулянти складні у використанні та зберіганні. А також, при коагуляції швидко забиваються поверхневі шари завантаження швидких і напірних фільтрів скоагульованими пластівцями коагулянту і завислих домішок з очищеної води. В результаті, потрібно частіше промивати завантаження фільтру, що спричиняє великі затрати води. Використання контактної флокуляції дасть можливість глибоко очистити воду від дрібнодисперсних домішок з осадженням їх з води практично рівномірно на поверхні всього об'єму завантаження фільтру. Крім цього, застосування флокуляції має ще ряд переваг, а саме: флокулянти достатньо діючі в малих концентраціях; їх можна використовувати окремо від коагулянту (катіонні

флокулянти); вони мають антимікробну дію; не дають можливості вторинному росту мікроорганізмів на завантаженні чи в осаді; простіші у використанні та зберіганні.

Тому, для вирішення поставленої задачі запропоновано спосіб доочищення питної води від життєздатних некультурабельних мікроорганізмів, в якому фільтрування води здійснюють крізь завантаження при одночасній подачі води і флокулянта на поверхню завантаження, при цьому як флокулянт використовують катіонний флокулянт полідіалілдиметиламоній хлорид (ДБ-45), а як завантаження – кварцовий пісок або активоване вугілля.

В присутності флокулянту мікроорганізми, які знаходяться у воді, зчіплюються між собою за рахунок адсорбції макромолекул флокулянта на поверхні мікроорганізмів. Пластівці, що утворюються, затримуються при фільтруванні на завантаженні. Антимікробний вплив флокулянта відбувається за рахунок наявності амонійних груп у його структурі.

Відомо, що катіонні електроліти мають позитивний поверхневий заряд, за рахунок чого відбувається їх адсорбція на поверхні клітини мікроорганізму, що призводить до блокування дихання, живлення та транспорту метаболітів крізь клітинну стінку. Далі вони порушують проникаючу здатність клітинної стінки мікроорганізмів та надходять всередину клітини, де вступають в електростатичну та гідрофобну взаємодію з фосфоліпідами та білками цитоплазматичної мембрани. Ці процеси призводять до розриву мембрани клітини, блокуванню дихальної системи та врешті решт до загибелі мікроорганізму. Такі умови забезпечують повну інактивацію кишкових бактерій *Escherichia coli* та дріжджоподібних грибів *Candida albicans*, що перебувають у ЖНС, з води.

В очищеній воді, що подається споживачу після водоочисних станцій, не повинно міститись бактерій групи кишкової палички, а також дріжджоподібних грибів. Однак дріжджоподібні гриби часто виділяються при мікологічному аналізі води, як з використанням класичного мікологічного методу, так і при застосуванні методу виявлення життєздатних некультурабельних мікроорганізмів. Відомо, що присутність *Escherichia coli* у життєздатному некультурабельному стані у воді

сприяє виникненню кишкових розладів у людей, що її споживають [132]. Тому нами досліджено ступінь видалення з води культур *Escherichia coli* та *Candida albicans* у різних концентраціях, що перебували в ЖНС, за допомогою контактної-флокуляційної установки.

Дослідження з відпрацюванням технології контактної-флокуляційної доочистки питної води від мікробіологічних забруднень (бактерій, мікроскопічних грибів), що перебувають в життєздатному некультурабельному стані, проводили на лабораторній установці, наведеній на рис. 5.15.

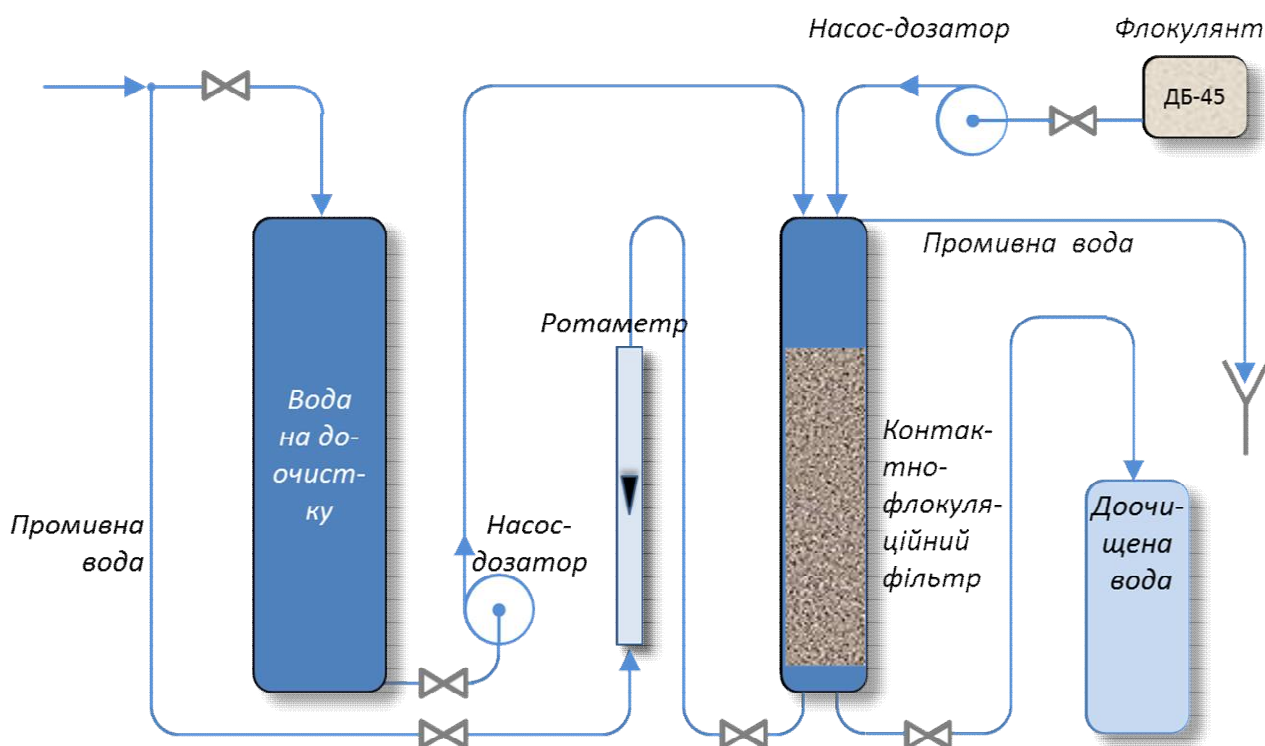


Рисунок 5.15 – Принципова схема контактної-флокуляційної установки для доочищення води

Контаміновану життєздатними некультурабельними клітинами *Escherichia coli* та *Candida albicans* воду фільтрували крізь контактний-флокуляційний фільтр, завантажений мезопористим кісточковим активованим вугіллям (КАВ), або кварцовим піском, з одночасною подачею флокулянта ДБ-45, концентрація якого становила 0,5 чи 1 мг/дм<sup>3</sup> (табл. 5.1). Діаметр фільтрувальної колонки становив 3,4 см, площа – 9,61 см<sup>2</sup>. Висота завантаження фільтра становила 60 см.

Швидкість подачі води – 5,5 м/год, продуктивність – 5,640 дм<sup>3</sup>/год доочищеної води. Фільтрат відбирали щогодини.

Таблиця 5.1 – Ступінь видалення мікроорганізмів з води

Фільтрування через кварцовий пісок			Фільтрування через КАВ		
Вихідна концентрація, КУО/см <sup>3</sup>	Концентрація у фільтраті, КУО/см <sup>3</sup>		Вихідна концентрація, КУО/см <sup>3</sup>	Концентрація у фільтраті, КУО/см <sup>3</sup>	
	1 година	5 годин		1 година	5 годин
<b><i>Escherichia coli</i></b>					
Концентрація ДБ-45 – 0,5 мг/дм <sup>3</sup>					
1,1·10 <sup>2</sup>	0	0	1,4·10 <sup>2</sup>	0	0
7,7·10 <sup>3</sup>	311	300	4·10 <sup>3</sup>	88	140
Концентрація ДБ-45 – 1 мг/дм <sup>3</sup>					
4,1·10 <sup>3</sup>	0	0	5·10 <sup>3</sup>	0	0
3,9·10 <sup>4</sup>	70	378	2,2·10 <sup>4</sup>	10	100
5,4·10 <sup>5</sup>	200	2000	1·10 <sup>5</sup>	20	8400
<b><i>Candida albicans</i></b>					
Концентрація ДБ-45 – 0,5 мг/дм <sup>3</sup>					
1·10 <sup>2</sup>	0	0	7·10 <sup>2</sup>	0	0
1,2·10 <sup>3</sup>	4	4	1·10 <sup>3</sup>	0	0
2,5·10 <sup>4</sup>	133	143	1,2·10 <sup>4</sup>	5	34
Концентрація ДБ-45 – 1 мг/дм <sup>3</sup>					
1,5·10 <sup>3</sup>	0	0	1,5·10 <sup>3</sup>	0	0
2,6·10 <sup>4</sup>	23	96	2·10 <sup>4</sup>	2	7
1·10 <sup>5</sup>	300	1200	1·10 <sup>5</sup>	45	650

У процесі доочищення води за допомогою контактано-флокуляційної установки встановлено, що ступінь видалення мікроорганізмів з води залежить від вихідної їх концентрації, а також концентрації флокулянту. Так, повне видалення культур *Escherichia coli* та *Candida albicans* при їх вихідній концентрації 1·10<sup>2</sup> КУО/см<sup>3</sup> досягається при концентрації флокулянту ДБ-45 0,5 мг/дм<sup>3</sup>; якщо концентрація культур збільшується до 1·10<sup>3</sup> КУО/см<sup>3</sup>, то концентрація флокулянту, яка забезпечує повне видалення культур, становить 1 мг/дм<sup>3</sup>. Як фільтруючий матеріал активоване вугілля краще проявило себе ніж кварцовий пісок у процесі доочищення, це пов'язано з тим, що активоване вугілля

має більшу поверхню за рахунок пористості. Так при доочищенні води від дріжджоподібних грибів активоване вугілля затримувало клітини *Candida albicans* на один порядок більше у порівнянні з кварцовим піском. Однак, у випадку доочищення води від клітин *Escherichia coli* різниця за результатами між цими фільтруючими матеріалами не суттєво велика, тому можна рекомендувати використовувати як кварцовий пісок, так і активоване вугілля.

Для дослідження подовженості фільтроциклу, через контактнo-флокуляційну колонку пропускали воду, контаміновану життєздатними некультурабельними клітинами *Escherichia coli* у концентрації  $1,1 \cdot 10^2 - 6 \cdot 10^2$  КУО/см<sup>3</sup>, чи *Candida albicans* –  $3 \cdot 10^2 - 5 \cdot 10^2$  КУО/см<sup>3</sup>. В якості зернистого завантаження слугував кварцовий пісок. Концентрація катіонного флокулянту ДБ-45 становила 0,5 мг/дм<sup>3</sup> (табл. 5.2). Фільтрат відбирали щогодини. Фільтрування здійснювали до проскоку клітин культури.

Таблиця 5.2 – Визначення подовженості фільтроциклу контактнo-флокуляційної колонки

Час фільтрування, години	Культура	Вихідна концентрація, КУО/см <sup>3</sup>	Об'єм пропущеної води, дм <sup>3</sup>	Концентрація у фільтраті, КУО/см <sup>3</sup>
20	<i>Escherichia coli</i>	$1,1 \cdot 10^2 - 6 \cdot 10^2$	112	0
10	<i>Candida albicans</i>	$3 \cdot 10^2 - 5 \cdot 10^2$	56	0

Встановлено, що період фільтрациклу при очищенні води від бактеріальних клітин *Escherichia coli* при продуктивності фільтрування  $\approx 5,6$  дм<sup>3</sup>/год становить 20 годин, тоді як повне вилучення з води дріжджоподібних грибів *Candida albicans* триває до 10 годин. Різниця у величинах об'ємів розчинів до проскоку в фільтрат клітин *Escherichia coli* та *Candida albicans* обумовлена тим, що сорбційно-адгезійна взаємодія більш великих за розміром клітин *Candida albicans* з фільтруючим завантаженням швидше призводить до максимально можливого заповнення порозного простору завантаження і доступної зовнішньої його

поверхні. Внаслідок цього суттєво зростає опір фільтрування і необхідне зворотне промивання фільтру.

Отриману доочищену воду піддавали рекультивації в поживному середовищі М-9. В результаті, у процесі культивування на агаризованому диференційно-діагностичному середовищі Ендо чи Сабуро не було виявлено клітин культур *Escherichia coli* та *Candida albicans*. Це свідчить про повне видалення із питної води всіх мікроорганізмів, у тому числі й у можливому життєздатному некультурабельному стані.

По завершенню кожного експерименту застосовували зворотне промивання контактано-флокуляційного фільтру. Інтенсивність промивання фільтру становить  $12 \text{ дм}^3/(\text{с}\cdot\text{м}^2)$ . Вся витрата промивної води при тривалості промивки 5 хв становить  $3,5 \text{ дм}^3$ .

В Інституті колоїдної хімії та хімії води здійснено дослідження на токсичність отриманих водних зразків методами біотестування.

Біотестування проводили на тест-організмах гідробіонтах, таких як церіодафнії (*Ceriodaphnia affinis* – представник безхребетних нижчих ракоподібних), широко використовуваних в біотестуванні води, являється найчутливішим до токсинів тест-організмом серед гідробіонтів. Критерієм гострої токсичності служить смертність тест-організмів в досліджуваному водному середовищі протягом 48-96 год [133].

Згідно ДСТУ 41-74: 2003, якщо виживаність церіодафнії складає  $< 50\%$ , то має місце гостра токсичність даної проби води, якщо виживаність церіодафнії знаходиться в межах  $50-90\%$ , то має місце бути відмічена хронічна токсичність даної проби води [134].

Тестуванню піддавали наступні зразки води (табл. 5.3):

№1 – вихідну водопровідну воду;

№2 – воду, доочищену на контактано-флокуляційній установці;

№3 – промивну воду.

Таблиця 5.3 – Дослідження токсичності водних зразків методами біотестування з використанням церіодафнії відповідно до ДСТУ 41-74: 2003

Час експозиції	Кількість виживших/загиблих особин			
	Контроль	№1 Вихідна водопровідна вода	№2 Вода, доочищена на контактнo-флокуляційній установці	№3 Промивна вода
24 год.	10/0	8/2	10/0	10/0
72 год.	10/0	8/2	10/0	9/1
96 год.	10/0	8/2	10/0	7/3
Вживаність	100%	80%*	100%	70%*

*\* $p < 0,05$  достовірність відмінностей груп порівняння з контролем*

Результати досліджень показали, що у водах №1 та №3 встановлено хронічну токсичність (вживаність церіодафнії складає 80% та 70%, відповідно). У воді №2 не встановлено токсичність (вживаність церіодафнії складає 100%) (Додаток №1). Тобто, біотестування на церіодафніях показало, що воду, доочищену на контактнo-флокуляційній установці, можна використовувати як питну, а вихідну водопровідну воду та промивну воду – у побутових потребах.

Також, в Інституті колоїдної хімії та хімії води проведено аналіз зразків води за органолептичними, токсикологічними та хімічними показниками якості питної води.

Тестуванню піддавали наступні зразки води (табл. 5.4):

№1 – вихідну водопровідну воду;

№2 – воду, доочищену на контактнo-флокуляційній установці.

Результати досліджень показали, що всі показники за двома аналізованими зразками води не перевищують нормативних величин і відповідають нормам відповідно ДСТУ 7527:2014 «Вода питна. Вимоги та методи контролювання якості».



Таблиця 5.4 – Аналіз зразків води №1 – вихідної водопровідної води та №2 – води, доочищеної на контактано-флокуляційній установці за органолептичними, токсикологічними та хімічними показниками якості питної води відповідно до ДСТУ 7527:2014

Назва показника	Одиниці вимірювання	Норматив, не більше ніж		Зразки води	
		Вода систем централізованого питного водопостачання	Вода нецентралізованого водопостачання (нефасована, фасована)	№1	№2
Кольоровість	Градуси	20	5	< 2	< 2
Каламутність	НОК	1,0	0,5	< 0,3	< 0,3
Запах за 20 °С	бали	2	0	0	0
Запах за 60 °С	бали	2	1	0	0
Хлор залишковий вільний	мг/дм <sup>3</sup>	0,5	Відсутність	<0,03	<0,03
Хлор залишковий зв'язаний	мг/дм <sup>3</sup>	1,2	Відсутність	<0,03	<0,03
Водневий показник	рН	6,5-8,5	6,5-8,5	7,01	7,26
Сухий залишок	мг/дм <sup>3</sup>	1000	200-500	285	333
Жорсткість	ммоль/дм <sup>3</sup>	7	1,5-7	3,7	3,7
Лужність	ммоль/дм <sup>3</sup>	Не визначають	0,5-6,5	1,8	1,6
Сульфати	мг/дм <sup>3</sup>	250	150	79,2	86,4
Хлориди	мг/дм <sup>3</sup>	250	150	25,6	25,6
Залізо загальне (Fe)	мг/дм <sup>3</sup>	0,2	Відсутність	0,16	<0,005
Калій (K)	мг/дм <sup>3</sup>	Не визначають	2-20	3,26	3,40
Натрій (Na)	мг/дм <sup>3</sup>	200	2-20	8,09	8,59
Цинк (Zn)	мг/дм <sup>3</sup>	1	Відсутність	0,52	0,20
Кальцій (Ca)	мг/дм <sup>3</sup>	Не визначають	25-75	56	56
Магній (Mg)	мг/дм <sup>3</sup>	Не визначають	10-50	10,8	10,8
<b>ДБ-45</b>	<b>мг/дм<sup>3</sup></b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>&lt; 0,1</b>	<b>&lt; 0,1</b>

Окремо протестовано води після промивки контактано-флокуляційного фільтру на наявність забруднюючих речовин (таблиця 5.5).

Таблиця 5.5 – Аналіз забруднюючих речовин у водах, що з'явилися після промивки фільтру, які скидаються до міської каналізації

№ з/п	Показники якості стічних вод	Одиниця виміру	Допустима концентрація	Зразок води
1.	Сухий залишок	г/м <sup>3</sup>	1000	313
2.	Сульфати	г/м <sup>3</sup>	380	81,6
3.	Хлориди	г/м <sup>3</sup>	240	25,6
4.	Амоній (азот амонійний, аміак)	г/м <sup>3</sup>	20,0	0,26
5.	Нітрити	г/м <sup>3</sup>	3,3	0,005
6.	Алюміній	г/м <sup>3</sup>	2,72	0,23
7.	Залізо (загальне)	г/м <sup>3</sup>	2,0	0,16
8.	Кадмій	г/м <sup>3</sup>	0,05	≤0,05
9.	Марганець	г/м <sup>3</sup>	0,68	0,037
10.	Мідь	г/м <sup>3</sup>	0,3	0,006
11.	Нікель	г/м <sup>3</sup>	0,6	0,0008
12.	Свинець	г/м <sup>3</sup>	0,1	0,0008
13.	Срібло	г/м <sup>3</sup>	0,05	≤0,05
14.	Цинк	г/м <sup>3</sup>	0,9	0,9
15.	Жири рослинні та тваринні	г/м <sup>3</sup>	50	0
16.	рН	одиниць рН	6,5 - 9,0	6,6

Промивні води повністю відповідають вимогам приймання стічних вод підприємств у систему каналізації м. Києва (затверджені Київською міською державною адміністрацією від 12.10.2011 №1879) і не несуть небезпеки. Концентрація флокулянту ДБ-45 у промивних водах нижча за гранично допустимі концентрації у воді, що становлять 0,1 мг/дм<sup>3</sup>. Це дозволяє відводити промивну воду, без попередньої обробки, в каналізаційну мережу міста.

Отже, перевага використання контактної флокуляції полягає в тому, що її застосування призводить не лише до повного вилучення з води широкого спектру мікроорганізмів, в тому числі і тих, що перебувають в життєздатному некультурабельному стані, а й до повної їх інактивації за рахунок наявності амонійних груп у структурі флокулянта, що спричиняє руйнівні процеси в клітині мікроорганізму, які призводять до розриву мембрани клітини, блокуванню дихальної системи та врешті решт до загибелі мікроорганізму. Зернисті сорбенти,

в свою чергу, затримують флокулянт, що містить інактивовані клітини мікроорганізмів.

Застосування контактної флокуляції не лише сприяє ефективному доочищенню води, а полегшує процес очищення зернистого завантаження від адсорбованих на його поверхні як флокулянту, так і мікроорганізмів, за рахунок нейтралізації позитивного заряду флокулянта, при його взаємодії з клітиною мікроорганізму. Таким чином зменшується сила зв'язування частинок флокулянту з адсорбованими на них мікроорганізмами з поверхнею самого зернистого завантаження.

Нами вперше запропоновано надійний, простий в реалізації спосіб видалення життєздатних некультурабельних мікроорганізмів, що забезпечує одержання високоякісної питної води, яка є безпечною для споживання. Слід відмітити, що реалізація запропонованого способу здійснюється з використанням недорогих та доступних реагентів.

Акт впровадження розробленого способу в лабораторії мікробіології, мікології та вірусології Інституту урології АМН України, з рекомендованими технологічними параметрами доочищення питної води від мікроорганізмів, що перебувають в життєздатному некультурабельному стані, наведено в додатку А.

### **5.5 Математичні моделі процесів доочищення вихідної води**

У процесі проведення досліджень температура та швидкість фільтрування води підтримувалися постійними, тобто ці фактори перебували на одному рівні. Змінювалися в процесі досліджень вихідна концентрація культури у воді, що йде на доочищення, тривалість фільтрування, концентрація флокулянту, що становила 0, 0,5 і 1 мг/дм<sup>3</sup> та завантаження фільтру (кварцовий пісок, або активоване вугілля).

Так як, якість вихідної води постійно змінювалась, для отримання об'єктивних результатів було використано показники ефективності доочищення води ( $C_e$ ).

$$C_e = \frac{C_e - C_{\phi}}{C_e} \cdot 100\% \quad (5.1)$$

де  $C_B$  – вихідна концентрація культури у воді, що йде на доочищення, КУО/см<sup>3</sup>;  $C_{\phi}$  – концентрація флокулянту, мг/дм<sup>3</sup>.

Ефективність доочищення води у наших дослідах ми розглядаємо як функцією: вихідної концентрації культури у воді, що йде на доочищення, тривалості фільтрування, концентрації флокулянту, завантаження фільтру (кварцовий пісок або активоване вугілля), відповідно до формули (5.2).

$$C_e = f(C_B, T, C_{\phi}, Z) \quad (5.2)$$

де  $C_e$  – ефективність доочищення води, %;  $C_B$  – вихідна концентрація культури у воді, що йде на доочищення, КУО/см<sup>3</sup>;  $T$  – тривалість фільтрування, год;  $C_{\phi}$  – концентрація флокулянту, мг/дм<sup>3</sup>;  $Z$  – завантаження фільтру (кварцовий пісок або активоване вугілля).

Для опису процесу доочищення води було побудовано емпіричні моделі:

1) Модель, що описує ефективність доочищення вихідної води від культури *Escherichia coli* і враховує тривалість фільтрування, дозу флокулянту, в якості фільтрувального завантаження – кварцовий пісок (5.3);

$$C_{e.п} = 124,2560 + 24,5672 \cdot \lg(C_{\phi.п}) - 8,8854 \cdot \lg(C_{B.п}) + \\ + 0,0019 \cdot C_{B.п} - 0,00001 \cdot C_{B.п}^3 - 0,0037 \cdot T_{п}^3 + 0,1234 \cdot T_{п} \quad (5.3)$$

де  $C_{e.п}$  – ефективність доочищення води на піщаному завантаженні фільтру, %;  $C_{B.п}$  – вихідна концентрація культури *Escherichia coli* у воді, що йде на доочищення, КУО/см<sup>3</sup>;  $T_{п}$  – тривалість фільтрування через піщане завантаження фільтру, год;  $C_{\phi.п}$  – концентрація флокулянту, що подається на піщане завантаження, мг/дм<sup>3</sup>.

Модель має наступні характеристики: коефіцієнт кореляції  $R=0,9642$ , коефіцієнт детермінації  $R^2=0,9296$ ,  $p<0,005$ .

2) Модель, що описує ефективність доочищення вихідної води від культури *Escherichiacoli* і враховує тривалість фільтрування, дозу флокулянту, в якості фільтрувального завантаження – активоване вугілля (5.4);

$$C_{e,ав} = 102,3841 - 0,00001 \cdot C_{в,ав}^3 + 2,6269 \cdot C_{ф,ав}^3 - 0,0076 \cdot T_{ав}^3 - 1,4326 \cdot \lg(C_{в,ав}) + 0,0001 \cdot (C_{в,ав}) \quad (5.4)$$

де  $C_{e,ав}$  – ефективність доочищення води на вугільному завантаженні фільтру, %;  $C_{в,ав}$  – вихідна концентрація культури *Escherichia coli* у воді, що йде на доочищення, КУО/см<sup>3</sup>;  $T_{ав}$  – тривалість фільтрування через вугільне завантаження фільтру, год;  $C_{ф,ав}$  – концентрація флокулянту, що подається на вугільне завантаження, мг/дм<sup>3</sup>.

Модель має наступні характеристики: коефіцієнт кореляції  $R=0,7031$ , коефіцієнт детермінації  $R^2=0,4943$ ,  $p<0,00068$ .

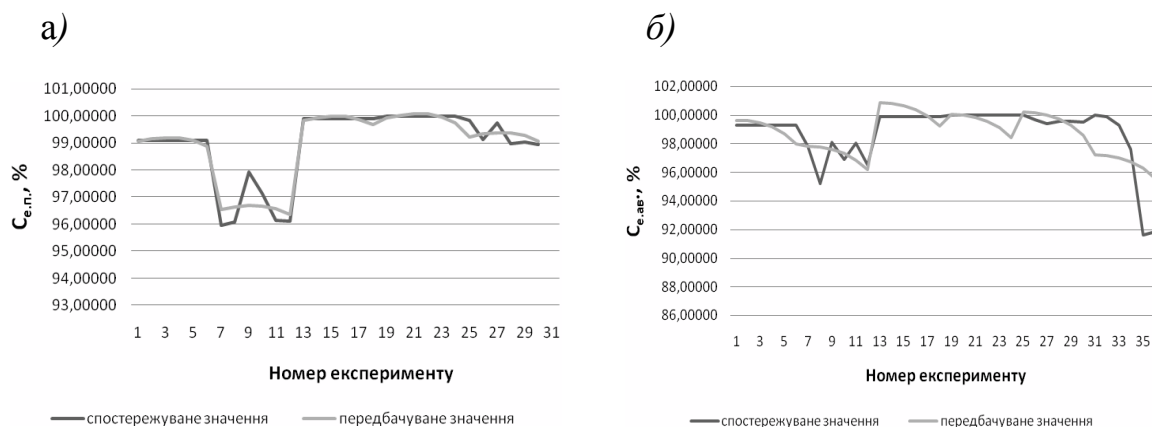


Рисунок 5.16 – Порівняння ефекту доочищення вихідної води від культури *Escherichia coli*: а) на кварцовому піску, б) на активованому вугіллі, що спостерігалось в процесі експериментів і було промодельоване за допомогою рівняння (5.3) та (5.4), відповідно

Зниження ефективності доочищення води спостерігалось у випадках відсутності флокулянту, а також при недостатній його дозі при збільшенні концентрації культури у вихідній воді, що подавалась на доочищення від бактеріальної культури *Escherichia coli*.

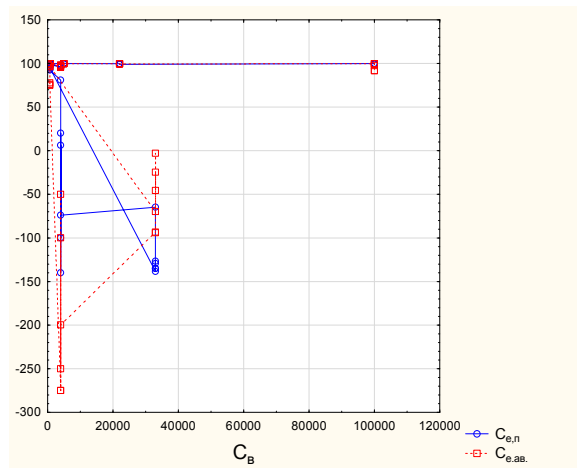


Рисунок 5.17 – Порівняння ефективності доочищення вихідної води від *Escherichia coli* на піщаному фільтрувальному завантаженні і завантаженні з активованого вугілля

3) Модель, що описує ефективність доочищення вихідної води від культури *Candida albicans* і враховує тривалість фільтрування, дозу флокулянту, в якості фільтрувального завантаження – кварцовий пісок (5.5);

$$C_e = 88,9879 + 0,00001 \cdot C_{в.п.} + 10,586 \cdot T_{п.} - 12,9573 \cdot C_{ф.п.} - 0,0304 \cdot \sqrt{C_{в.п.}} - 36,742 \cdot \sqrt{T_{п.}} + 61,759 \cdot \sqrt{C_{ф.п.}} \quad (5.5)$$

де  $C_{е.п}$  – ефективність доочищення води на піщаному завантаженні фільтру, %;  $C_{в.п.}$  – вихідна концентрація культури *Candida albicans* у воді, що йде на доочищення, КУО/см<sup>3</sup>;  $T_{п.}$  – тривалість фільтрування через піщане завантаження фільтру, год;  $C_{ф.п.}$  – концентрація флокулянту, що подається на піщане завантаження, мг/дм<sup>3</sup>.

Модель має наступні характеристики: коефіцієнт кореляції  $R=0,9672$ , коефіцієнт детермінації  $R^2=0,936$ ,  $p<0,005$ .

4) Модель, що описує ефективність доочищення вихідної води від культури *Candida albicans* і враховує тривалість фільтрування, дозу флокулянту, в якості фільтрувального завантаження – активоване вугілля (5.6).

$$C_e = 100,0719 - 0,000004 \cdot C_{в.ав} - 0,1948 \cdot \lg(T_{ав}) + 0,3384 \cdot \lg(C_{ф.ав}) \quad (5.6)$$

де  $C_{e,ав}$  – ефективність доочищення води на вугільному завантаженні фільтру, %;  $C_{в,ав}$  – вихідна концентрація культури *Candida albicans* у воді, що йде на доочищення, КУО/см<sup>3</sup>;  $T_{ав}$  – тривалість фільтрування через вугільне завантаження фільтру, год;  $C_{ф,ав}$  – концентрація флокулянту, що подається на вугільне завантаження, мг/дм<sup>3</sup>.

Модель має наступні характеристики: коефіцієнт кореляції  $R=0,8089$ , коефіцієнт детермінації  $R^2=0,6543$ ,  $p<0,005$ .

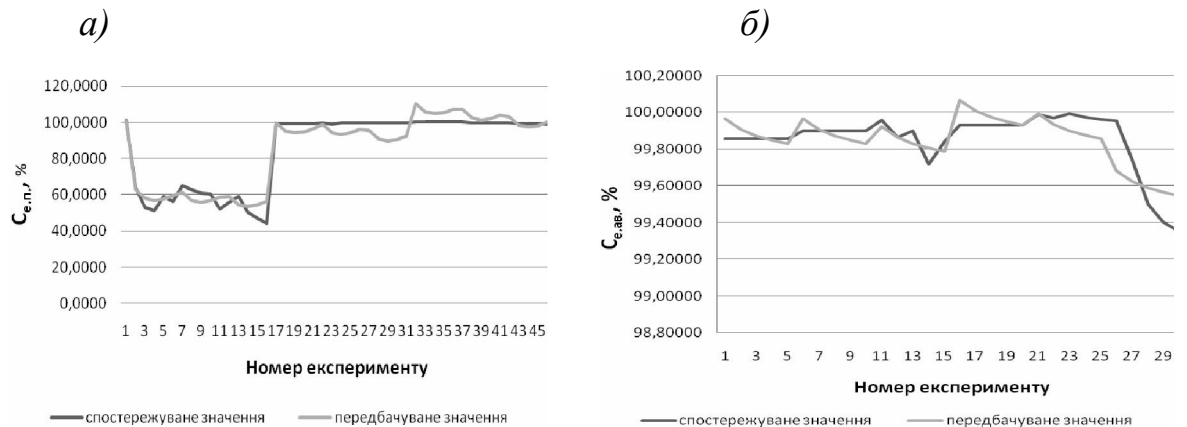


Рисунок 5.18 – Порівняння ефекту доочищення вихідної води від *Candida albicans*: а) на кварцовому піску, б) на активованому вугіллі, що спостерігалось в процесі експериментів і було промодельоване за допомогою рівняння (5.5) та (5.6), відповідно

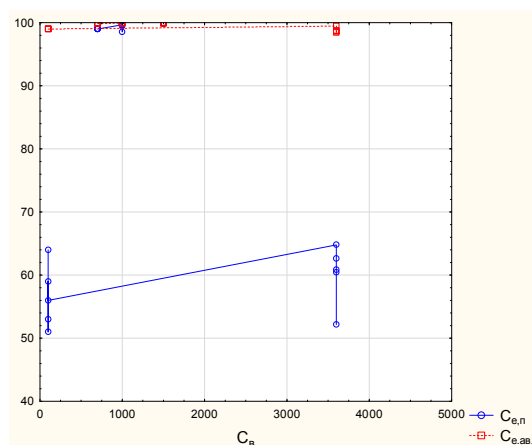


Рисунок 5.19 – Порівняння ефективності доочищення вихідної води від *Candida albicans* на піщаному фільтрувальному завантаженні і завантаженні з активованого вугілля

З даної діаграми видно, що фільтруюче завантаження – активоване вугілля краще затримує дріжджоподібні клітини *Candida albicans* ніж кварцовий пісок, це пов'язано з розміром клітин дріжджоподібних грибів (до 5 мкм), що в свою чергу сприяє їх кращій затримці на поверхні зернистого завантаження і збільшує час взаємодії з флокулянтном.

Вдалося побудувати емпіричні моделі, що з задовільною достовірністю і значимістю описують ефективність процесу видалення у вихідній воді мікробних культур *Escherichia coli* та *Candida albicans* на піщаному і вугільному фільтрувальному завантаженні з врахуванням дози флокулянту та тривалості фільтрування. Дані моделі будуть достовірні у межах  $C_v$  від  $1 \cdot 10^2$  до  $5,4 \cdot 10^5$  КУО/см<sup>3</sup>, тривалість фільтрування від 0-5 год. У процесі аналізу результатів моделювання встановлено, що ефективність затримання *Escherichia coli* як на фільтруючому завантаженні кварцовий пісок так і активоване вугілля однакова і дорівнює 78-95 %. В той же час затримання клітин *Candida albicans* на фільтруючому завантаженні активованого вугілля відчутно краще – 98-99,8% порівняно з 90- 92 % на піщаному фільтруючому завантаженні, в залежності від дози флокулянту.

## **5.6 Розрахунок технологічного обладнання контактнo-флокуляційно фільтру індивідуального користування**

Така контактнo-флокуляційна установка може бути використаний для доочищення від життєздатних некультурабельних мікроорганізмів водопровідної води, що надходить для водопостачання невеликих підприємств (лікарень, їдалень, поліклінік та ін.)

Технологічну схему контактнo-флокуляційної установки індивідуального користування наведено на рис. 5.20.

Вихідна водопровідна вода подається на установку по трубопроводу (1) і через ротаметр (2) надходить на контактнo-флокуляційний фільтр (3). Пройшовши завантаження фільтру зверху вниз, вода доочищується, надходить до



збірника очищеної води (9) і використовується на підприємстві. Необхідна кількість флокулянту розчиняється в розчиннику флокулянту (6'), куди подається водопровідна вода. Розчин флокулянту зливається в ємність (6), що складається з двох камер, в яких водопровідною водою доводиться до необхідної концентрації і насосом-дозатором (4) через ротаметр (5) подається у воду, що надходить на контактнo-флокуляційний фільтр. Для очищення завантаження фільтра від забруднень в нього з водопровідної мережі через ротаметр (7) надходить вода. Відпрацьована забруднена вода по лінії відводу промивної води (10) відводиться в каналізаційну мережу або збирається в збірнику промивної води (11), куди після закінчення промивки фільтра подається хлорвмісний розчин з його збірника (12). Після годинного контакту з хлорвмісним розчином відпрацьована промивна вода в залежності від вимог щодо захисту навколишнього середовища скидається в каналізацію або відводиться на поля зрошення, або ін.

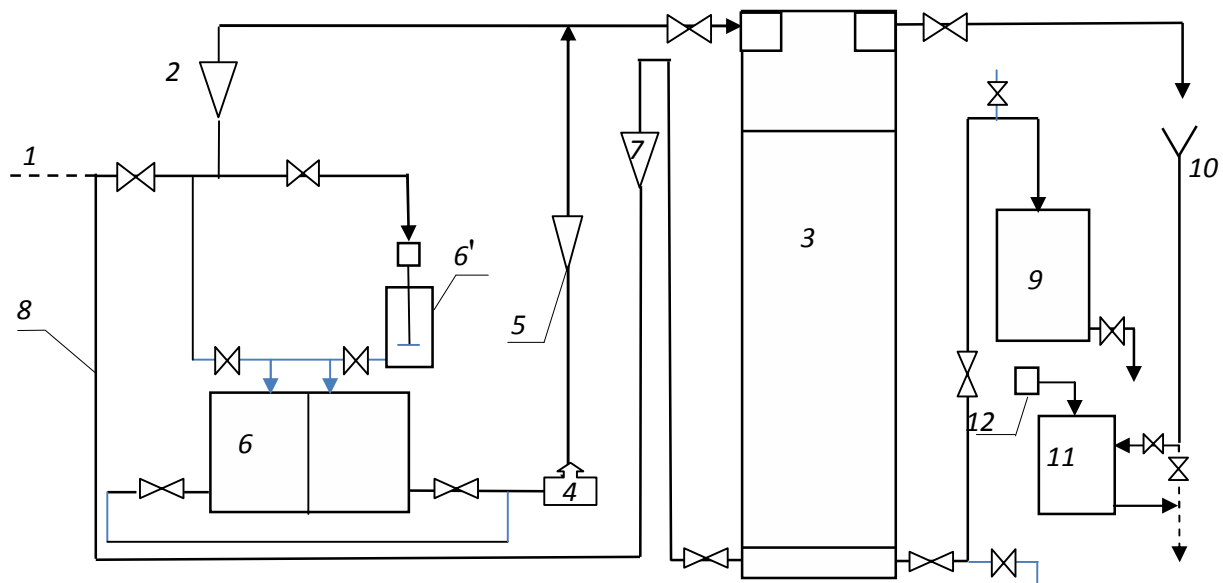


Рисунок 5.20 – Технологічна схема контактнo-флокуляційної установки індивідуального користування

Приймаємо продуктивність установки  $100 \text{ дм}^3$  на зміну. Вважаємо, що фільтр буде працювати в добу тільки одну зміну.

**Фільтр.** Робоча тривалість роботи фільтра дорівнює 7 годин і одна година витрачається на обслуговування фільтра, тобто на промивку, збір промивної води та її знезараження, періодичне знезараження всієї системи установки. Годинна

продуктивність фільтру складе  $Q = 14,28 \text{ дм}^3/\text{год}$ . Приймаємо стандартну швидкість фільтрування:  $V_{\text{рн}} = 5,5 \text{ м/год}$ . Площа фільтру обчислюється за формулою:  $S = Q / V_{\text{рн}} = \frac{14 \cdot 0,001}{5,5} = 0,0025 \text{ м}^2 (25 \text{ см}^2)$

$$\text{Діаметр фільтру буде дорівнювати: } D = \sqrt{\frac{4 \cdot S}{\pi}} = \sqrt{\frac{4 \cdot 0,0025}{3,14}} = \sqrt{\frac{4 \cdot 25}{3,14}} = \sqrt{32} = 5,7 \text{ см.}$$

Висота завантаження фільтру (кварцовий пісок з еквівалентним діаметром частинок 0,7-0,8 мм) дорівнює – 700 мм. Величина відносного розширення шару завантаження складе 45%, загальна висота шару при промиванні складе 1015 мм. Робимо запас 100 мм висоти над лімітованим шаром води при промивці завантаження. Загальна висота фільтру дорівнює 1115 мм. Матеріал, з якого виготовляють фільтр, повинен бути корозійно стійким і дозволений держконтролем для використання в побутових пристроях. Діаметр робочих трубопроводів, що подають і відводять від фільтру воду, приймаємо ½ дюйма.

Фільтр повинен бути забезпечений манометром для контролю підвищення тиску в фільтрі за рахунок забруднення його завантаження і вчасного виведення його на промивку. Інтенсивність промивання фільтру становить  $12 \text{ дм}^3/(\text{с} \cdot \text{м}^2)$ . Тривалість промивання – 5 хвилин. Витрата промивної води дорівнює:  $q_{\text{пр}} = V \cdot S = 12 \text{ дм}^3/(\text{с} \cdot \text{м}^2) \cdot 25 \text{ см}^2 \cdot 0,0001 = 0,030 \text{ дм}^3/\text{с}$ .

Вся витрата промивної води при тривалості промивки 5 хв (300 с) буде дорівнювати:  $Q_{\text{пр}} = 0,030 \cdot 300 = 9 \text{ дм}^3$ .

**Флокулювання.** Приймаємо для використання флокулянт полідиалілдиметиламоній хлорид (ДБ-45). Доза флокулянту  $d = 0,5 \text{ мг/дм}^3$ . Витрата флокулянту ( $w$ ) за 1 годину роботи буде дорівнювати:

$$w = Q \cdot d = 14,28 \cdot 0,5 = 7,14 \text{ мг.}$$

При витраті розчину флокулянту (подача насоса-дозатора (4))  $0,5 \text{ дм}^3/\text{год}$  концентрація флокулянту в бачку повинна бути рівною  $14,28 \text{ мг/дм}^3$ .

$$7,14 \text{ мг} - 0,5 \text{ л/год}$$

$$x \quad - \quad 1$$

$$x = 14,28 \text{ мг/дм}^3.$$

Кількість розчину флокулянту, що подається з бака при роботі протягом 7 годин, складе  $0,5 \cdot 7 = 3,5 \text{ дм}^3$ .

Добова витрата флокулянту буде дорівнювати:

$$w \cdot 7 = 7,14 \cdot 7 = 49,98 (\approx 50 \text{ мг}).$$

Приймаємо об'єм однієї камери бачка з розчином флокулянту (6) рівний 5 л. Кількість флокулянту для  $5 \text{ дм}^3$  води:

$$w = Q \cdot V = 14,28 \cdot 5 = 71,4 \text{ мг}.$$

Добова витрата розчину флокулянту складе  $0,5 \cdot 7 = 3,5 \text{ дм}^3$ , для цього в  $3,5 \text{ дм}^3$  води необхідно буде розчинити  $(14,28 \text{ мг} \cdot 3,5) = 50 \text{ мг}$  порошку флокулянту. Для зручності експлуатації установки бачок з розчином флокулянту може бути виготовлений з 2-х відділень (2-х камер) місткістю по  $5 \text{ дм}^3$  кожен. Щоб порошок флокулянту швидко розчинявся можна використовувати розчинник флокулянту (6') місткістю до  $1,5 \text{ дм}^3$  та забезпеченого механічною мішалкою.

**Збірник очищеної води (9).** Місткість збірника очищеної води вибирається на вимогу замовника, але повинна бути рівною не менш  $70 \text{ дм}^3$ . У збірнику встановлюється запобіжний клапан для запобігання надходження очищеної води після його повного заповнення.

**Збірник відпрацьованої промивної води (11).** Місткість збірника промивної води повинна бути рівною за обсягом для збору промивної води та розчину хлорвмісного окислювача, тобто приблизно  $12 \text{ дм}^3$ . Збірник повинен бути закритий, мати механічну мішалку і виготовлений з хлоркорозіоно стійкого матеріалу. Подача активного хлорвмісного матеріалу до збірника необхідна для знезараження мікроорганізмів. Як хлорокисник можна використовувати препарати, що містять активний хлор – гіпохлорит калію або натрію, хлорне вапно, оксид хлору та інші. Збірник повинен бути забезпечений механічною мішалкою. Доза окислювача зазвичай має концентрацію  $3\text{-}5 \text{ мг/дм}^3$ . Час контакту з водою  $30 \text{ хв}$  після перемішування. Відводиться відпрацьована вода зазвичай в місця скидання місцевих стічних вод. Дозу окислювача підбирають зазвичай дослідним шляхом.

## ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 5

Запропоновано надійний та простий спосіб доочищення питної води від мікроорганізмів, що перебувають в життєздатному некультурабельному стані. Спосіб реалізується шляхом подачі на поверхню завантаження одночасно флокулянта і контамінованої мікроорганізмами води, тобто шляхом використання контактної флокуляції. При цьому як флокулянт використовували катіонний флокулянт полідіалілдиметиламоній хлорид (ДБ-45), а як завантаження – кварцовий пісок, або мезопористе кісточкове активоване вугілля.

Показано, що вода, доочищена на контактано-флокуляційній установці згідно з результатами отриманими методом біотестування та за органолептичними, токсикологічними та хімічними показниками якості питної води не містить шкідливих домішок і не є токсичною.

Запропоновано технологічну схему контактано-флокуляційної установки, що може бути використана для доочищення від ряду мікроорганізмів та життєздатних некультурабельних мікроорганізмів водопровідної води, що надходить для водопостачання невеликих підприємств (лікарень, їдалень, поліклінік та ін.)

## ВИСНОВКИ

У дисертації вирішена важлива задача щодо очищення питної води від мікроорганізмів, які перебувають у життєздатному некультурабельному стані шляхом розробки технології для їх знешкодження та глибокого вилучення при застосуванні нових підходів оцінки та контролю якості води.

Проведені дослідження дозволяють зробити наступні висновки:

1. Встановлено, що при застосуванні найбільш вживаного знезаражуючого агента – гіпохлориту натрію (NaOCl) в концентраціях 2-3 мг/дм<sup>3</sup> деякі клітин культури *E. coli* переходять в ЖНС та не визначаються загальноприйнятими методами, проте при попаданні в оптимальні умови існування здатні повертатися в культурабельний стан вже через добу. Додаткове використання живильного середовища М-9 сприяє більш швидкому відновленню і росту бактеріальних клітин *E. coli*. Оптимальна температура відновлення клітин *E. coli* – 37 °С, а час термостатування – 24 години.
2. Встановлено, що *C. albicans* при взаємодії з NaOCl в концентрації 5 мг/дм<sup>3</sup> здатна переходити в життєздатний некультурабельний стан і за оптимальних умов зростання (рекультивація в рідкому поживному середовищі М-9) відновлюватися до нормального культурабельного стану. Оптимальна температура відновлення клітин *C. albicans* – 27 і 37 °С, а час термостатування – 48 і 24 годин, відповідно.
3. Розроблено метод виявлення у питній воді мікроорганізмів, що перебувають у життєздатному некультурабельному стані. Метод базується на рекультивації клітин, які перебувають в життєздатному некультурабельному стані, у рідкому поживному сольовому середовищі М-9 з подальшою їх культивуванням на традиційному агаровому диференційно-діагностичному поживному середовищі (патент України № 113472). Даний спосіб покладено в основу створення державного нормативного документу (ДСТУ) щодо виявлення життєздатних некультурабельних мікроорганізмів у воді.

4. Вперше проведено порівняльну оцінку класичних методів мікробіологічного та мікологічного аналізу із запропонованим методом, що дозволяє виявляти мікроорганізми, які перебувають в життєздатному некультурабельному стані при аналізі водопровідної води та води з бюветів м. Києва. Встановлено, що аналіз зразків води запропонованим методом дає можливість підвищити ефективність як якісного, так і кількісного виявлення мікроорганізмів, що перебувають в ЖНС, порівняно з класичним методом.
5. Запропоновано надійний та простий спосіб доочищення питної води від мікроорганізмів, що перебувають в життєздатному некультурабельному стані. Спосіб реалізується шляхом подачі на поверхню завантаження фільтру одночасно флокулянту і контамінованої мікроорганізмами води, тобто шляхом використання контактної флокуляції. При цьому як флокулянт використано катіонний флокулянт полідіалілдиметиламоній хлорид (ДБ-45), а як завантаження фільтру – кварцовий пісок, або мезопористе кісточкове активоване вугілля. Встановлено, що при швидкості фільтрування води 5,5 м/год з вихідним титром мікроорганізмів, які перебувають в ЖНС, –  $1 \cdot 10^2$  КУО/см<sup>3</sup> крізь кварцовий пісок або активоване вугілля, при продуктивності – 5,6 дм<sup>3</sup>/год та концентрації флокулянту – 0,5 мг/дм<sup>3</sup> спостерігається їх повне вилучення з води, а також інактивація на поверхні фільтру.
6. Показано, що вода, доочищена на контактано-флокуляційній установці, згідно з результатами, отриманими методом біотестування, та за органолептичними та хімічними показниками якості питної води, не містить шкідливих домішок і не є токсичною.
7. Високу ефективність розробленої технології вилучення з питної води мікроорганізмів, що перебувають в життєздатному некультурабельному стані, підтверджено випробуваннями, проведеними в лабораторії мікробіології, мікології та вірусології Інституту урології АМН України.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Прокопов В.О. Етіологічні, епідеміологічні та клінічні аспекти еволюції гострих кишкових інфекцій. *Інфекційні хвороби*. 1998. № 1. С.33–38.
2. Colwell R.R. Viable but non-culturable bacteria in the marine environment and the biotechnological tools to detect them. *BIOTECHNOLOGY*. 1996. Vol. IX. P. 220–233.
3. Liu Y., Gilchrist A., Zhang J. Detection of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 bacteria in drinking water and river water. *Appl. and Environ. Microbiol.* 2008. № 74(5). P. 1502–1507.
4. Aulet O., Silva C., Fraga S.G. et al. Detection of viable and viable nonculturable *Vibrio cholerae* O1 through cultures and immunofluorescence in the Tucumbn rivers, Argentina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2007. № 40. P. 385–390.
5. Saux M.F.-L., Hervio-Heath D., Loaec S., Colwell R.R., Pommeruy M. Detection of cytotoxin-hemolysin mRNA in nonculturable populations of environmental and clinical *Vibrio vulnificus* strains in artificial seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. № 68. P. 5641–5646.
6. Юдин И.П. Современные подходы к оценке жизнеспособности бактерий с акцентом на феномене некультурабельности. Доклады Института им. И. Мечникова. 2007. № 3. С. 8–16.
7. Дмитриев В.В., Сузина Н.Е., Баринова Е.С., Дуда В.Й., Боронин А.М. Электронно-микроскопическое изучение ультраструктуры микробных клеток *in situ* в экстремальных биотопах. *Микробиология*. 2004. № 73. С. 832–840 .
8. Cappelier J.M., Besnard V., Roche S., Garrec N., Zundel E., Velge P., Federighi M. Avirulence of viable but non-culturable *Listeria monocytogenes* cells demonstrated by *in vitro* and *in vivo* models. *Wat. Res.* 2005. V. 36, № 4. P. 589–599.
9. Haque M.M., Khan S.I., Ahsan C.R. Influence of Some Physicochemical Stresses on the Survival of *Vibrio cholerae* O1 at Non-Culturable State. *Bangladesh J. Microbiol.* 2007. № 24. P. 133–136.

10. Ramamurthy T., Ghosh A., Gururaja P. Pazhani and Sumio Shinoda. Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. *Frontiers in Public Health*. 2014. № 2:103. doi: 10.3389/fpubh.00103.
11. Li L., Mendis N., Trigui H., Oliver J.D. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiol.* 2014. № 5 (258). P. 1-20.
12. Rahman I., Shahamat M., Choudhury M.A.R., Colwell R.R. Potential virulence of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* Type I. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996. № 62. P. 115-120.
13. Signoretto C., Llet M.M., Canepari P. Modification of the peptidoglycan of *Escherichia coli* in the viable but nonculturable state. *Curr. Microbiol.* 2002. № 44. P. 125-131.
14. Maalej S., Gdoura R., Dukan S., Hammami A., Bouain A. Maintenance of pathogenesis during entry into and resuscitation from viable but nonculturable state in *Aeromonas hydrophila* exposed to natural seawater at low temperature. *Journal of Applied Microbiology*. 2004. № 97. P. 557–565 .
15. Vora G.J., Meador C.E., Bird M.M. et al. Microarray-based detection of genetic heterogeneity, antimicrobial resistance, and the viable but nonculturable state in human pathogenic *Vibrio spp.* *PNAS*. 2005. № 102. P. 19109–19114.
16. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Цитокины. – Возможные активаторы роста патогенных бактерий. *Вестник РАМН*. 2000. № 1. С. 3–18.
17. Тафельштейн Э.А., Голубинский Е.П., Марамович А.С. и др. Экспериментальное получение некультивируемых форм *Vibrio cholerae eltor* и характеристика их биологических свойств. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2004. № 1. С. 13–18.
18. Романова Ю.М., Чегаева Е.В., Гинцбург А.Л. Некультивируемое состояние у патогенных бактерий: известные и возможные факторы индукции обратимого процесса. *Молек. генет., микробиол. и вирусол.* 1998. №3. С. 3–8.



19. Dukan S., Levi Y., Touat D. Recovery of Culturability of an HOCl-Stressed Population of *Escherichia coli* after Incubation in Phosphate Buffer: Resuscitation or Regrowth? *Applied and Environmental Microbiology*. 1997. P. 4204–4209.
20. Oliver J.D. The Viable but Nonculturable State in Bacteria. *J. Microbiol.* 2005. V.43. P. 93–100.
21. Shenghua Zhang, Chengsong Ye, Huirong Lin, Lu Lv, and Xin Yu. UV Disinfection Induces a VBNC State in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Sci. Technol.* 2015. №49. P. 1721–1728.
22. Soina V.S., Mulyukin A.L., Demkina E.V., Vorobyova E.A., El-Registan G.I. The structure of resting bacterial populations in soil and subsoil permafrost. *Astrobiology*. 2004. № 4. P. 345–358.
23. Cunningham A.F., Spreadbury C.L. Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wallthickening and localization of the 16-kilodalton alpha-crystallin homolog. *J. Bacteriol.* 1998. V. 180. P. 801–808.
24. Дмитриев В.В., Сузина Н.Е., Русакова Т.Г., Гиличинский Д.А., Дуда В.И. Ультрасруктурные особенности природных форм микроорганизмов изолированных из грунтов вечной мерзлоты Восточной Сибири методом низко-температурного фракционирования. *Доклады Академии Наук*. 2001. № 378. P. 846–849.
25. Suzina N.E., Mulyukin A.L., Dmitriev V.V. et al. The structural bases of long-term anabiosis in non-spore-forming bacteria. *Advances in Space Research*. 2005. № 38. P. 1209–1219.
26. Черепнев Г.В., Велижинская Т.А., Яковлева Г.Ю., Дениварова Н.А., Куриненко Б.М. Оценка токсического действия 2,4,6–тринитротолуола на клетки *Escherichia coli* K12 методом проточной цитофлуориметрии. *Микробиология*. 2007. Т. 76. № 3. С. 377–382.
27. Мулюкин А.Л., Вахрушев М.А., Стражевская Н.Б. и со-авт. Влияние микробных аутоиндукторов анабиоза – алкилоксибензолов на структурную организацию ДНК *Pseudomonas aurantiaca* и индукцию фенотипической диссоциации. *Микробиология*. 2005. № 74. P. 157–165.

28. Эль-Регистан Г.И., Дуда В.И., Козлова А.Н., Митюшина Л.Л., Поплаухина О.Г. Изменение конструктивного метаболизма и ультраструктурной организации клеток *Bacillus cereus* под влиянием специфического ауторегуляторного фактора. *Микробиология*. 1979. № 48. Р. 240–244.
29. Мулюкин А.Л., Демкина Е.В., Козлова А.Н., Соина В.С., Эль-Регистан Г.И. Синтез аутоиндукторов анабиоза у неспорообразующих бактерий как механизм регуляции их активности в почве и подпочвенных осадочных породах. *Микробиология*. 2001. № 70. Р. 620–628.
30. Давыдова О.К., Дерябин Д.Г., Никиян А.Н., Эль-Регистан Г.И. О механизмах взаимодействия ДНК с химическими аналогами микробных аутоиндукторов анабиоза. *Микробиология*. 2005. № 74. Р. 616–625.
31. El-Registan G.I., Mulyukin A.L., Nikolaev Yu.A., et al. The role of low-molecular-weight autoregulatory factors (alkylhydroxybenzenes) in resistance to radiation and heat shock. *Advances in Space Research*. 2005. № 36. Р. 1718–1728.
32. Капрельянц А.С., Сулейменова М.И., Сорокина А.Д. и соавт. Структурно-функциональные изменения в бактериальных и модельных мембранах под действием фенольных липидов. *Биологические мембраны*. 1987. № 4. Р. 254–261.
33. Пахомов Ю.Д., Блинкова Л.П., Стоянова Л.Г. Роль некультивируемых форм неспорообразующих бактерий в поддержании гомеостаза популяции. *Имунопатология, аллергология, инфектология*. 2010. № 4. Р. 57–66.
34. Sinton L. Viable but non-culturable' bacteria – menace or myth? *New Zealand Water & Wastes Association Journal*. 2006. Vol. 143. Р. 31–38.
35. Воронкіна І.А. Деякі питання гострих кишкових інфекцій та мікроекології. *Анали Мечніковського Ін-ту*. 2006. № 3. С. 56–60.
36. Oliver J.D., Hite F., McDougald D., Andon N.L., Simpson L.M.. Entry into, and resuscitation from, the viable but nonculturable state by *Vibrio vulnificus* in an estuarine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. № 61. Р. 2624–2630.
37. Ayrapetyan M., Williams T.C., Oliver J.D. Interspecific quorum sensing mediates the resuscitation of viable but nonculturable vibrios. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. № 80(8). Р. 2478–2483.

38. Rigsbee W., Simpson L.M., Oliver J.D. Detection of the viable but nonculturable state in *Escherichia coli* 0157:H7. *Journal of Food Safety*. 1997. № 16. P. 255–262.
39. Liu Y., Wang C., Tyrrell G., Hrudehy S.E., Li X.F. Induction of *Escherichia coli* 0157:H7 into the viable but non-culturable state by chloraminated water and river water, and subsequent resuscitation. *Environmental Microbiology Reports*. 2009. № 1(2). P. 140–161.
40. Соколенко А.В. Некультивируемые формы бактерий: распространение в природе, индукторы некультивируемого состояния и реверсии. *Современные наукоемкие технологии*. 2006. № 2. С. 11–15
41. Гончарук В.В., Сапрыкина М.Н., Болгова Е.С. Новые подходы к оценке обеззараживания питьевой воды. *Доповіди НАН України*. 2016. № 5. С. 80–84.
42. Sardesai Y.N. Viable but non-culturable bacteria: their impact on public health. *Current Science*. 2005. Vol. 89. P. 1650.
43. Baffone W., Citterio B., Vittoria E. et al. Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio spp.* *International Journal of Food Microbiology*. 2003. Vol. 89. № 1. P. 31–39.
44. Colwell R.R., Brayton P., Herrington D., Tall B., Huq A. and Levine M.M. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* O1 revert to a cultivable state in the human intestine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1996. Vol. 12. № 1. P. 28–31.
45. Cappelletti J.M., Besnard V., Roche S.M., Velge P. and Federighi M. Avirulent viable but non culturable cells of *Listeria monocytogenes* need the presence of an embryo to be recovered in egg yolk and regain virulence after recovery. *Veterinary Research*. 2007. Vol. 38. № 4. P. 573–583.
46. Edwards C. Problems posed by natural environments for monitoring microorganisms. *Molecular Biotechnology*. 2000. Vol. 15. № 3. P. 211–223.
47. Epstein S.S. Microbial awakenings. *Nature*. 2009. Vol. 457. № 7233. P. 1083.
48. Colwell R., Grimes K.J. Bacterial death revisited in Non-Culturable Microorganisms in the Environment. *ASM Press*. 2000. P. 325–342.

49. Anderson M., Bollinger D., Hagler A. et al. Viable but nonculturable bacteria are present in mouse and human urine specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004. Vol. 42. № 2. P. 753–758.
50. Mulvey M.A., Schilling J.D. and Hultgren S.J. Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infection and Immunity*. 2001. Vol. 69. № 7. P. 4572–4579.
51. Pommepuy M., Butin M., Derrien A., Gourmelon M., Colwell R. and Cormier M. Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996. Vol. 62. № 12. P. 4621–4626.
52. Binsztein N., Costagliola M.C., Pichel M., et al. Viable but Nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in the Aquatic Environment of Argentina. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. № 70. P. 7481–7486.
53. Alam M., Sultana M., Nair G.B. et al. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in biofilms in the aquatic environment and their role in cholera transmission. *PNAS*. 2007. № 104. P. 1780–17806.
54. Reichert-Schwillinsky F., Pin C., Dzieciol M., Wagner M., Hein I. Stress- and Growth Rate-Related Differences between Plate Count and Real-Time PCR Data during Growth of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. № 75. P. 2132–2138.
55. Diaper J.P., Edwards C. The use of fluorogenic esters to detect viable bacteria by flow cytometry. *J. Appl. Bacteriol.* 1994. № 77. P. 221–228.
56. Awais R., Fukudomi H., Miyanaga K., Unno H., Tanji Y. A Recombinant Bacteriophage-Based Assay for the Discriminative Detection of Culturable and Viable but Nonculturable *Escherichia coli* O157:H7. *A106 Biotechnol. Prog.* 2006. № 22. P. 853–859.
57. Albertini M.C., Accorsi A., Teodori L., et al., Use of Multiparameter Analysis for *Vibrio alginolyticus* Viable but Nonculturable State Determination. *Cytometry A*. 2006. № 69. P. 260–265.

58. Villarino A., Bouvet O.M.M., Regnault B., Martin-Delautre S. and Grimont P.A.D. Exploring the frontier between life and death in *Escherichia coli*: evaluation of different viability markers in live and heat- or UV-killed cells. *Research in Microbiology*. 2000. Vol. 151. № 9. P. 755–768.
59. Rudi K., Moen B., Dromtorp S., Holck A. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. P. 1018–1024.
60. Berney M., Hammes F., Bosshard F., Weilenman H.-U., Egli T. Assessment and Interpretation of Bacterial Viability by Using the LIVE/DEAD BacLight Kit in Combination with Flow Cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007. P. 3283–3290.
61. Alonso J.L., Mascellaro S., Moreno Y., Ferrus M.A., Hernandez J. Double-staining method for differentiation of morphological changes and membrane integrity of *Campylobacter coli* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. P. 5151–5154.
62. Rowan N.J. Defining established and emerging microbial risks in the aquatic environment: current knowledge, implications, and outlooks. *International Journal of Microbiology*. 2011. Vol. 20. Article ID 462832. 15 p.
63. Kennedy S., Oswald N. PCR troubleshooting and optimization. The essential guide. Eds. Norfolk: Caister Academic Press, 2011. 235 p.
64. Pitonzo B.J., Amy P.S., Rudin M. Resuscitation of microorganisms after gamma irradiation. *Radiat. Res.* 1999. 152(1). P. 71–75.
65. Wai S.N., Moriya T., Kondo K. et al. Resuscitation of *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 from viable but nonculturable state by heart shock. *FEMS Microbiol. Lett.* 1996. № 136(2). P. 187–190.
66. Masuda Y., Tajima K., Ezura Y. Resuscitation of *Tenacibaculum sp.*, the causative bacterium of spotting disease of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* from viable but non-culturable state. *Fisheries Science*. 2004. № 70. P. 277–284.
67. Rockabrand D., Austin T., Kaiser R., Blum P. Bacterial growth state distinguished by single-cell protein profiling: does chlorination kill coliforms in municipal effluent? *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. № 65(9). P. 4181–4188.

68. Шлеева М.О., Мукамолова Г.В., Телков М.В. и др. Образование «некультивируемых» клеток *Micobacterium tuberculosis* и их оживление. *Микробиология*. 2003. № 72(1). P. 76–83.
69. Mukamolova G.V., Yanopolskaya N.D., Kell D.B., Kaprelyants A.S. – On resuscitation from the dormant state of *Micrococcus luteus*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1998. V. 73. P. 237–243.
70. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Цитокины – возможные активаторы роста патогенных бактерий. *Вестник РАМН*. 2000. № 1. P. 13–18.
71. Циммер К. Микрокосм: *E. coli* и новая наука о жизни. Пер. с англ. М.: Альпинанон-фикшн, 2013. 394 с.
72. Гончарук В.В., Руденко А.В., Савлук О.С., Сапрыкина М.Н. Микромицеты в источниках водоснабжения и водопроводной воде. *Вода: гігієна та екологія*. 2013. № 2(1). С. 34–48.
73. Савлук О.С., Сапрыкина М.Н., Лупеко В.С., Руденко А.В., Лавренчук И.Н., Гончарук В.В. Мониторинг микромицетов в водопроводной воде г. Киева. *Химия и технология воды*. 2013. Т. 35. № 5. С. 416–425.
74. Бондар В.С., Мерзлікін С.І., Карпушина С.А. та ін. Основи токсикології. Х.: Вид-во НФаУ, 2007. 44 с.
75. Гончарук В.В., Руденко А.В., Савлук О.С. и др. Проблема инфицирования воды возбудителями микозов и перспективы ее решения. *Химия и технология воды*. 2004. № 2. С. 120–144.
76. Gray M. Molds and mycotoxins: beyond allergies and asthma. *Altern. Ther. Health Med*. 2007. Vol. 13. № 2. P.146–152.
77. Etzel R.A. What the primary care pediatrician should know about syndromes associated with exposures to mycotoxins. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care*. 2006. № 8. P. 282–305.
78. Yu J., Cleveland T.E., Nierman W.C., Bennett J.W. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. *Rev. Iberoam. Micol*. 2005. № 22. P. 194–202.

79. Pitt J.I., Hocking A.D. Mycotoxins in Australia: biocontrol of aflatoxin in peanuts. *Mycopathologia*. 2006. Vol. 162. №3. P. 233–243.
80. <http://www.childneurologyinfo.com/health-text-diseases12.php>
81. Клеточная стенка грибов [электронный ресурс]: – Режим доступа до журн. – <http://ru.wikipedia.org>.
82. [http://ashipunov.info/shipunov/school/books/babjeva2004\\_biologija\\_drozhzhej.pdf](http://ashipunov.info/shipunov/school/books/babjeva2004_biologija_drozhzhej.pdf)
83. Saprykina M.N., Samsoni-Todorov A.O. The decontamination effect of UV radiation with respect to micromycetes. *Journal of Water Chemistry and Technology*. 2009. Vol. 31. № 5. P. 329–333.
84. United State Environmental Protection Agency. Microbiology. In 2012 Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories; Washington. DC. 2012. P. 11.
85. World Health Organization. Microbial aspects. In Guidelines for drinking-Water Quality, 4th ed.; Geneva, Switzerland. 2011. P. 117–155.
86. ДСТУ 7527:2014. Вода питна. Вимоги та методи контролювання якості.
87. Moreno Y., Piqueres P., Alonso J.L., Jimenez A., Gonzalez A., Ferrus M.A. Survival and viability of *Helicobacter pylori* after inoculation into chlorinated drinking water. *Water Res.* 2007. № 41 (15). P. 3490–3496.
88. Alleron L., Merlet N., Lacombe C., Frere J. Long-term survival of *Legionella pneumophila* in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment. *Curr. Microbiol.* 2008. № 57 (5). P. 497–502.
89. Dwidjosiswojo Z., Richard J., Moritz M.M., Dopp E., Flemming H.C., Wingender J. Influence of copper ions on the viability and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* under conditions relevant to drinking water environments. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 2011. № 214 (6). P. 485–492.
90. Besnard V., Federighi M., Declercq E., Jugiau F., Cappelier J.M. Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Water Res.* 2002. № 33 (4). P. 359–370.
91. Alexandrino M., Grohmann E., Szewzyk U. Optimization of PCR-based methods for rapid detection of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Yersinia*

*enterocolitica* serovar 0:3 in wastewater samples. *Water Res.* 2004. № 38 (5). P. 1340–1346.

92. Mizunoe Y., Wai S.N., Takade A., Yoshida S. Restoration of culturability of starvation-stressed and low-temperature-stressed *Escherichia coli* O157 cells by using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degrading compounds. *Arch. Microbiol.* 2000. № 172. P. 63–67.

93. Мусиенко А.А. Применение гипохлорита натрия в обеззараживании воды. *Вода. Экологія. Суспільство.* 2014. №1.

94. Oliver J.D., Dagher M., Linden K. Induction of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* into the viable but nonculturable state following chlorination of wastewater. *J. Water Health.* 2005. № 3. P. 249–257.

95. Ben S.M., Masahiro O., Hassen A. Detection of viable but non cultivable *Escherichia coli* after UV irradiation using a lytic Q beta phage. *Ann. Microbiol.* 2010. № 60 (1). P. 121–127.

96. Zhang Y., Wu Q., Zhang J., Yang X. Effects of ozone on membrane permeability and ultrastructure in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Microbiol.* 2011. № 111 (4). P. 1006–1015.

97. Мокиенко А.В. Вода: к взаимосвязи гигиены и экологии. *Вода: гигиена и экология.* 2013. №1(1). С. 20–34.

98. ГОСТ 18963-73. Вода питьевая. Методы санитарно-бактериологического анализа. М.: Госстандарт СССР, 1973. 87 с.

99. Желдакова Р.А. Выделение и идентификация микроорганизмов; учебно-методическое пособие. Мн.: БГУ, 2003. 36 с.

100. Справочник по санитарной микробиологии / под ред. Л.В. Григорьевой. Кишнев: Картя Молдовеняскэ, 1981. 206 с.

101. Болгова Е.С., Сапрыкина М.Н., Гончарук В.В. Идентификация *Escherichiacoli* в жизнеспособном некультурабельном состоянии под воздействием хлора. *Химия и технология воды.* 2015. Т. 37. № 6. С. 487–493.

102. Сапрыкина М.Н., Болгова Е.С., Гончарук В.В. Образование жизнеспособного некультурабельного состояния *Candida albicans*. *Химия и технология воды.* 2016. Т. 38. № 3. С. 324–332.



103. ГОСТ 18190-72 «Вода питьевая. Методы определения остаточного активного хлора». М.: Госстандарт СССР, 1972. 76 с.
104. Методы прижизненного окрашивания. – <http://vivakafe.ru/dispersii/50-metody-prizhiznennogo-okrashivaniya.html>.
105. Панайотова Т.Д., Зайцева І.С. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни "Хімія води" (для студентів 3 курсу денної та заочної форм навчання за напрямом підготовки 6.060103 – “Гідротехніка (водні ресурси)”). *Харк. нац. акад. міськ. госп-ва; уклад.*– Х.: ХНАМГ. 2011. 87 с.
106. Гончарук В.В., Терлецкая А.В., Иевлева О.С. [и др.] Новый фотометрический метод определения остаточных концентраций полигексаметиленгуанидина в питьевых и природных водах. *Химия и технол. воды*. 2006. Т. 28, № 6. С. 558–570.
107. Cho M., Chung H., Yoon J. Effect of pH and importance of ozone initiated radical reactions in inactivating bacillus subtilis spore. *Ozone Sci. Eng.* 2002. № 24. P. 145–150.
108. Кравченко Н.С., Ревинская О.Г. Методы обработки результатов измерений и оценки погрешностей в учебном лабораторном практикуме: учебное пособие. Томский политехнический университет. 2-е изд., перераб. Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2017. 120 с.
109. Хахаев И.А. Gnumerric: Электронная таблица для всех. М.: ALT Linux, 2011. 192 с.
110. <http://www.gastroscan.ru/handbook/118/3200>
111. Юдин И.П. Современные подходы к оценке жизнеспособности бактерий с акцентом на феномене некультурабельности. *Доклады института им. И. Мечникова*. 2007. № 3. С. 8–16.
112. Maalej S., Gdoura R., Dukan S., Hammami A., Bouain A. Maintenance of pathogenicity during entry into and resuscitation from viable but nonculturable state in *Aeromonas hydrophila* exposed to natural seawater at low temperature. *Journal of Applied Microbiology*. 2004. № 97. P. 557–565
113. МВ 10.2.1-113-2005. Санітарно-мікробіологічний контроль якості питної води. Методичні вказівки. Наказ МОЗ України N 60 від 03.02.2005.

114. ДСТУ 7487:2013. Якість води. Метод визначення мікроміцетів у воді. Київ.: Мінекономрозвитку України, 2014. 10 с.
115. Спосіб виявлення життєздатних некультурабельних мікроорганізмів у воді: пат. 113472 України; МПК С12Q 1/0492006/01. № 201511710; заявл. 26.11.15; опубл. 25.01.17, Бюл. № 2. 4 с.
116. [https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco\\_BBL/248510.pdf](https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/248510.pdf)
117. Спосіб вирощування культур промислових та лабораторних штамів *Escherichia coli* з використанням збагаченого живильного середовища на сольовій основі М9: пат. 42940України; опубл. 27.07.09.
118. Morishige Y., Fujimori K., Amano F. Differential Resuscitative Effect of Pyruvate and its Analogues on VBNC (Viable But Non-Culturable) *Salmonella*. *Microbes Environ.* 2013. Vol. 28. №. 2. P. 180–186.
119. Morishige Y., Tanda M., Fujimori K., Mino Y., Amano F. Induction of viable but non-culturable (VBNC) state in *Salmonella* cultured in M9 minimal medium containing high glucose. *Biol. Pharm. Bull.* 2014. № 37(10). P. 1617–1625.
120. Ревин В.В., Атыкян Н.А., Костина Е.Г., Гоготов И.Н. Влияние кальция на изменение состава липидов клеток *Rhodococcus erythropolis* Ac-858 Т в процессе периодического и полунепрерывного культивирования на средах с различной концентрацией гексадекана. *Вестник ОГУ.* 2008. № 11. С. 143–149.
121. <http://statistica.ru/local-portals/industry-analytics/example/549/>
122. <http://waternet.ua/news/newsletter/33/>
123. Гончарук В.В., Руденко А.В., Савлук О.С., Коваль Е.З., Саприкіна М.М. Мікроміцети в питній воді та шляхи її знезараження. *Доповіді НАН України.* 2008. № 11. С. 187–191.
124. Саприкіна М.М. Водопровідна вода – нова загроза здоров'ю людей (за матеріалами наукового повідомлення на засіданні Президії НАН України 7 травня 2014 р.). *Вісник НАН України.* 2014. № 7. С. 70–75.
125. ГОСТ 10444.12-88. Продукты пищевые. Метод определения дрожжей и плесневых грибов. М.: Госстандарт СССР, 1988. 96 с.

126. Кульский А., Строкач П.П. Технология очистки природных вод. Киев: «Вища школа». Головное изд-во, 1981. 328 с.
127. <https://www.drdauidwilliams.com/how-to-purify-water/>
128. Ефимов К.М., Гембицкий П.А., Снежко А.Г. Полигуанидины – класс малотоксичных дезсредств пролонгированного действия. *Дезинфекционное дело*. 2000. №4. С.12–16.
129. Воинцева И.И., Гембицкий П.А., Валецкий П.М. Новые биоцидные полимеры на основе отечественного сырья для антисептирования воды, борьбы с инфекцией (включая туберкулез), с биокоррозией и биообрастанием. Матер. XIV Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. 1998. 303 с.
130. Запольський А.К. Водопостачання, водовідведення та якість води. Підручник. К.: Вища школа, 2005. 671 с.
131. Прокопов О.В., Чичковська Г.В. До питання механізму дії полігексаметиленгуанідину – реагенту із флокулюючими та біоцидними властивостями, який пропонується для використання у водопідготовці. *Гігієна населених місць*. 2006. Вип. 47. С. 76–79.
132. Мокиенко А.В. Вода: к взаимосвязи гигиены и экологии. *Вода: гигиена и экология*. 2013. №1(1). С. 20–34.
133. РД 118-02-90 Методическое руководство по биотестированию вод. Биотестирование с использованием ракообразных. С. 5-33.
134. ДСТУ 4173-2003. Якість води. Визначання гострої летальної токсичності на *Daphnia magna* та *Ceriodaphnia affinis* (*Cladocera*, *Crustacea*) (ISO 6341:1996, MOD).

Kc 1000

## ДОДАТОК А

ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор ІКХХВ ім. А.В. Думанського  
НАН України  
акад. НАН України  
В.В. Гончарук



ЗАТВЕРДЖУЮ

Заступник директора з наукової роботи  
ДУ "Інститут урології НАМН України"  
НАЦІОНАЛЬНИЙ  
УНІВЕРСИТЕТ  
МЕДИЧНИХ  
НАУК  
О.В. Шульгин  
Інститутської вул.  
02011918 2017 р.



## АКТ

впровадження технологічної схеми для вилучення мікроорганізмів, що перебувають в життєздатному некультивурабельному стані з водопровідної води

Ми, що нижче підписалися, представники ІКХХВ ім. А.В. Думанського НАН України в особі ст. наук. співр., д.х.н. О.В. Дацкевич, ст. наук. співр., к.т.н. М.М. Саприкіної, пров. інж. С.В. Ремеза, пров. інж. О.С. Болгової та представники ДУ "Інститут урології НАМН України", в особі зав. лаб., д.б.н., проф. А.В. Руденко, наук. співр., к.б.н. О.М. Бавіна, бактеріолог С.А. Заліток, бактеріолог В.В. Третяк склали даний акт про те, що у відповідності з договором про співробітництво між Інститутом колоїдної хімії та хімії води ім. А.В. Думанського НАН України та ДУ "Інститут урології НАМН України" у ІКХХВ НАН України була розроблена, випробувана та впроваджена в лабораторії мікробіології, вірусології, мікології Інституту урології НАМН України нова схема очистки води від мікроорганізмів, що перебувають в життєздатному некультивурабельному стані.

Технологічна схема включає обробку контамінованої води контактною флокуляцією. При цьому в якості флокулянту використовують полідіалілдиметиламоній хлорид (ДБ-45), а як завантаження – пісок або мезопористе кісточкове активоване вугілля (КАВ) чи інші сорбенти. Фільтрування здійснюють при одночасній подачі контамінованої води і флокулянта на поверхню завантаження. Запропонована технологічна схема забезпечує високий ступінь вилучення з води широкого ряду мікроорганізмів, в тому числі тих, що перебувають в життєздатному некультивурабельному стані, але не культивуються при використанні поживних середовищ, що застосовуються в мікробіологічних лабораторіях.

Від Інституту колоїдної хімії  
та хімії води ім. А.В.Думанського  
НАН України

ст.наук.співр., д.х.н.  
О.В. Дацкевич  
ст.наук.співр., к.т.н.  
М.М. Саприкіної  
пров. інж.  
С.В. Ремез  
пров. інж.  
О.С. Болгова

Від ДУ "Інститут урології НАМНУ"

зав. лаб., д.б.н.,  
проф. А.В. Руденко  
наук. співр., к.б.н.  
О.М. Бавіна  
бактеріолог  
С.А. Заліток  
бактеріолог  
В.В. Третяк

Зустріч здійснено  
в Інституті колоїдної хімії та хімії води  
ім. А.В. Думанського НАН України

## ДОДАТОК Б

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Болгова Е.С., Сапрыкина М.Н., Гончарук В.В. Идентификация *Escherichia coli* в жизнеспособном некультурабельном состоянии под воздействием хлора. *Химия и технология воды*. 2015. Т. 37, № 6. С. 487–493.

*Проведення експериментальних робіт щодо впливу знезаражуючого реагенту на перехід клітин Escherichia coli в життєздатний некультурабельний стан та дослідження умов повернення культури в нормальний культурабельний стан; обробка отриманих результатів та написання статті.*

2. Гончарук В.В., Саприкіна М.М., Болгова Е.С. Новые подходы к оценке обеззараживания питьевой воды. *Доповіді НАН України*. 2016. № 5. С. 80–84.

*Літературний пошук, проведених досліджень і узагальнення результатів, написання статті.*

3. Сапрыкина М.Н., Болгова Е.С., Гончарук В.В. Образование жизнеспособного некультурабельного состояния *Candida albicans*. *Химия и технология воды*. 2016. Т. 38, № 3. С. 324–332.

*Планування і проведення експериментальних досліджень, обробка результатів, написання статті.*

4. Болгова Е.С., Сапрыкина М.Н., Гончарук В.В. Новый тест-объект для оценки качества обеззараженной воды. *Вода і водоочисні технології. Науково-технічні вісті*. 2016. №3 (20). С. 3–7.

*Проведення експериментальних досліджень та участь у написанні статті.*

5. Сапрыкина М.Н., Болгова Е.С., Гончарук В.В. Оптимальные условия рекультивации *C. albicans*, пребывающей в некультурабельном состоянии. *Химия и технология воды*. 2017. Т. 31, № 5. С. 575–582.

*Літературний пошук, проведення експериментів щодо дослідження впливу складових поживного середовища М-9 на рекультивацію клітин Candida albicans, узагальнення результатів, написання статті.*

6. Спосіб виявлення життєздатних некультурабельних мікроорганізмів у воді: пат. 113472 України; МПК С12Q 1/0492006/01. № 201511710; заявл. 26.11.15; опубл. 25.01.17, Бюл. № 2. 4 с.

*Проведення патентного пошуку, розробка способу виявлення життєздатних некультурабельних мікроорганізмів у воді, написання патенту на винахід.*

7. Болгова Е.С., Сапрыкина М.Н., Гончарук В.В. Идентификация микроорганизмов в жизнеспособном некультурабельном состоянии под воздействием хлора. *Екологія – 2015*: зб. наук. праць V-ий Всеукраїнський з'їзд екологів з міжнародною участю (Вінниця, 23-26 травня 2015 р.). Вінниця. 2015. С. 120.

8. Болгова О.С., Саприкіна М.М., Гончарук В.В. Спосіб виявлення мікроорганізмів, що перебувають у життєздатному, однак некультурабельному стані (VBNC) у водопровідній воді. *Чиста вода. Фундаментальні, прикладні та промислові аспекти*: зб. тез. доп. IV Міжнародна науково-практична конференція (Київ, 26-28 жовтня 2016 р.). Київ. 2016. С. 55–56.

9. Болгова Е.С., Сапрыкина М.Н., Гончарук В.В. Рекультивация *Candida albicans*, пребывающей в некультивируемом состоянии. *Вода в харчовій промисловості*: матеріали VIII Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих учених, аспірантів і студентів (Одеса, 20-21 квітня 2017 р.). Одеса. 2017. С. 88–90.

*В роботах [7-9] – проведення експериментальних досліджень, участь в інтерпретації результатів та написанні тез доповідей.*