

**Ю. Л. Морева
А. Н. Николаев
Н. Ю. Большаков**

**ОСНОВЫ МИКРОБИОЛОГИИ
И ПРИРОДООХРАННЫХ
БИОТЕХНОЛОГИЙ**

Выполнение лабораторных работ

**Санкт-Петербург
2022**

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

**«Санкт-Петербургский государственный университет
промышленных технологий и дизайна»
Высшая школа технологии и энергетики
Кафедра охраны окружающей среды и рационального
использования природных ресурсов**

ОСНОВЫ МИКРОБИОЛОГИИ И ПРИРОДООХРАННЫХ БИОТЕХНОЛОГИЙ

Выполнение лабораторных работ

Методические указания для студентов очной и заочной форм
обучения по направлению подготовки
18.03.02 – Энерго- и ресурсосберегающие процессы в химической
технологии, нефтехимии и биотехнологии

Составители:
Ю. Л. Морева
А. Н. Николаев
Н. Ю. Большаков

Санкт-Петербург
2022

Утверждено
на заседании кафедры ООС и РИПР
02.06.2021 г., протокол № 6

Рецензент О. А. Шанова

Методические указания соответствуют программе и учебному плану дисциплины «Основы микробиологии и природоохранных биотехнологий» для студентов, обучающихся по направлению подготовки 18.03.02 «Энерго- и ресурсосберегающие процессы в химической технологии, нефтехимии и биотехнологии». В указаниях представлен порядок выполнения и оформления лабораторных работ.

Методические указания предназначены для бакалавров очной и заочной форм обучения.

Утверждено Редакционно-издательским советом ВШТЭ СПбГУПТД в качестве
методических указаний

Редактор и корректор А. А. Чернышева
Техн. редактор Д. А. Романова

Темплан 2021 г., поз. 26

Подписано к печати 15.02.2022.	Формат 60x84/16.	Бумага тип № 1.
Печать офсетная.	Печ.л. 4,2.	Уч.-изд. л. 4,2.
Тираж 50 экз.	Изд. № 26.	Цена «С».
		Заказ №

Ризограф Высшей школы технологии и энергетики СПбГУПТД,
198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 4.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЮ.....	4
1. Общие правила по охране труда и технике безопасности при работе в микробиологической лаборатории	5
2. Подготовка посуды и оборудования к работе с живыми объектами	6
3. Техника подготовки и методы стерилизации питательных сред.....	8
4. Понятие о виде, штамме, колонии, чистой культуре микроорганизмов.....	15
Лабораторная работа №1. ОСВОЕНИЕ ТЕХНИКИ МИКРОСКОПИРОВАНИЯ. МОРФОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ И ДРОЖЖЕЙ	21
Лабораторная работа № 2. МИКРОФАУНА И СТРУКТУРА ХЛОПЬЕВ АКТИВНОГО ИЛА	31
Лабораторная работа № 3. БИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АКТИВНОГО ИЛА	40
Лабораторная работа № 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ РАСТВОРЕННОГО КИСЛОРОДА НА СКОРОСТЬ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ.....	48
Лабораторная работа № 5. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ НА СКОРОСТЬ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ.....	56
Лабораторная работа № 6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ СПОСОБНОСТИ ЭЖЕКТОРНОГО АЭРАТОРА ДЛЯ АЭРОТЕНКА-ОТСТОЙНИКА СО СТРУЙНЫМ АЭРАТОРОМ	62

ВВЕДЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЮ

Промышленная биотехнология объединяет методы переработки, в которых для получения данных продуктов используются живые организмы и биологические процессы. Если в химической технологии на сырье воздействуют химическими реагентами, то в биотехнологических процессах на исходный материал – субстрат воздействуют биологическими агентами. Биологическими агентами могут быть микроорганизмы, клетки животных и растений и выделенные из клеток биологические структуры. Поскольку в промышленности наиболее широко используемыми биологическими агентами являются микроорганизмы, часть лабораторного практикума организована в микробиологической лаборатории.

Микробиологическая лаборатория представляет собой комплекс помещений, оборудования и приборов, позволяющих использовать различные приемы для культивирования микроорганизмов и изучения их морфологических, физиологических и биохимических свойств. Организация и оборудование микробиологической лаборатории определяются ее предназначением. Обычно в структуру любой микробиологической лаборатории входят комнаты для микробиологических исследований и подсобные помещения (автоклавная, моечная, помещение для приготовления питательных сред).

Работа в микробиологической лаборатории должна проводиться в **асептических условиях**, т. е. в условиях, предупреждающих попадание чужеродных, посторонних микроорганизмов на исследуемые объекты. Создание асептических условий предусматривает дезинфекции помещений, стерилизацию инструментов и материалов. Рабочие помещения должны быть оборудованы вентиляцией. Стены рабочих помещений для проведения влажной уборки и обработки дезинфицирующими средствами выкладываются плитками или окрашиваются масляной краской.

Лабораторные помещения оборудованы шкафами, полкам для хранения аппаратуры, посуды, реактивов. В состав оснащения микробиологической лаборатории обязательно входит: газовые или спиртовые горелки, штативы для пробирок, стеклянные шпатели (шпатель Дригальского), пипетки градуированные и Пастера, пинцеты, бактериальные петли (крючки, иглы), ножницы, фильтровальная бумага, предметные и покровные стекла, биологические микроскопы, лупы, установки для культивирования микроорганизмов, биксы для стерилизации, наборы красителей и реактивов для окраски препаратов. В лаборатории должен присутствовать определенный набор лабораторной посуды, включающий пробирки, чашки Петри, колбы Виноградского и Линдера, качалочные колбы, флаконы Ру (матрацы), промывалки и т. п.

1. Общие правила по охране труда и технике безопасности при работе в микробиологической лаборатории

В лабораторном практикуме по дисциплине «Основы микробиологии и природоохранных биотехнологий» наряду с общими правилами по охране труда и технике безопасности (ТБ) при работе в химической лаборатории должны соблюдаться требования, обусловленные спецификой микробиологической лаборатории.

К работе в лаборатории студенты допускаются только после ознакомления с организацией ее работы и правилами ТБ. Работать одному в лаборатории запрещается. Приступать к работе можно только в присутствии преподавателя или лаборанта. Работы выполняются строго в соответствии с методикой эксперимента. Следует бережно и аккуратно обращаться с посудой, приборами и предметами оборудования; разумно экономить реактивы, воду, газ и электричество.

Во время работы в лаборатории необходимо соблюдать тишину, чистоту и порядок на своем рабочем месте и в лаборатории. Нельзя отвлекаться от работы и отвлекать других студентов. Запрещается держать на лабораторном столе портфель, сумку и другие посторонние предметы. Для них должно быть отведено специальное место. В лаборатории запрещается пить воду, принимать и хранить пищу, курить. В качестве рабочей одежды необходимо иметь хлопчатобумажный халат.

Для обеспечения стерильности работу с микроорганизмами лучше проводить в специальных стеклянных или полустеклянных камерах-боксах, которые бывают разных размеров. В боксах вмонтированы ультрафиолетовые бактерицидные лампы, уничтожающие микроорганизмы.

Необходимо следить за тем, чтобы дрожжевая масса не загрязняла руки, стол и окружающие предметы. Ватные пробки, закрывающие сосуды с микроорганизмами, не должны своей внутренней частью соприкасаться со столом или руками. Пролитую дрожжевую суспензию необходимо обезвредить с использованием дезинфицирующих средств (спирт и т. п.). Бактериальная петля после пересева микроорганизмов должна быть прокалена над пламенем и поставлена в специальный штатив. Вся рабочая лабораторная посуда, содержащая живые микроорганизмы, после работы должна подвергнуться термической обработке в автоклаве.

При работе со спиртовками следует остерегаться воспламенения паров спирта внутри спиртовки. Нельзя зажигать спиртовку от другой спиртовки. Гасить спиртовку следует только с помощью специального колпачка. Необходимо контролировать наличие спирта в спиртовке. По окончании работы не оставлять спиртовку зажженной. В случае воспламенения ватных пробок пробирок и колб необходимо немедленно накрыть их полотенцем, прекратив к ним доступ воздуха.

По завершении работы необходимо привести в порядок рабочее место. Не разрешается бросать в раковины бумагу, вату, стекло от разбитой химической посуды.

Двери лаборатории держат закрытыми. Для обозначения действительного или возможного присутствия биологической опасности употребляют международный знак биологической опасности (рис. 1). Данным знаком обозначают помещения, оборудование, емкости, а также материалы, в которых выращиваются живые микроорганизмы. Знак окрашен люминесцирующей оранжевой или оранжево-красной краской. Рядом со знаком дается соответствующая информация о характере опасности, и указываются меры, обеспечивающие безопасную работу с данной группой микроорганизмов.



Рис.1. Знак биологической опасности

2. Подготовка посуды и оборудования к работе с живыми объектами

Посуда и оборудование, контактирующие с микроорганизмами, должны быть стерильными. Перед стерилизацией посуду и оборудование тщательно моют, высушивают и готовят к стерилизации. Вымытые и высушенные пробирки закрывают ватно-марлевыми пробками, объединяют по 15...20 штук и заворачивают в бумагу. На колбы с пробками надевают бумажные колпачки.

При подготовке к стерилизации градуированных пипеток или пипеток Пастера в их верхнюю часть помещают кусочек ваты, который не должен быть очень плотным, но и не должен свободно двигаться в пипетке. Вату проталкивают вглубь пипетки, выступающие волокна обжигают в пламени горелки, чтобы они не мешали плотно зажимать пипетку пальцем. Пипетки затем обматывают полосками бумаги шириной 4...5 см и длиной 50...70 см, начиная с нижней части и постепенно перемещаясь к верхнему концу с ватным тампоном. Полностью обернув пипетку, на бумаге обязательно указывают вместимость пипетки. Завернутые пипетки объединяют по 10...15 штук и заворачивают в бумагу или помещают в специальный бикс.

Чашки Петри заворачивают по 3...5 штук или помещают в специальные биксы по 10...12 штук, не заворачивая их в бумагу.

Расширяющуюся часть шпателя Дригальского (рис. 2а) заворачивают в бумагу, затем группируют по 3...5 штук и заворачивают вместе.

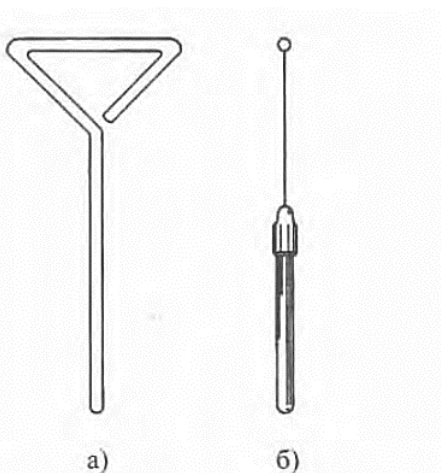


Рис. 2. Инструменты для работы с микроорганизмами:
а – шпатель Дригальского; б – бактериальная петля

Предметные и покровные стекла, используемые для приготовления препаратов микроорганизмов, необходимо вымыть и обезжирить. Обезжиривание стекол особенно важно при изготовлении фиксированных препаратов.

Новые стекла промывают водой, вытирают, а затем обрабатывают смесью спирта и эфира (50:50 по объему), опуская в эту смесь на 2...3 дня. После этого стекла вытирают или обжигают на огне.

Бывшие в употреблении старые стекла опускают на 2 ч в хромовую смесь, затем хорошо промывают водой и кипятят в 2 %-м растворе соды или в мыльной воде, промывают водой и смесью спирта с эфиром. Иногда для обезжиривания используют мыло. Сухим куском мыла натирают стекла, а затем протирают их чистой сухой тканью. Обезжиренные, стекла следует брать в руки за грани.

Стерилизацию посуды и оборудования проводят различными физическими и химическими методами. Выбор метода определяется материалом и размерами стерилизуемого предмета. Наиболее распространены и надежны термические методы стерилизации (прокаливание в пламени, стерилизация сухим жаром, стерилизация паром под давлением и т. д.).

Мелкие металлические инструменты (бактериальные петли (рис. 2б), иглы, крючки, пинцеты, ножницы) стерилизуют прокаливанием в пламени спиртовки

непосредственно перед использованием. При прокаливании микроорганизмы и их споры сгорают. В пламени спиртовки стерилизуют также покровные и предметные стекла перед использованием.

Крупные предметы и различную стеклянную и фарфоровую посуду стерилизуют сухим жаром или горячим воздухом в сухо-жаровых стерилизаторах, способных обеспечить нагрев до 200 °С.

Часть материалов, таких как резина, дерево, ткани, бумага, не способна выдерживать многократную стерилизацию сухим жаром при 180...200 °С, поэтому стерилизацию этих материалов и изделий из них проводят при меньших температурах, но с помощью водяного пара. Совместное действие высокой температуры и водяного пара повышает эффективность тепловой стерилизации, и уже при 110...120 °С происходит уничтожение как вегетативных, так и споровых форм микроорганизмов. Менее термостойкие материалы, например, некоторые виды пластмасс, стерилизуют облучением (ультрафиолетовые лучи, γ -излучение) или ультразвуком. Можно также использовать антисептики – химические вещества, уничтожающие микроорганизмы, такие как спирт, растворы формалина, хлорамина, сульфата меди (медного купороса) и др.

3. Техника подготовки и методы стерилизации питательных сред

Питательными средами называют смеси веществ, на которых выращивают микроорганизмы в лабораторных и промышленных условиях. Состав питательной среды и ее физико-химические характеристики должны соответствовать физиологическим потребностям выращиваемой культуры микроорганизмов.

3.1. Требования, предъявляемые к питательным средам

Питательные среды по своему **назначению** делятся на диагностические, элективные и производственные. **Диагностические среды** предназначены в основном для обнаружения, выделения и идентификации патогенных микроорганизмов по морфологическим и физиологическим признакам. **Элективные среды** обеспечивают преимущественное развитие одного вида или группы родственных микроорганизмов и непригодны или менее пригодны для других. **Производственные питательные среды**, в свою очередь, подразделяют на **посевные** и **основные ферментационные**. Первые предназначены для приготовления посевного материала, вторые для производства продукции.

Среды должны содержать отдельные ингредиенты в определенных соотношениях, пропорциональных потребностям в них данной культуры микроорганизмов. Специфичность питательных сред определяется набором соединений, поставляющих клеткам углерод и азот. Во многих случаях соединения, необходимые для существования одних микроорганизмов, оказываются совершенно непригодными для других, и поэтому не может быть

универсальной питательной среды для всех микроорганизмов. Менее разнообразны организмы по потребностям в минеральных веществах, поэтому минеральный фон сред для многих микроорганизмов бывает очень близким по составу.

Питательные среды **по составу** подразделяют на естественные, искусственные и синтетические. **Естественные, или натуральные среды** представляют собой натуральные продукты животного или растительного происхождения со сложным и неопределенным составом (солодовое сусло, молоко, яйца, овощи и т. п.). Их используют для поддержания культур микроорганизмов и накопления биомассы. **Синтетические среды** готовятся из определенных химически чистых соединений в точно указанных концентрациях. Эти среды, в отличие от натуральных, имеют определенный состав и используются для изучения обмена веществ у микроорганизмов и составления рецептур питательных сред. **Искусственные, или полусинтетические среды** готовят на основе натуральных продуктов сложного состава (дрожжевой экстракт, солодовое сусло, гидролизаты растительных материалов и т. п.) с добавлением органических и неорганических соединений известного состава (углеводы, фосфаты, нитраты и др.). Такие среды широко применяются в промышленной биотехнологии для производства крупнотоннажных продуктов. Для питательных сред кроме состава очень важны и такие физико-химические факторы, как рН, осмотическое давление или активность воды, окислительно-восстановительный потенциал, парциальное давление кислорода и др. Кислотность среды является важным фактором, значение которого для разных микроорганизмов может существенно отличаться (рН от 3,5 до 9,0). Большинство микроорганизмов развивается в нейтральной или слабощелочной среде, тогда как дрожжи обычно развиваются в более кислой среде. Активность воды (0,6...0,998) определяет границы жизни микроорганизмов и учитывается при составлении жидких сред и определении влажности твердых питательных сред. При длительном культивировании микроорганизмов может происходить значительное концентрирование жидких сред вследствие испарения содержащейся в них воды, что окажется неблагоприятным для роста микроорганизмов. Поэтому в процессе длительного культивирования необходимо регулярно доводить объем культуральной жидкости до первоначального объема, стерильной водой.

3.2. Составы и способы приготовления питательных сред

Питательные среды в зависимости от предназначения могут быть разной консистенции: сухие, сыпучие, жидкие, полужидкие и плотные. Питательные среды **в сухом виде** (влажность до 10 %) выпускаются промышленностью. Они удобны при хранении и транспортировке, легко растворяются в воде при комнатной температуре. **Сыпучие среды** применяют в промышленности для хранения культур микроорганизмов. В качестве сыпучих сред используют разваренное пшено и кварцевый песок, пропитанный питательным раствором.

Жидкие питательные среды используют в биотехнологии для накопления биомассы и продуктов метаболизма, также их применяют для изучения физиологических и биохимических особенностей микроорганизмов. В некоторых случаях жидкие среды уплотняют. Так, например, для хранения культур удобно использовать **полужидкие среды**, а для выделения чистых культур микроорганизмов и в диагностических целях – **плотные среды**. В качестве уплотнителя жидких сред обычно используют **агар** – полисахаридный препарат, получаемый из водорослей. Агар не растворяется в холодной воде и легко растворяется в кипящей. При охлаждении водных растворов агара они образуют прочные гели, которые при нагревании расплавляются, а при охлаждении вновь застывают. Такие агаризованные среды можно неоднократно подвергать термической обработке для стерилизации. Для получения полужидких сред используют 0,5 %-ые растворы агара, а для плотных – 1,5...2,0 %-ные.

Солодовое сусло. Солод представляет собой проросшие в искусственных условиях зерна злаков, отличающиеся повышенным содержанием водорастворимых соединений и гидролитических ферментов (гидролаз). При приготовлении сусла происходит ферментативный гидролиз углеводов и белков. В результате получается полноценная среда для выращивания микроорганизмов, содержащая легко усваиваемые углеводы (глюкоза, фруктоза, сахароза, мальтоза, мальтотриоза, мальтотетраоза), аминокислоты, все основные витамины группы В и минеральные вещества. Сусло получают либо с пивоваренных заводов (неохмеленное), либо готовят из ячменного солода.

В лаборатории для приготовления сусла в 1 дм³ воды вносят 250 г ячменного солода крупного помола с высокой осахаривающей способностью и нагревают до 50 °С. Через 30 мин. температуру повышают до 55 °С, а еще через 30 мин. постепенно поднимают температуру до 62,5...63,0 °С и не снижают до исчезновения реакции на крахмал (йодная проба). Затем сусло отфильтровывают через марлю или вату; разливают по колбам и стерилизуют.

Сусло-агар. Для приготовления плотных сред сусло разводят водой в отношении 1:1. Если рН раствора ниже 5,5, доводят рН до 5,6...6,0 аммиачной водой или раствором карбоната натрия или гидроксида калия и добавляют 2 % агара от массы уплотняемой среды. Растворение агара происходит в ходе термической стерилизации при 115 °С.

Мясопептонный бульон. Для количественного учета микроорганизмов и выделения их в чистую культуру применяют прозрачные плотные среды на основе мясопептонного бульона. 500 г свежего мелко изрубленного или размолотого мяса заливают 1 дм³ воды, нагревают до 50 °С и выдерживают 60 мин. при этой же температуре или 12 ч в холодном месте. Экстракт отфильтровывают через холст или марлю и кипятят 30 мин. Затем добавляют 0,5 % NaCl и 1 % пептона (смесь продуктов неполного гидролиза белков). Фильтруют в горячем состоянии через двойной бумажный фильтр. Фильтрат доводят водой до первоначального объема (1 дм³) и устанавливают рН.

Мясопептонный агар. К мясопептонному бульону прибавляет метко нарезанный агар в количестве от 1,5 до 2,0 % и расплавляют его. Расплавленный мясопептонный агар фильтруют через вату или вату с марлей и быстро разливают по емкостям.

Среда Андреева – синтетическая среда, используемая для культивирования дрожжей. В 1 дм³ воды растворяют: 0,7 г Н₃РO₄ (в виде 10 %-го водного раствора) 4 г СН₃СООН (также предварительно разбавить водой до, 10 %-й концентрации), 0,6 г КСl, 0,3 г MgSO₄ · 7 Н₂O, 0,084 г Са(Н₂РO₄), 8 см³ 0,1н NaOH или 3...4 капли силикатного клея, 20 г глюкозы. Аммиачной водой доводят рН до 5,6...6,0. В некоторых случаях добавляют 5...20 см³ дрожжевого автолизата. Буферная емкость данной среды позволяет культивировать дрожжи без контроля рН.

Среда Ридер – синтетическая среда, используемая для культивирования дрожжей. В 1 дм³ среды содержится: 20 г сахарозы, 3 г (NH₄)₂SO₄, 0,7 г MgSO₄, 0,5 г NaCl, 0,4 г Са(NO₃)₂, 1 г КН₂РO₄, 0,1 г К₂НРO₄.

Дрожжевая вода применяется как компонент питательной среды. Получают кипячением в 1 дм³ воды в течение 10 мин., 70 г свежих прессованных или 20 г сухих дрожжей. После кипячения сразу же фильтрацией удаляют остатки дрожжей.

Среды на основе гидролизатов древесины и сульфитных щелоков – искусственные среды для культивирования дрожжей. Среду готовят смешением 8 объемных частей гидролизата или щелока с 2 объемными частями дрожжевой воды. На 1 дм³ среды добавляют 1 г К₂НРO₄, и 1 г (NH₄)₂SO₄ и доводят значение рН до 4,6...5,0 аммиачной водой (5 % NH₄OH).

Агаризованные среды на основе гидролизатов древесины. Гидролизаты древесины содержат, главным образом, моносахариды, массовую долю которых оценивают по содержанию редуцирующих веществ (РВ). Сульфатом аммония и гидрофосфатом калия доводят массовую долю азота и фосфора до определенного уровня: для РВ = 1,5...1,6 % массовая доля азота – 0,7...0,8 мг/см³, фосфора (в пересчете на Р₂O₄) – 0,35... 0,40 мг/см³; для РВ = 2,8...3,0 % массовая доля азота – 1,4... 1,6 мг/см³, фосфора (в пересчете на Р₂O₅) – 0,7...0,8 мг/см³. На 1 дм³ среды добавляют 30 г агара и аммиачной водой доводят рН до 5,4...5,6.

Среда для плесневых грибов. В 1 дм³ воды растворяют 2 г NaNO₃, 1 г К₃РO₄, 0,5 г MgSO₄, 0,5 г КСl, 0,01 г Fe₂(SO₄)₃ и 30 г сахарозы.

3.3. Стерилизация питательных сред

При приготовлении питательных сред необходимо учитывать возможность их инфицирования посторонними микроорганизмами. Источником инфекции могут быть окружающий воздух, вода, компоненты питательной среды, загрязненная посуда и оборудование. Поэтому принимают меры для уничтожения живых микроорганизмов и предотвращения их попадания во время хранения и проведения исследований в питательную среду. Обработка, при

которой достигается полное освобождение от живых микроорганизмов, в том числе и от их споровых форм, называется **стерилизацией**.

Питательные среды обеззараживают с использованием различных методов. Наиболее распространены **термические методы**, при которых питательные среды нагреваются и выдерживаются при определенной температуре в течение времени, достаточного для стерилизации. Обычно питательные среды стерилизуют обработкой насыщенным водяным паром под давлением в автоклавах – сосудах, предназначенных для работы под давлением. Питательные среды перед стерилизацией паром под давлением (автоклавированием) разливают в чистую посуду не более чем на половину ее вместимости и закрывают ватно-марлевыми пробками и бумажными колпачками. Емкости с питательной средой помещают в автоклав, в который подается водяной пар. После удаления из автоклава воздуха и заполнения его паром закрывают паровой клапан и контролируют температуру и давление в автоклаве. Продолжительность обработки зависит от температуры и объема стерилизуемой среды. Небольшие объемы жидкости (примерно до 3000 см³) можно простерилизовать при 115...117 °С (0,7 МПа) в течение 30 мин., для стерилизации больших объемов требуется более длительная обработка.

Некоторые компоненты питательной среды могут не выдержать длительную обработку при повышенных температурах (более 100 °С), поэтому приходится снижать температуру стерилизации. Однако при температурах 100 °С и ниже многие споровые формы микроорганизмов остаются жизнеспособными и для их уничтожения используют дробную стерилизацию. Сущность **дробной стерилизации** заключается в том, что стерилизуемый материал нагревают и выдерживают при определенной температуре в течение времени, достаточного для уничтожения вегетативных клеток, затем охлаждают и выдерживают при 18...37 °С. Споровые формы при этой температуре прорастают и превращаются в вегетативные, которые при повторных прогревах погибнут. Дробную стерилизацию при 100 °С проводят текущим паром, используя автоклав с открытым паровыпускным клапаном. Дробная стерилизация при 60...80 °С называется **тиндализацией**. Недостатком дробной стерилизации является возможность образования споровых форм вегетативными клетками, образовавшимися из проросших спор. Следует отметить, что этот недостаток можно использовать для выделения спорообразующих чистых культур в методе, называемом **пастеризацией**. Однократный нагрев при 60...80 °С убивает бесспорные микроорганизмы. Пастеризацию проводят при 60...75 °С продолжительностью 15...30 мин. или при 80 °С – 10...15 мин. Иногда нагревают до 90 °С и сразу же охлаждают. Пастеризацию широко применяют в промышленности при переработке пищевых продуктов.

Для стерилизации питательной среды, содержащей термолabile компоненты, можно использовать «холодную» стерилизацию ультрафильтрацией. При стерилизации **ультрафильтрацией** жидкая среда продавливается (0,1...1,0 МПа) через мембранный фильтр, задерживающий микроорганизмы и споры. Мембранные фильтры представляют собой пористые

материалы – мембраны с размерами пор 0,01 – 0,10 мкм. Стерилизуют их в дистиллированной воде автоклавированием или длительным кипячением.

Более просты в употреблении асбестовые и стеклянные фильтры, которые задерживают клетки микроорганизмов не только механически, но и частично из-за адсорбции на стенках пор. Для стерилизации используют отечественные асбестовые фильтры марки «СФ» (стерилизационный фильтр) в виде пластинок толщиной 3...5 мм и диаметром 35 и 140 мм. Перед употреблением асбестовые пластинки монтируют в специальный фильтровальный аппарат – прибор Зейтца, состоящий из двух частей: металлического или стеклянного полого цилиндра и нижней части с опорной сеткой. На опорную сетку кладут асбестовый фильтр и обе части соединяют винтами или зажимами. На трубку нижней части одевается резиновая пробка, посредством которой она вставляется в колбу с тубусом (колбу Бунзена). Приготовленный таким образом фильтр обертывается в бумагу и стерилизуется в автоклаве.

Питательные среды стерилизуются и далее хранятся в сосудах (колбы, пробирки), закрытых ватными пробками и бумажными колпачками. Ватные пробки препятствуют попаданию внутрь микроорганизмов из окружающего воздуха и наоборот, но в то же время они должны быть достаточно пористыми для обеспечения газообмена с окружающей средой. Для изготовления пробок используют гигроскопическую вату, которую разрывают на длинные узкие полосы соответствующей величины. Полосы кладут на стол и загибают внутрь боковые стороны или все четыре края так, чтобы получилась ровная лента шириной около 4...5 см (в длину пробки). Из ленты скатывают валик требуемого диаметра и отрывают остаток ленты. Правильно изготовленная пробка должна легко входить в пробирку (колбу и т. п.), плотно прилегать к ее стенкам, не нарушая газообмена между содержимым пробирки и внешней средой. Форма пробки не должна изменяться после извлечения из сосуда. Ватные пробки обтягивают марлей, такая ватно-марлевая пробка более удобна и имеет более длительный срок использования. Пробки готовят и подбирают к сосудам заблаговременно до разлива питательной среды и стерилизации.

В таблице 1 приведены способы и режимы стерилизации питательных сред, посуды и лабораторных материалов.

Таблица 1 – Способы и режимы стерилизации

№ п/п	Стерилизуемый материал	Способ стерилизации	Режим стерилизации	Примечание
1	Питательные среды: -жидкие и агаризованные, не содержащие компонентов, разлагающихся при 120 °С -жидкие и агаризованные с сахарами и другими соединениями, не выдерживающим и нагревания при 120 °С -сусло-агар	Автоклавиrowание	120 °С (0,1 МПа), 20 мин.	В колбах, пробирках, флаконах и т. д., закрытых ватными пробками с бумажными колпачками
		Автоклавиrowание	110 °С (0,05 МПа), 15...30 мин.	То же
		Дробная стерилизация	Текущий пар (100 °С); 30...60 мин., 3 дня подряд	--“--
		Автоклавиrowание	115 °С (0,07 МПа), 25...40 мин.	--“--
2	Колбы, химические стаканы, флаконы, пробирки	Сухим жаром	160...170 °С, 90 мин.	Закрытые ватными пробками с бумажными колпачками
		Автоклавиrowание	120 °С (0,1 МПа), 20 мин.	То же
3	Чашки Петри, пипетки, шпатели	Сухим жаром	160...170 °С, 90 мин.	Завернутые в бумагу
		Автоклавиrowание	120 °С (0,1 МПа), 30 мин.	То же

№ п/п	Стерилизуемый материал	Способ стерилизации	Режим стерилизации	Примечание
4.	Держатели бактериальных фильтров, резиновые пробки и шланги, фильтры Зейтца	Автоклавирование	120 °С (0,1 МПа), 20 мин.	Завернутые в бумагу
5.	Мембранные фильтры	Автоклавирование Кипячение	110 °С (0,05 МПа), 15 мин. 30 мин. 2...3 раза меняют воду)	В сосуде с дистиллированной водой

4. Понятие о виде, штамме, колонии, чистой культуре микроорганизмов

Исследуемый материал от больного часто представляет смесь микроорганизмов. Выбор исследуемого материала зависит от вида заболевания и преимущественной локализации возбудителя на определенном этапе его развития (патогенеза). Материалом может служить кровь, ликвор, раневое отделяемое, мокрота, испражнения, моча и т. д.

При посеве исследуемого материала на питательные среды необходимо получить не смесь, а отдельные виды микроорганизмов. Микроорганизмы, находящиеся в питательной среде, получили название культуры микроорганизмов. Культуры могут быть чистыми и смешанными.

Поэтому основной задачей является разобшение культур и **получение изолированных колоний**. Изолированная колония как результат размножения одной микробной клетки и, состоящая из одного вида клеток, является основой для получения чистой культуры. Изучение и дальнейшая идентификация полученных культур микробов должна проводиться только в виде однородных популяций (чистых культур).

Под понятием **«чистая культура»** подразумевается популяция микроорганизмов, принадлежащих одному виду, полученная как потомство одной клетки на стерильной питательной среде методом механического разобшения. Культура может расти в виде отдельных колоний на плотной питательной среде.

Совокупность микробов одного вида, выделенных из одного источника в разное время или из разных источников, называется **штаммом**.

Вид – совокупность микроорганизмов, имеющих единое происхождение и генотип, сходных по морфологическим и биологическим свойствам.

Таким образом, **чистые культуры** представлены микроорганизмами одного штамма и вида.

Популяция микробов, являющаяся потомством одной родительской клетки, полученная методом микроманипуляций, называется **клоном**. Клонирование бактериальных популяций возможно как на жидких, так и на плотных питательных средах.

Успех выделения чистой культуры определяется правильностью выбора питательной среды и условий культивирования. Универсальной питательной среды, использование которой позволит выделить любые микроорганизмы из любого исследуемого материала, не существует. Поэтому с учетом физиологических особенностей возможных возбудителей заболевания производится посев материала на определенную питательную среду или комплекс питательных сред (специальные, элективные, дифференциально-диагностические). Для некоторых микроорганизмов требуются и особые условия культивирования (анаэробные, микроаэрофильные, с повышенным содержанием углекислоты).

Бактерии отличаются высоким темпом размножения на различных питательных средах, который характеризуется временем генерации. **Время генерации** – это время между двумя делениями клетки, проходящее от момента появления клетки до момента деления (например, время генерации кишечной палочки – 20 мин., возбудителя туберкулеза – 14 ч). Скорость размножения зависит от вида бактерий и условий культивирования (химического состава питательной среды, ее агрегатного состояния, рН, температуры, аэрации, газового состава, наличия питательных веществ и стимуляторов роста и т. д.).

4.1. Методы выделения чистых культур микроорганизмов

Культивирование микроорганизмов, помимо состава питательной среды, сильно зависит от физических и химических факторов (температура, кислотность, аэрация, свет и т. д.). При этом количественные показатели каждого из них неодинаковы и определяются особенностями метаболизма каждой группы бактерий. Существуют методы культивирования микроорганизмов на твердых и в жидких питательных средах в аэробных, анаэробных и других условиях.

Методы выделения чистых культур аэробных микроорганизмов. Для того чтобы получить изолированные колонии, при нанесении материал распределяют так, чтобы клетки бактерий были удалены друг от друга. Для получения чистой культуры используют две основные группы методов:

- а) методы, основанные на принципе механического разделения микроорганизмов;
- б) методы, основанные на биологических свойствах микроорганизмов.

Методы, основанные на принципе механического разделения микроорганизмов

Рассев шпателем по Дригальскому. Берут 3 чашки Петри с питательной средой. На 1-ю чашку петлей или пипеткой наносят каплю исследуемого материала и растирают шпателем по всей поверхности питательного агара. Затем шпатель переносят во 2-ю чашку и втирают оставшуюся на шпателе культуру в поверхность питательной среды. Далее шпатель переносят в 3-ю чашку и аналогичным образом производят посев. На 1-й чашке вырастает максимальное количество колоний, на 3-й – минимальное. В зависимости от содержания микробных клеток в исследуемом материале на одной из чашек вырастают отдельные колонии, пригодные для выделения чистой культуры микроорганизма.

Метод Пастера (метод разведений). Из исследуемого материала готовят ряд последовательных, чаще десятикратных серийных разведений в жидкой стерильной среде или физиологическом растворе в пробирках. Далее высевают материал газонем по 1 мл из каждой пробирки. Предполагают, что в какой-то из пробирок останется количество микроорганизмов, поддающихся подсчету при высеве на пластинчатые среды. Этот метод дает возможность подсчитать микробное число в исследуемом материале. (Микробное число – количество колоний на последней чашке с ростом микроорганизмов, умноженное на степень разведения материала).

Получение чистой культуры методом посева в глубине среды. Метод Коха (метод заливок). Исследуемый материал в небольшом количестве вносят в пробирку с расплавленным и охлажденным до 45 – 50 °С МПА, перемешивают, затем каплю питательной среды с разведенным материалом переносят во вторую пробирку с расплавленным МПА и т. д. Количество разведений зависит от предполагаемой численности микроорганизмов в исследуемом материале. Приготовленные разведения микробов выливают из пробирок в стерильные чашки Петри, обозначенные номерами, соответствующими номерам пробирок. После застудневания среды с исследуемым материалом чашки помещают в термостат. Количество колоний в чашках с питательной средой уменьшается по мере разведения материала.

Рассев петлей (посев штрихами). Берут одну чашку Петри с питательным агаром и делят ее на 4 сектора, проводя разграничительные линии на внешней стороне дна чашки. Исследуемый материал петлей вносят в первый сектор и проводят ею параллельные линии по всему сектору на расстоянии одна от другой около 5 мм. Этой же петлей, не изменяя ее положения по отношению к агару, проводят такие же линии на других секторах чашки. В том месте, где на агар попало большое количество микробных клеток, рост микроорганизмов будет в виде сплошного штриха. На секторах с небольшим количеством клеток вырастают отдельные колонии. Кроме того, можно наливать разведенные растворы смешанной культуры на поверхность твердых сред в чашках.

Метод фильтрации. Метод основан на пропускании исследуемого материала через специальные фильтры с определенным диаметром пор и

разделении содержащихся микроорганизмов по величине. Этот метод применяется главным образом для очистки вирусов от бактерий, а также при получении фагов и токсинов (в фильтрате – чистый фаг, очищенный токсин).

4.2. Техника посева микроорганизмов

Посевы из нативного материала чаще всего проводят пастеровской пипеткой, из культур микроорганизмов – бактериологической петлей или иглой в зоне пламени горелки. На культуральных сосудах (пробирки, чашки Петри, колбы и т. д.) пишут номер экспертизы, под которой зарегистрирован материал, дату посева.

Посев на жидкую питательную среду. Пробирку с исследуемым материалом и пробирку с питательной средой держат слегка наклонно в левой руке между большим и указательным пальцами так, чтобы края пробирок были на одном уровне (пробирка с исследуемым материалом должна быть первой по отношению к работающему). В правую руку берут бактериологическую петлю (иглу или пипетку) как писчее перо. Пробки от пробирок прижимают мизинцем к ладонной поверхности правой кисти, в зоне пламени горелки пробирки открывают, края пробирок обжигают. Петлю вертикально прокаливают в пламени горелки. Простерилизованную петлю (иглу, пипетку) вводят через пламя горелки в пробирку с посевным материалом. Петлю охлаждают, забирают небольшое количество материала, переносят в пробирку со стерильной питательной средой. Материал стряхивают в среду или, слегка погружая в жидкость петлю, растирают посевной материал по стенке пробирки, не касаясь среды держателем, после чего смывают его средой. Края пробирок и пробки вновь проводят над пламенем горелки, закрывают пробирки пробками, стерилизуют петлю и ставят ее в штатив или стакан. При посеве материала с помощью пипетки использованную пипетку опускают вниз концом в банку с дезинфицирующим раствором.

Посев на плотную питательную среду. Посевы выполняют разными способами. Эти способы основаны на том, что микроорганизмы иммобилизуются на поверхности или в глубине плотной среды.

Посев в пробирку. Материал, забранный петлей, опускают до дна пробирки со скошенным агаром, погружают в конденсационную жидкость и зигзагообразными движениями петлей проводят снизу-вверх, слегка касаясь поверхности среды (посев штрихом). При посеве материала уколом в столбик среды, петлей с материалом или иглой прокалывают вертикально по центру пробирки питательную среду, петлю или иглу вынимают, прожигают. (Правила работы с пробирками и петлей при посеве в пробирку с плотной средой аналогичны правилам при посеве на жидкие питательные среды).

Посев на чашку Петри. Чашку берут в левую руку, большим пальцем левой руки слегка приподнимают крышку, чтобы в образовавшуюся щель свободно проходили петля или шпатель, обжигают на пламени горелки края чашки в зоне щели, вносят посевной материал на поверхность питательной среды, затем растирают его при помощи стеклянного шпателя или бактериологической петли.

Посев петлей:

1. Посев штрихом. Посевной материал втирают петлей в поверхность среды у края чашки, избыток снимают, проколов агар. Оставшийся материал растирают параллельными штрихами по поверхности среды.

2. Посев петлей на секторы: дно чашки расчерчивают на секторы, посев производят зигзагообразными движениями от края чашки к центру так, чтобы штрихи с одного сектора не переходили на другой.

3. Дробный посев: бактериологической петлей с посевным материалом несколько раз делают параллельные штрихи в одном секторе чашки Петри, петлю прожигают в пламени горелки, дают остыть и часть материала из первого сектора (А) распределяют во втором секторе (В) аналогичным способом, затем в третьем (С) и четвертом (Д) секторах.

4. Посев сеточкой с трехкратным прожиганием петли: бактериологической петлей с посевным материалом делают несколько параллельных штрихов в одном секторе чашки Петри, петлю с остатками материала прожигают в пламени спиртовки, дают остыть. Часть материала из первого сектора перпендикулярным штрихом выносят на свободную поверхность чашки, петлю прожигают второй раз и переносят материал из другой части первого сектора штрихом, параллельным предыдущему. Прожигают петлю третий раз и, не касаясь первого сектора, растирают материал по поверхности чашки.

Посев шпателем. Материал наносят на поверхность среды петлей или пипеткой, затем стеклянным или металлическим шпателем тщательно втирают по всей поверхности агара, вращая полуоткрытую чашку. После посева стеклянный шпатель помещают в дезинфицирующий раствор, металлический – прокалывают в пламени горелки.

Посев тампоном. Тампон с исследуемым материалом вносят в чашку и круговыми движениями втирают его содержимое в поверхность среды, одновременно вращая тампон и чашку.

Посев газоном. 1 мл исследуемого материала (жидкая бульонная культура или взвесь микробов в физиологическом растворе) наносят пипеткой на поверхность среды и тщательно распределяют жидкость по всей поверхности чашки. Избыток материала отсасывают пипеткой и вместе с ней помещают в дезинфицирующий раствор.

Посев уколом. Посев уколом в агар столбиком (прямой агар) применяется для выращивания анаэробов или выявления характерного признака микроба, т. к. рост по уколу типичен для ряда бактерий. Посев уколом в полужидкий агар практикуется также с целью длительного хранения культур. При посеве уколом в столбик желатина наблюдается разжижение ее бактериями, обладающими протеолитическим ферментом. Посев уколом в столбик питательной среды производят в пробирку со средой, застывшей в виде столбика. Пробирку берут в левую руку, как обычно, вынимают пробку и обжигают край пробирки, и в центре столбика питательной среды снизу-вверх почти до самого дна пробирки вкалывают петлю с находящимся на ней материалом.

Вопросы для самоконтроля

1. Техника безопасности при работе в микробиологической лаборатории.
2. Отличия требований по охране труда в химической лаборатории от микробиологической лаборатории.
3. Как выглядит знак биологической опасности?
4. Требования, предъявляемые к питательным средам.
5. Виды питательных сред (по назначению, по составу).
6. Способы приготовления питательных сред.
7. Способы и режим стерилизации (оформить в таблице).
8. Методы выделения чистых культур микроорганизмов. Посев, рассев, метод последующих разведений.

Лабораторная работа №1

ОСВОЕНИЕ ТЕХНИКИ МИКРОСКОПИРОВАНИЯ МОРФОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ И ДРОЖЖЕЙ

Цель работы. Изучить устройство микроскопа, освоить технику приготовления препаратов и микроскопирования. Ознакомиться с основными морфологическими группами бактерий и дрожжей.

Основные положения. Микроорганизмами называют живые организмы микроскопических размеров. Из царства животных к микроорганизмам относятся простейшие (одноклеточные животные) и некоторые многоклеточные животные (колониальные и др.). Микромир царства растений представлен низшими грибами (дрожжи, плесени) и водорослями. Третье царство живой природы – царство бактерий целиком входит в микромир.

Для наблюдения за микроорганизмами и изучения их морфологии (внешний вид, форма, строение) используют различные микроскопы. Наиболее широко применяются световые микроскопы, позволяющие наблюдать объект в проходящем свете. Максимальное увеличение таких микроскопов составляет 2000, что дает возможность рассмотреть самые мелкие бактерии (размером менее 0,5 мкм). Большинство бактерий имеют размер около 1 мкм. Так как человеческий глаз способен различать объекты размером около 100 мкм, то чтобы увидеть бактерии, увеличение микроскопа должно быть не менее 100.

Микроскоп – это оптический прибор, позволяющий получить обратное изображение изучаемого объекта и рассмотреть мелкие детали его строения, размеры которых лежат за пределами разрешающей способности глаза.

Чем больше разрешающая способность объектива, тем больше подробностей строения наблюдаемого объекта можно выявить. Для объектива (x8) разрешающая способность равна 1,68 мкм, для объектива (x40) – 0,52 мкм.

Лучший световой микроскоп примерно в 500 раз улучшает возможность человеческого глаза, т. е. его разрешающая способность составляет около 0,2 мкм или 200 нм.

Разрешающая способность и увеличение не одно и то же. Если с помощью светового микроскопа получить фотографии двух линий, расположенных на расстоянии менее 0,2 мкм, то, как бы не увеличивать изображение, линии будут сливаться в одну. Можно получить большое увеличение, но не улучшить его разрешение.

Различают *полезное* и *бесполезное* увеличения. Под полезным понимают такое увеличение наблюдаемого объекта, при котором можно выявить новые детали его строения. Бесполезное – это увеличение, при котором, увеличивая объект в сотни и более раз, нельзя обнаружить новых деталей строения.

Например, если изображение, полученное с помощью микроскопа (полезное!), увеличить еще во много раз, спроецировав его на экран, то новые, более тонкие детали строения при этом не выявятся, а лишь соответственно увеличатся размеры имеющихся структур.

В учебных лабораториях обычно используют *световые микроскопы*, на которых микропрепараты рассматриваются с использованием естественного или искусственного света. Наиболее распространены *световые биологические микроскопы*: БИОЛАМ, МИКМЕД, МБР (микроскоп биологический рабочий), МБИ (микроскоп биологический исследовательский) и МБС (микроскоп биологический стереоскопический). Они дают увеличение в пределах от 56 до 1350 раз. *Стереомикроскоп* (МБС) обеспечивает подлинно объемное восприятие микрообъекта и увеличивает от 3,5 до 88 раз.

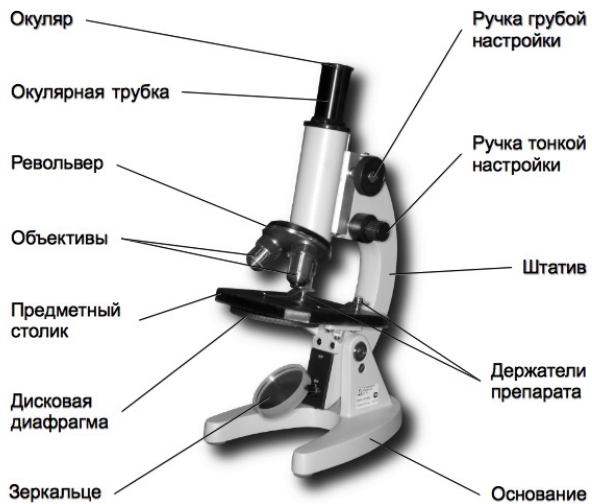
В микроскопе выделяют две системы: *оптическую* и *механическую* (рис. 1). К *оптической системе* относят объективы, окуляры и осветительное устройство (конденсор с диафрагмой и светофильтром, зеркало или электроосветитель).

Объектив – одна из важнейших частей микроскопа, поскольку он определяет *полезное увеличение объекта*. Объектив состоит из металлического цилиндра с вмонтированными в него линзами, число которых может быть различным. Увеличение объектива обозначено на нем цифрами. В учебных целях используют обычно объективы $\times 8$ и $\times 40$. Качество объектива определяет его разрешающая способность.

Объектив требует очень бережного обращения, особенно это касается объективов с большим увеличением, т. к. у них рабочее расстояние, т. е. расстояние от покровного стекла до фронтальной линзы, измеряется десятками долями миллиметра. Например, рабочее расстояние для объектива ($\times 40$) составляет 0,6 мм.

Окуляр устроен намного проще объектива. Он состоит из 2 – 3 линз, вмонтированных в металлический цилиндр. Между линзами расположена постоянная диафрагма, определяющая границы поля зрения. Нижняя линза фокусирует изображение объекта, построенное объективом в плоскости диафрагмы, а верхняя служит непосредственно для наблюдения. Увеличение окуляров обозначено на них цифрами: $\times 7$, $\times 10$, $\times 15$. Окуляры не выявляют новых деталей строения, и в этом отношении их увеличение *бесполезно*. Таким образом, окуляр, подобно лупе, дает прямое, мнимое, увеличенное изображение наблюдаемого объекта, построенное объективом.

Для определения *общего увеличения микроскопа* следует умножить увеличение объектива на увеличение окуляра. Например, если окуляр дает 10-кратное увеличение, а объектив – 20-кратное, то общее увеличение $10 \times 20 = 200$ раз.



Внешний вид микроскопа Биомед 1



Внешний вид микроскопа Биомед 2

Рис. 1. Внешний вид микроскопов Биомед 1 и Биомед 2

Осветительное устройство состоит из зеркала или электроосветителя, конденсора с ирисовой диафрагмой и светофильтром, расположенных под предметным столиком. Они предназначены для освещения объекта пучком света.

Зеркало служит для направления света через конденсор и отверстие предметного столика на объект. Оно имеет две поверхности: плоскую и вогнутую. В лабораториях с рассеянным светом используют вогнутое зеркало.

Электроосветитель устанавливается под конденсором в гнездо подставки.

Конденсор состоит из 2 – 3 линз, вставленных в металлический цилиндр. При подъеме или опускании его с помощью специального винта соответственно конденсируется или рассеивается свет, падающий от зеркала на объект.

Ирисовая диафрагма расположена между зеркалом и конденсором. Она служит для изменения диаметра светового потока, направляемого зеркалом через конденсор на объект, в соответствии с диаметром фронтальной линзы объектива и состоит из тонких металлических пластинок. С помощью рычажка их можно то соединить, полностью закрывая нижнюю линзу конденсора, то развести, увеличивая поток света.

Кольцо с матовым стеклом или *светофильтром* уменьшает освещенность объекта. Оно расположено под диафрагмой и передвигается в горизонтальной плоскости.

Механическая система микроскопа состоит из подставки, коробки с микрометренным механизмом и микрометренным винтом, тубуса, тубусодержателя, винта грубой наводки, кронштейна конденсора, винта перемещения конденсора, револьвера, предметного столика.

Подставка – это основание микроскопа.

Коробка с микрометренным механизмом, построенном на принципе взаимодействующих шестерен, прикреплена к подставке неподвижно. Микрометренный винт служит для незначительного перемещения тубусодержателя, а, следовательно, и объектива на расстояния, измеряемые микрометрами. Полный оборот микрометренного винта передвигает тубусодержатель на 100 мкм, а поворот на одно деление опускает или поднимает тубусодержатель на 2 мкм. Во избежание порчи микрометренного механизма разрешается крутить микрометренный винт в одну сторону *не более чем на половину оборота*.

Тубус или *трубка* – цилиндр, в который сверху вставляют окуляры. Тубус подвижно соединен с головкой тубусодержателя, его фиксируют стопорным винтом в определенном положении. Ослабив стопорный винт, тубус можно снять.

Револьвер предназначен для быстрой смены объективов, которые винчиваются в его гнезда. Центрированное положение объектива обеспечивает защелка, расположенная внутри револьвера.

Тубусодержатель несет тубус и револьвер.

Винт грубой наводки используют для значительного перемещения тубусодержателя, а, следовательно, и объектива с целью фокусировки объекта при малом увеличении.

Предметный столик предназначен для расположения на нем препарата. В середине столика имеется круглое отверстие, в которое входит фронтальная линза конденсора. На столике имеются две пружинистые клеммы – зажимы, закрепляющие препарат.

Кронштейн конденсора подвижно присоединен к коробке микрометричного механизма. Его можно поднять или опустить при помощи винта, вращающего зубчатое колесо, входящее в пазы рейки с гребенчатой нарезкой.

Правила работы с микроскопом

При работе с микроскопом необходимо соблюдать операции в следующем порядке:

1. Работать с микроскопом следует сидя.
2. Микроскоп осмотреть, вытереть от пыли мягкой салфеткой объективы, окуляр, зеркало или электроосветитель.
3. Микроскоп установить перед собой, немного слева на 2 – 3 см от края стола. Во время работы его не сдвигать.
4. Открыть полностью диафрагму, поднять конденсор в крайнее верхнее положение.
5. Работу с микроскопом всегда начинать с малого увеличения.
6. Опустить объектив 8 в рабочее положение, т. е. на расстояние 1 см от предметного стекла.
7. Установить освещение в поле зрения микроскопа, используя электроосветитель или зеркало. Глядя одним глазом в окуляр и пользуясь зеркалом с вогнутой стороной, направить свет от окна в объектив, а затем максимально и равномерно осветить поле зрения. Если микроскоп снабжен осветителем, то подсоединить микроскоп к источнику питания, включить лампу и установить необходимую яркость горения.
8. Положить микропрепарат на предметный столик так, чтобы изучаемый объект находился под объективом. Глядя сбоку, опускать объектив при помощи макровинта до тех пор, пока расстояние между нижней линзой объектива и микропрепаратом не станет 4 – 5 мм.
9. Смотреть одним глазом в окуляр и вращать винт грубой наводки на себя, плавно поднимая объектив до положения, при котором хорошо будет видно изображение объекта. *Нельзя смотреть в окуляр и опускать объектив.* Фронтальная линза может раздавить покровное стекло, и на ней появятся царапины.
10. Передвигая препарат рукой, найти нужное место, расположить его в центре поля зрения микроскопа.

11. Если изображение не появилось, то надо повторить все операции пунктов 6 – 9.

12. Для изучения объекта при большом увеличении сначала нужно поставить выбранный участок в центр поля зрения микроскопа при малом увеличении. Затем поменять объектив на 40 х, поворачивая револьвер так, чтобы он занял рабочее положение. При помощи микрометричного винта добиться хорошего изображения объекта. На коробке микрометричного механизма имеются две риски, а на микрометричном винте – точка, которая должна все время находиться между рисками. Если она выходит за их пределы, ее необходимо вернуть в нормальное положение. При несоблюдении этого правила, микрометричный винт может перестать действовать.

13. Для работы с иммерсионным объективом (увеличение 90) на поверхность покровного стекла наносят каплю иммерсионного масла (кедровое масло), в которую затем погружают объектив. Использование кедрового масла позволяет избежать рассеяния света, возникающего из-за преломления световых лучей при переходе из стекла в воздух (рис. 2). В результате удастся получить хорошую освещенность.

14. По окончании работы с большим увеличением, установить малое увеличение, поднять объектив, снять с рабочего столика препарат, протереть чистой салфеткой все части микроскопа, накрыть его полиэтиленовым пакетом и поставить в шкаф.

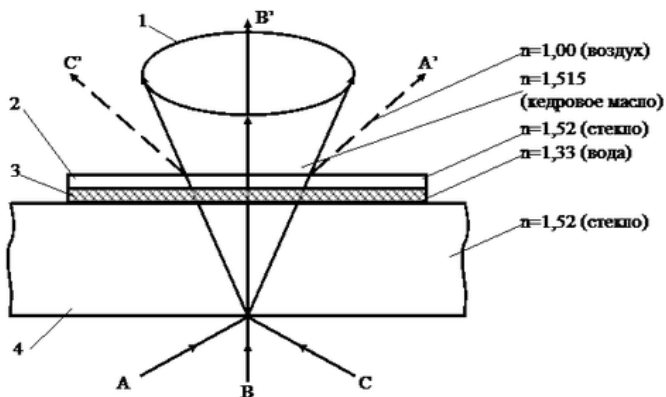


Рис. 2. Ход лучей в иммерсионной (сплошная линия) и сухой (пунктирная линия) системах:

1 – линза объектива 90; 2 – покровное стекло; 3 – водная суспензия микроорганизмов; 4 – предметное стекло; А, В, С – световые лучи от конденсора; n – показатель преломления света (для желтых лучей)

Поле зрения светового микроскопа представляет собой круг, диаметром (визуально) 120 мм. При увеличении 600 (объектив 40, окуляр 15) фактический диаметр поля зрения 200 мкм, а при увеличении 120 (объектив 8, окуляр 15) – 1000 мкм. При оценке размеров бактерий и дрожжевых клеток можно использовать масштаб: 1 мм (визуально) – 2 мкм (при увеличении 600). Например, по визуальному замеру размер клетки 2 мм, тогда фактический размер составит 4 мкм.

Клетки, внутри которых в световой микроскоп видно ядро, получили название эукариоты. Клетки, у которых ядро отсутствует, называют прокариотами. По современной классификации к прокариотам относятся все бактерии, к эукариотам – клетки растений и животных.

Большинство бактериальных клеток имеют форму сферы, цилиндра или спирали. Классификация бактерий по форме клеток показана на рис. 3. Дрожжевые клетки имеют, как правило, сферическую или эллипсоидальную форму; средний размер клеток около 5 мкм.



Рис. 3. Основные формы бактериальных клеток:

- 1 – кокки; 2 – диплококки; 3 – тетракокки; 4 – сарцины; 5 – стрептококки;
6 – палочки (одиночная клетка и цепочка клеток); 7 – вибрионы;
8 – спириллы; 9 – спирохеты

Задание

1. Изучить устройство световых микроскопов. Запомнить названия и назначение их частей.
2. Приготовить прижизненный препарат смешанной бактериально-дрожжевой культуры.
3. Выявить и зарисовать с указанием размеров основные и морфологические группы бактерий и дрожжевые метки.
4. Оценить концентрацию бактерий и дрожжей.

Ход работы

1. Приготовление прижизненного препарата.

На предварительно обезжиренное предметное стекло (рис. 4а) нанести пипеткой каплю микробной культуры (объем капли $0,05 \div 0,1$ мл). Растекшаяся капля должна иметь диаметр около 1 см. Если капля не растекается, следует ее удалить и дополнительно обезжирить стекло (вымыть с мылом, протереть

спиртом), в противном случае получится препарат, насыщенный пузырьками воздуха; что не позволит проводить микроскопирование.

Накрыть каплю покровным стеклом (рис. 4б). Для получения хорошего препарата (без пузырьков воздуха) покровное стекло ставят под углом около 30 градусов (рис. 5а) на предметное стекло в сторону капли, пока не произойдет смачивание (рис. 5б). После этого плавно опускают покровное стекло (см. рис. 5в).

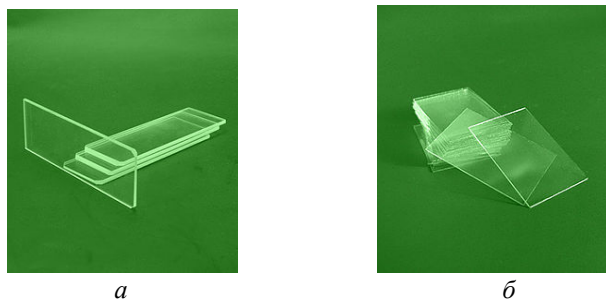


Рис.4. Предметные (а) и покровные (б) стекла

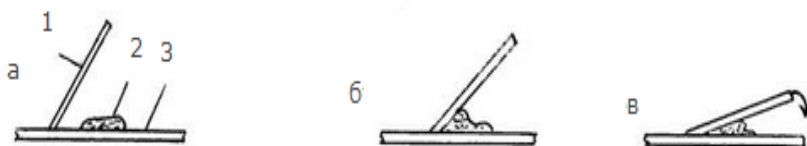


Рис. 5. Приготовление препарата (пояснения в тексте): 1 – покровное стекло; 2 – капля; 3 – предметное стекло

Если часть жидкости выдавливается из-под покровного стекла, то этот избыток аккуратно удаляют фильтровальной бумагой, не касаясь покровного стекла. Приготовленный препарат размещается в центре предметного столика микроскопа и закрепляется зажимами.

В том случае, если микропрепарат сделан неаккуратно, между стеклами есть пузырьки воздуха, следует повторить действия.

2. Микроскопирование прижизненного препарата смешанной бактериальнодрожжевой культуры.

Настроить освещение, установить в рабочее положение объектив 8 (окуляр 15) и с помощью микрометрического винта добиться резкого изображения объекта (в виде точек видны дрожжевые клетки). Затем, повернув револьвер,

поставить в рабочее положение объектив 40 и сфокусировать изображение микрометрическим винтом.

Передвигая предметный столик, просмотреть препарат, выявить и зарисовать различные формы бактерий и дрожжей. Размеры клеток определить визуально по масштабу: 1 мм (визуально) – 2 мкм.

3. Оценка концентраций бактерий и дрожжей.

Оценить среднее расстояние между дрожжевыми клетками (r_g) и клетками бактерий (r_δ), рассчитать концентрацию клеток по формулам:

$$n_g = \frac{10^{12}}{r_g^3} \quad (1) \quad n_\delta = \frac{10^{12}}{r_\delta^3}, \quad (2)$$

где r – расстояние между клетками мкм; n – концентрация клеток /мл.

Для оценки концентрации микроорганизмов в единицах абсолютно сухого веса (а.с.в.) следует определить средний объем клеток бактерий и дрожжей. При этом дрожжевые клетки можно аппроксимировать сферой, диаметром d_g . Тогда объем дрожжевой капли:

$$V_g \cong 0,5 \times d_g^3, \text{ мкм}^3. \quad (3)$$

При плотности клетки $\rho_g = 0,1 \text{ г а.с.в./м}^3$ масса дрожжевой клетки составит:

$$m_g = \rho_g \times V_g = 0,005 \times d_g^3 \times 10^{-12}, \text{ г}. \quad (4)$$

Концентрация дрожжевых клеток:

$$X_g = m_g \times n_g \times 10^3, \text{ г.а.с.в./л}. \quad (5)$$

Среднюю массу бактериальной клетки можно принять равной $4 \cdot 10^{-13} \text{ г}$, тогда концентрация бактерий:

$$X_\delta = 4 \times 10^{-13} \times n_\delta \times 10^3 = 4 \times 10^{-10} \times n_\delta, \text{ г.а.с.в./л}. \quad (6)$$

Общая концентрация микроорганизмов:

$$X = X_g + X_\delta. \quad (7)$$

Вопросы для самоконтроля

1. Устройство светового микроскопа.
2. Правила работы с микроскопом.
3. Из каких частей состоит оптический микроскоп?
4. Что такое разрешающая способность?
5. Приготовление прижизненного препарата активного ила.
6. В рабочей тетради укажите названия элементов светового микроскопа, соответствующие цифрам на рис. 6.

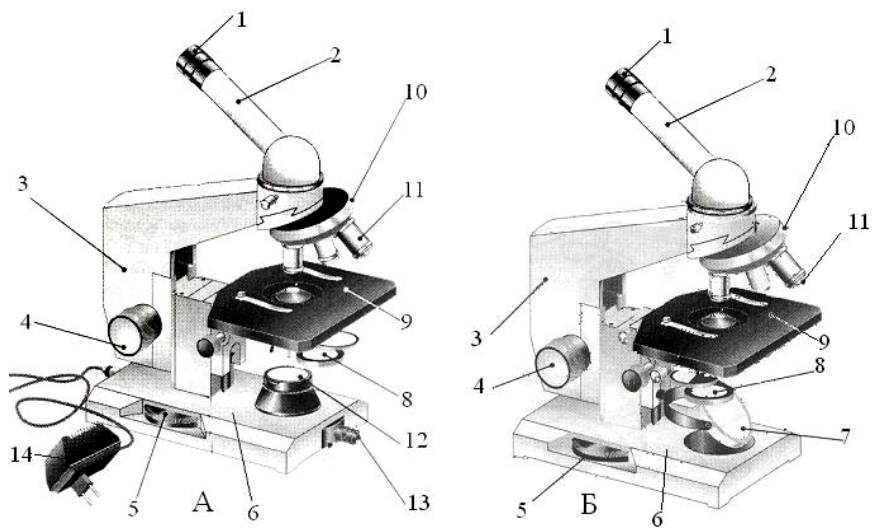


Рис. 6. Устройство микроскопа

Лабораторная работа № 2

МИКРОФАУНА И СТРУКТУРА ХЛОПЬЕВ АКТИВНОГО ИЛА

Цель работы. Ознакомиться с микроскопическими животными активного ила и его структурой.

Основные положения. Микрофауна активного ила представлена в основном простейшими (одноклеточные животные) и коловратками. Реже в активном иле присутствуют черви, водные клещи и низшие рачки.

Простейшие делятся на несколько классов, которые подразделяются на подклассы, отряды, роды и виды. В активном иле встречаются представители трех классов простейших: серповидные, жгутиковые и инфузории.

Класс серповидных включает два подкласса: корненожки и солнечники. Подкласс корненожек включает два отряда: голые корненожки и раковинные корненожки.

К голым корненожкам относятся представители рода амеба и рода пеломикса.

Род амеба включает много видов, одни из которых развиваются при хорошей очистке (*Amoeba radiosa*, *Amoeba proteus*), другие – при плохой очистке сточных вод (*Amoeba limax* – см. рис. 7). В общем случае большое количество мелких амев свидетельствует о низкой эффективности биологической очистки, а присутствие в небольшом количестве крупных амев – показатель хорошей очистки.

Пеломикса отличается от обычных амев большими размерами (до 2 мм) и широколопастными псевдоподиями. При плохой очистке в активном иле иногда развивается *Pelomyxa palustris* (см. рис. 7).

У раковинных корненожек тело находится в домике, состоящем только из органического вещества, например, род *Pamphagus* или пропитанного кремнием, железом, кальцием (у рода *Arcella Pamphagus hyalinus* (рис. 7) развивается при плохой очистке). Представители рода *Arcella* (*Arcella discoidea*, *Arcella vulgaris*) обычно содержатся в хорошо работающих аэротенках.

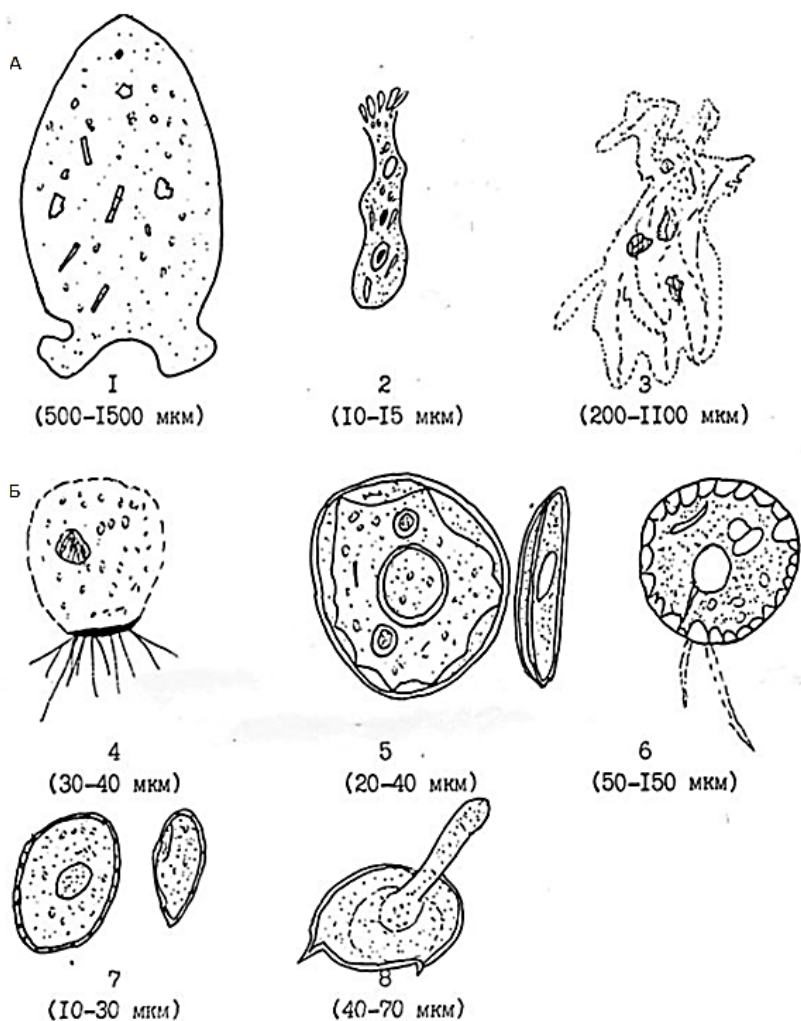


Рис. 7. Корненожки:

А – голые корненожки: 1 – *Pelomixa palustris*;

2 – *Amoeba limax*; 3 – *Amoeba baproteus*;

Б – раковинные корненожки: 4 – *Pamphagus hyalinus*; 5 – *Arcella discoides*;

6 – *Arcella vulgaris*; 7 – *Centropyxis laevigata*; 8 – *Centropyxis aculeata*

Жгутиковые разделяются на бесцветных и окрашенных (обычно зеленого цвета). Размер жгутиковых, как правило, не превышает $40 \div 50$ мкм. В активных илах преобладают мелкие бесцветные жгутиковые родов *Volvox* и *Oicomonas*

(рис. 8), имеющие размер $10 \div 25$ мкм. Большое количество мелких жгутиковых указывает на плохую очистку сточных вод.

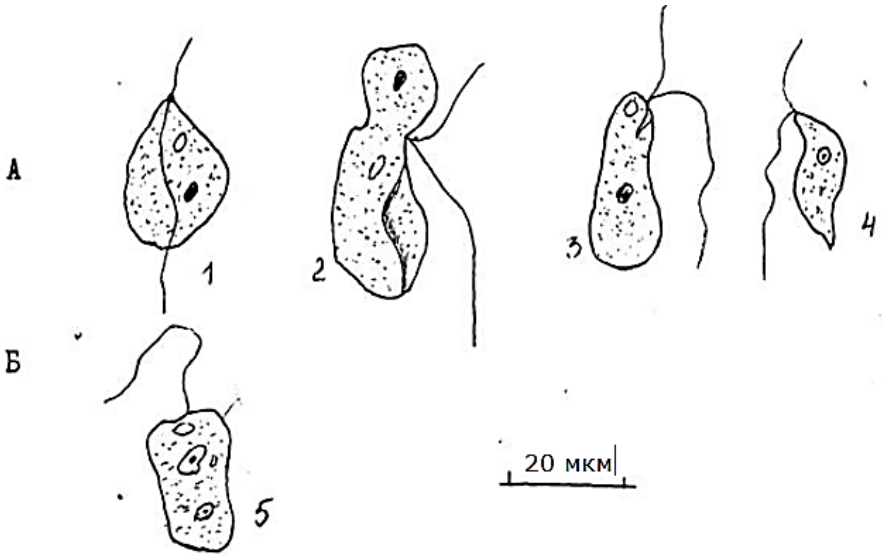


Рис. 8. Жгутиковые:

- А – род *Bodo*: 1 – *Bodo globosus*; 2 – *Bodo edax*; 3 – *Bodo saltans*;
4 – *Bodo putrinus*;
Б – род *Oicomonas*: 5 – *Oicomonas socialis*

Класс инфузорий делится на ресничные и сосущие инфузории. В зависимости от строения ресничного аппарата выделяют равноресничные, спиралересничные и кругоресничные инфузории.

У равноресничных инфузорий все тело (или большая его часть) покрыто ресничками, околотротовые реснички не имеют спирального расположения (рис. 9).

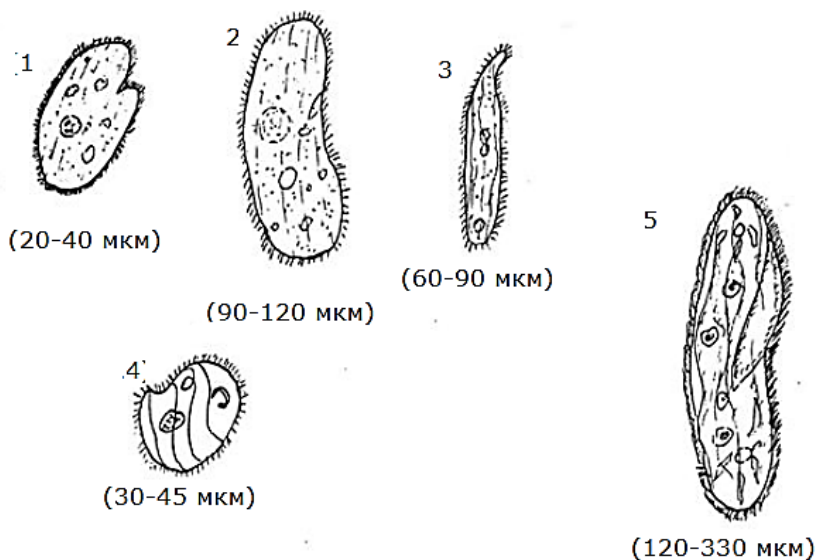


Рис. 9. Равноресничные инфузории:

1 – *Colpoda steini*; 2 – *Colpidium colpoda*; 3 – *Litonotus lamella*;
 4 – *Cinetochilum margaritaceum*; 5 – *Paramecium caudatum*

Спиралересничные инфузории имеют околоротовую спираль из ресничек. Из этого подкласса в активном иле широко распространены представители отряда брюхоресничных инфузорий, такие как *Aspidisca*, *Oxytricha*, *Stylonichia*, *Euplotes* (рис. 10).

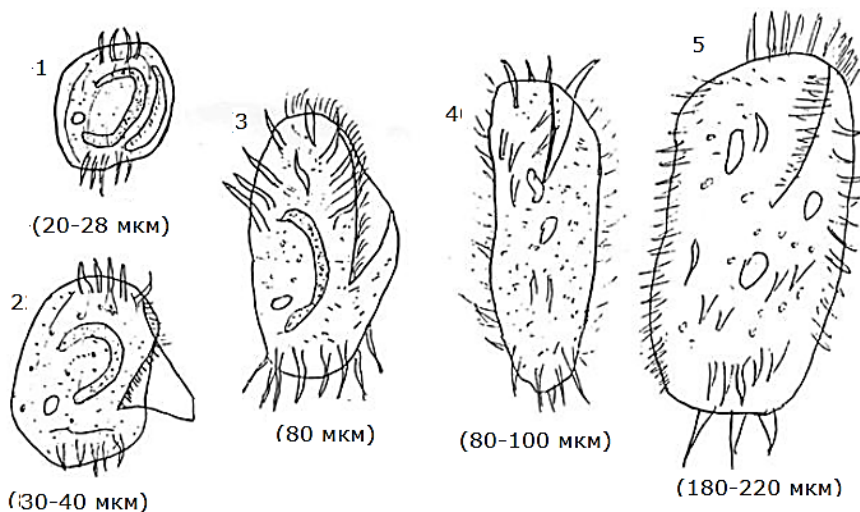


Рис. 10. Спиралересничные инфузории:
 1 – *Aspidisca tunida*; 2 – *Aspidisca costata*; 3 – *Euplotes haron*;
 4 – *Oxytricha pellionella*; 5 – *Stylonichia pustulata*

Равноресничные и спиралересничные инфузории свободноплавающие. В отличие от них кругоресничные инфузории прикрепляются с помощью стебелька к хлопьям активного ила и ведут сидячий образ жизни (рис. 11). Кругоресничные инфузории, также как спиралересничные, загоняют пищу (бактерии) в ротовое отверстие за счет движения околоротовых ресничек.

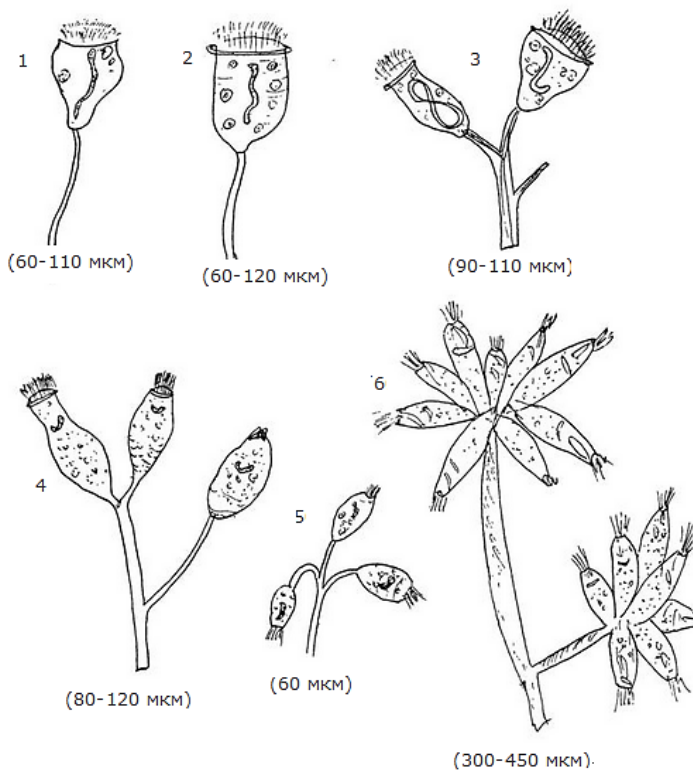


Рис. 11. Кругоресничные инфузории:

1 – *Vorticella microstoma*; 2 – *Vorticella convalaria*; 3 – *Carchesium spectabile*; 4 – *Epistylis plicatilis*; 5 – *Opercularia coarctata*; 6 – *Opercularia glomerata*

Сосущие инфузории не имеют ресничек. Они крепятся к хлопьям ила с помощью шупалец, внутри которых проходит канал, и высасывают пищу из хлопьев. Некоторые сосущие инфузории показаны на рис. 12.

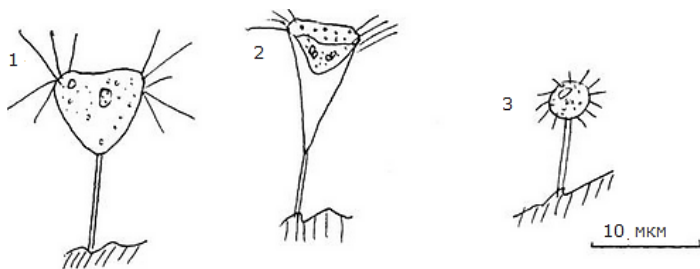


Рис. 12. Сосущие инфузории (размер $10 \div 28$ мкм):
1 – *Tokophrya lemnarum*; 2 – *Acineta flava*; 3 – *Podophrya fixa*

Коловратки относятся к многоклеточным микроскопическим животным. Тело коловратки состоит из трех отделов: грудь (туловище), покрытая панцирем, голова с коловращательным аппаратом, нога, служащая для прикрепления к хлопьям ила. В активном иле наиболее часто встречаются свободноплавающие формы коловраток, такие как *Philodina roseola*, *Cathypna luna*, *Notommata ansata* (рис. 13).

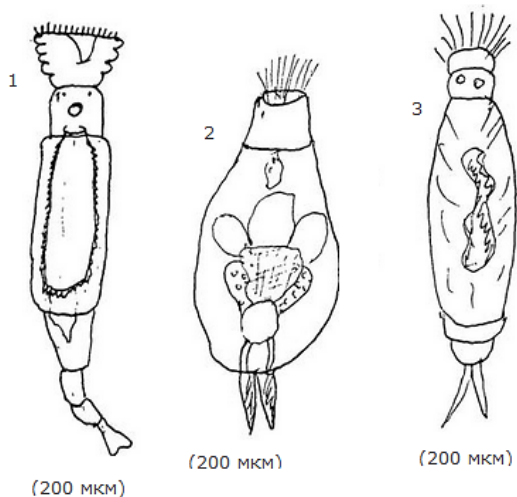


Рис. 13. Коловратки:
1 – *Philodina roseola*; 2 – *Cathypna luna*; 3 – *Notommata ansata*

При наличии в аэротенке застойных зон в активном иле могут появиться черви, в частности, круглые черви (нематоды) и малощетинковые кольчатые

черви (олигохеты). У нематод (рис. 14) тело гладкое, круглое, суженное на обоих концах. Один конец тела является головным, в центре головного конца расположено ротовое отверстие, вокруг которого имеются подвижные губы, снабженные сосочками и щетинками. Тело олигохет состоит из сегментов и снабжено щетинками (рис. 14).

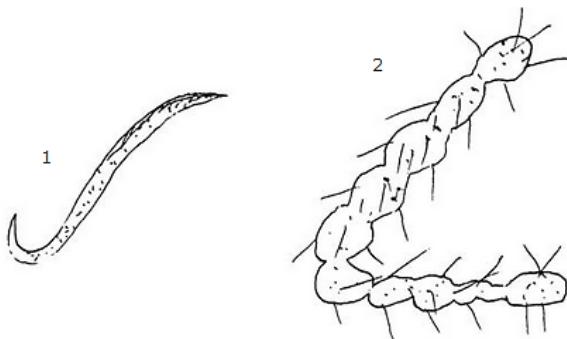


Рис. 14. Черви:

- 1 – круглый червь Nematoda (размер до $5 \div 10$ мм);
2 – малощетинковый червь Aelosoma (размер до $10 \div 20$ мм)

Хлопья активного ила (рис. 15) образуются в результате биофлокуляции бактерий. В перемешиваемой среде (аэротенке) хлопья ила являются динамическими структурами: крупные хлопья разрушаются в турбулентном жидкостном потоке, мелкие хлопья при соударении слипаются в более крупные. Обычно размер хлопьев находится в диапазоне $10 \div 200$ мкм, но при слабом перемешивании хлопья быстро укрупняются, достигая размеров $1 \div 5$ мм.

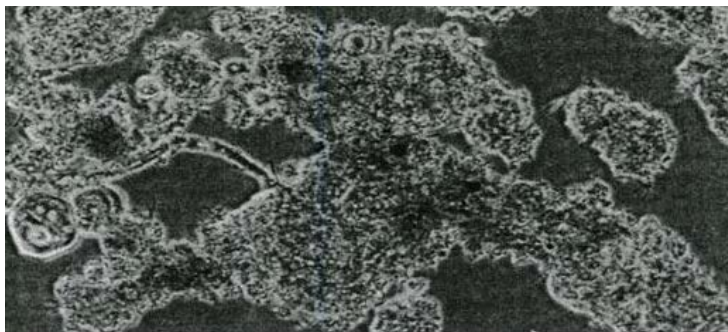


Рис. 15. Хлопья активного ила под микроскопом при увеличении в 200 раз

Хлопья (флокулы) активного ила состоят из микроорганизмов, органических и неорганических частиц. Наличие плотных флокул правильной формы, содержащих простейшие, указывает на здоровое состояние биомассы. При ингибировании или других нарушениях режима простейшие погибают одновременно с разрушением структуры хлопьев. Нитчатые бактерии (на рис. 15 не видны) понижают осаждаемость флокул и их способность концентрироваться.

Задание

1. Приготовить и промикроскопировать прижизненный препарат активного ила, идентифицировав встречающихся микроскопических животных и зарисовав их с указанием размеров.

2. Зарисовать типичные хлопья активного ила, оценить средний размер хлопьев и их структуру (компактные, рыхлые).

Ход работы

1. Собрать и настроить микроскоп. Приготовить прижизненный препарат активного ила. Просмотреть препарат при увеличении 120 (объектив 8, окуляр 15).

2. Для идентификации простейших и других микроскопических животных использовать рис. 7 – 14 (идентификация проводится по внешнему виду). Перед переходом на увеличение 600 (объектив 40, окуляр 15) необходимо предварительно размещать исследуемый объект в центре поля зрения. Размер микроорганизмов определить визуально, исходя из масштаба, например, при увеличении 600:1 см (визуально) – 20 мкм.

3. Определение среднего размера хлопьев выполнить при увеличении 120, используя масштаб: 1 см (визуально) – 100 мкм. Структуру хлопьев установить при увеличении 600, зарисовав типичные хлопья.

Вопросы для самоконтроля

1. Принцип работы аэротенков. Устройство аэротенков.
2. Для удаления каких примесей, содержащихся в сточных водах, применяется биологическая очистка?
3. Что представляет собой активный ил, в результате какого процесса он образуется?
4. Что Вы понимаете под термином биофлокуляция?
5. > Какими микроорганизмами представлена микрофауна активного ила? Какие у них отличительные признаки и как их идентифицировать под микроскопом?
6. Что такое застойные зоны в аэротенке? В результате чего образуются?
7. Какие виды хлопьев активного ила бывают, в чем их отличие, как их идентифицировать под микроскопом?
8. Какие хлопья активного ила лучше использовать для биологической очистки: рыхлые или компактные? Почему?

Лабораторная работа № 3

БИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АКТИВНОГО ИЛА

Цель работы. Научиться оценивать состояние активного ила и процесс биологической очистки в аэротенке по результатам микроскопирования.

Основные положения. Простейшие и колеровки очень чувствительны к химическим и физическим факторам среды. Они быстро реагируют на изменение концентрации органических веществ и кислорода, на содержание токсичных примесей и другие факторы. Это позволяет использовать их как индикаторные организмы, характеризующие работу аэротенков, и по результатам микроскопирования определять состояние процесса биологической очистки, а также оперативно выявлять нежелательные изменения, ведущие к нарушению нормальной работы очистных сооружений.

Биологический анализ активного ила включает анализ состава биоценоза с учетом структуры хлопьев ила. В основе биологического анализа лежит корреляция между качеством среды (сточной воды) и состоянием активного ила. Цель биологического анализа – оперативный контроль процесса биологической очистки. Преимущество биологического анализа в том, что изменения биоценоза активного ила начинаются раньше, чем происходят заметные изменения технологических параметров, например, эффективности очистки. Поэтому контроль процесса путем биологического анализа позволяет на самых ранних стадиях заметить ухудшение очистки и вовремя нормализовать работу очистных сооружений.

Зависимость состава биоценоза активного ила от качества среды (сточной воды) определяется следующими факторами:

- бактерии более устойчивы к токсичным примесям и высокой концентрации органических веществ, чем простейшие;
- различные виды простейших имеют различную чувствительность к токсичным примесям, концентрации растворенных органических веществ и кислорода;
- различные группы простейших используют разные способы питания (голофитное, сапрозойное, голозойное).

Голофитное питание – это использование неорганических веществ в качестве источника углерода для биосинтеза, а света – в качестве источника энергии. Такой тип питания имеют окрашенные жгутиковые.

Сапрозойное питание – использование растворенных органических веществ. Эта форма питания присуща мелким бесцветным жгутиковым.

Голозойное питание – использование взвешенных органических веществ (в основном, бактерий). По голозойному типу питаются крупные бесцветные жгутиковые и все другие простейшие (амебы, инфузории).

Голозойное питание делится на 3 типа:

- заглатывание – используют все амебы, крупные бесцветные жгутиковые и некоторые равноресничные инфузории;

– осаждение или седиментация (движение ресничек около ротового отверстия создает водоворот в виде воронки, в которой взвешенные частицы осаждаются и поступают в ротовое отверстие) – используют все кругоресничные и спиралересничные инфузории, а также часть равноресничных инфузорий, например, инфузория туфелька (*Paramecium caudatum*); эти микроорганизмы называют седиментаторами;

– высасывание – используют сосущие инфузории.

По мере уменьшения концентрации растворенных органических веществ в сточной воде снижается концентрация свободноплавающих бактерий, которые питаются растворенными веществами. При дальнейшем уменьшении концентрации органических веществ начинают развиваться простейшие, наиболее устойчивые к высокой концентрации растворенных органических веществ (амебы, сосущие инфузории) и использующие их в качестве источника питания (мелкие бесцветные жгутиковые). Затем появляются другие простейшие и коловратки (рис. 16). При низкой концентрации бактерий (что отвечает низкой концентрации субстрата) преимущество получают седиментаторы, имеющие более эффективный аппарат потребления взвешенных веществ (бактерий) из среды.

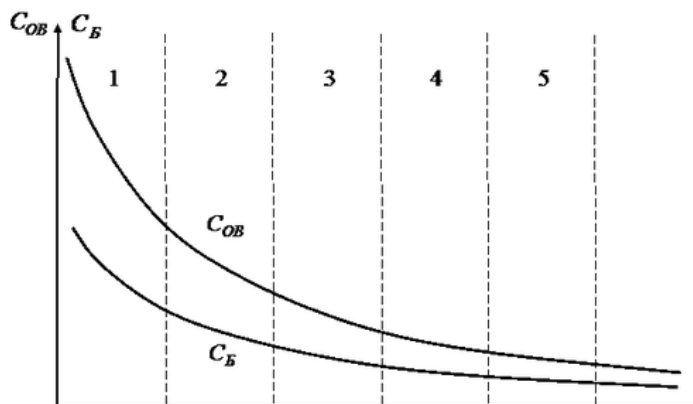


Рис. 16. Изменение биоценоза активного ила по мере уменьшения концентрации растворенных органических веществ ($C_{ОВ}$) и свободноплавающих бактерий ($C_{Б}$):

1 – область, где в биоценозе присутствуют только бактерии (простейших и коловраток нет); 2 – простейшие представлены жгутиковыми, амебами, реже развиваются сосущие инфузории; 3 – развиваются многие виды инфузорий (в основном использующие голозойное питание путем заглатывания пищи), а также амебы и жгутиковые; 4 – присутствуют все виды простейших, развиваются коловратки; 5 – жгутиковых очень мало, среди ресничных инфузорий преобладают седиментаторы, много коловраток

При низкой концентрации органических веществ начинают испытывать голодание бактерии. При недостатке внепланового субстрата бактерии получают энергию, необходимую для поддержания жизнедеятельности, путем самоокисления. Потребление кислорода в процессе самоокисления называется эндогенным дыханием, а продукты самоокисления (минеральные вещества) – эндогенными веществами. Эти эндогенные вещества скапливаются в хлопьях или в виде минеральных частиц, которые в световой микроскоп наблюдаются как темные зерна (участки минерализации).

В соответствии с рассмотренными тенденциями состояния активного ила в зависимости от качества биологической очистки упрощенно можно представить следующим образом.

1. Высоконагруженный активный ил, развивающийся в аэротенках неполной биологической очистки (эффект очистки по БПК₅ меньше 90 %), имеет следующие характеристики:

- хлопья активного ила в основном мелкие (размер менее 50 мкм), участки минерализации отсутствуют;
- много свободноплавающих бактерий (около 10⁸ 1/мл);
- коловраток нет;
- мало или отсутствуют кругоресничные и спиралересничные инфузории;
- много (преобладают) мелких жгутиковых, а также амёб.

2. Среднеагруженный активный ил, развивающийся в аэротенках полной биологической очистки (эффект очистки по БПК₅ около 90 ÷ 95 %):

- хлопья активного ила компактные, среднего размера (около 100 мкм), участков минерализации мало (встречаются в отдельных хлопках);
- концентрация свободноплавающих бактерий 106 – 108 1/мл (при концентрации ила около 1 г/л);
- в небольшом количестве имеются коловратки;
- наблюдается большое разнообразие видов простейших без существенного (в десятки раз) преобладания какого-либо вида, встречаются все группы простейших (амёбы, жгутиковые, равноресничные, спиралересничные и кругоресничные инфузории, сосущие инфузории).

3. Низконагруженный активный ил, развивающийся в аэротенках полной биологической очистки с нитрификацией (эффект очистки по БПК₅ до 95 – 97 %):

- хлопья активного ила рыхлые с большим разнообразием размеров (много обрывков хлопьев размером около 10 мкм), много участков минерализации;
- количество свободноплавающих бактерий невелико (105 – 106 1/мл);
- простейших сравнительно мало, преобладают седиментаторы (кругоресничные и спиралересничные инфузории), практически отсутствуют мелкие бесцветные жгутиковые;
- присутствуют коловратки (могут развиваться в большом количестве).

Примерная количественная характеристика биоценоза активного ила для трех рассмотренных состояний приведена в табл. 2.

Приведенная характеристика состояния активного ила может существенно изменяться в случае не стационарности режима биологической очистки (изменение концентрации сточных вод, кислорода, температуры, pH и т. д.).

Существенно влияет на биоценоз активного ила токсичность сточных вод. При биологической очистке промышленных стоков с высоким содержанием токсичных примесей количество простейших будет ниже, чем в табл. 2, меньше разнообразие видов, могут отсутствовать коловратки (или развиваться только наиболее устойчивые из них, такие как *Notommata*).

Некоторые типичные изменения биоценоза активного ила при изменении характеристики сточных вод и параметров процесса очистки приведены в табл. 3.

Таблица 2 – Ориентировочное содержание индикаторных микроорганизмов в иле в квазистационарном режиме работы аэротенков при хорошей аэрации, невысокой токсичности и средней концентрации БПК₅ (150 – 500 мг/л) сточных вод, поступающих на очистку

Микроорганизмы	Кол-во микроорганизмов (тыс. шт. на 1 г активного ила)		
	Низконагру- женный ил	Среднеагру- женный ил	Высоконагру- женный ил
Жгутиковые	10÷200	200÷2000	1000÷20000
Амебы	10÷100	100÷1000	100÷5000
Равноресничные инфузории	10÷100	100÷500	100÷1000
Спиралересничные инфузории	20÷200	100÷500	0÷100
Кругоресничные инфузории	100÷500	100÷1000	0÷100
Сосущие инфузории	10÷50	10÷100	100÷1000
Цисты простейших	50÷200	10÷100	1000÷5000
Коловратки	20÷200	10÷100	0
Свободноплавающие бактерии	10 ⁵ ÷ 10 ⁶	10 ⁶ ÷ 10 ⁸	10 ⁸ ÷ 10 ⁹

Таблица 3 – Изменения биоценоза активного ила

Технологические изменения процесса биологической очистки в аэротенках	Ответные изменения в биоценозе активного ила
Снижение концентрации растворенного кислорода	Преобладание мелких жгутиковых, а также устойчивых к низким концентрациям кислорода ресничных инфузорий. Вытягивание, потеря подвижности и последующее отмирание коловраток. Отрыв вортицелл от стебелька с образованием свободноплавающих форм (зооидов), которые затем раздуваются в виде шара и лопаются. Потеря подвижности ресничек (особенно у кругоресничных инфузорий).
Увеличение токсичности стоков	Сжатие коловраток (голова и ноги прячутся под грудной панцирь). Снижение подвижности простейших. Увеличение количества цист.
Увеличение концентрации органических веществ (по БПК ₅) в сточной воде	Увеличение концентрации свободноплавающих бактерий, а также мелких жгутиковых. Сжатие коловраток. Увеличение количества цист.
Уменьшение концентрации органических веществ (по БПК ₅) в сточной воде	Снижение концентрации бактерий. Мельчание простейших. Увеличение количества цист.
Образование в аэротенке застойных зон, где активный ил оседает (в силу низкой интенсивности аэрации)	Появление червей.

Задание

1. Приготовить прижизненный препарат активного ила, замерив его объем.
2. Выполнить микрофотографирование, определив структуру хлопьев, содержание различных групп микроорганизмов.
3. Сделать заключение о состоянии активного ила и качества биологической очистки.

Ход работы

1. Приготовление прижизненного препарата активного ила.

Из пробы иловой смеси с известной концентрацией активного ила (задается преподавателем) отобрать пипеткой и нанести на предметное стекло каплю, объемом около 0,05 мл (измерить по делениям пипетки). Каплю накрыть покровным стеклом, имеющим размеры 20 x 20 мм.

Рассчитать количество активного ила в приготовленном препарате:

$$M = V \cdot X, \quad (8)$$

где M – количество ила в препарате, мг; V – объем препарата, мл; X – концентрация ила, г/л.

2. Микроскопирование с определением структуры хлопьев и содержания различных групп микроорганизмов:

Просмотреть препарат и идентифицировать простейших с точностью до класса и подкласса (до вида – инфузорий *Paramecium caudatum* и *Vorticella microstoma*).

Определить средний размер хлопьев и их структуру (рыхлые или компактные, наличие участков минерализации).

При увеличении 600 оценить среднее расстояние между свободноплавающими бактериями и рассчитать их концентрацию (n):

$$n = \frac{10^{12}}{r^3},$$

где n – концентрация бактерий, 1/мл; r – расстояние между бактериями, мкм.

Найти количество свободноплавающих бактерий N_B в 1 г активного ила:

$$N_B = \frac{n}{X},$$

где N_B – количество свободноплавающих бактерий, тыс. шт./г; X – концентрация ила, г/л.

При увеличении 120 просмотреть весь препарат, начиная с угла, как показано на рис. 17.

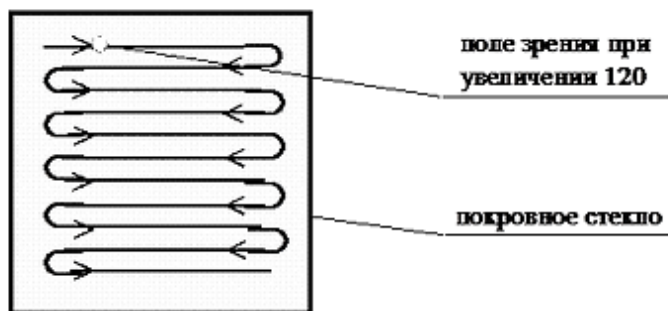


Рис. 17. Траектория движения по препарату в ходе микроскопирования с подсчетом простейших и коловраток

По мере движения по препарату необходимо подсчитывать количество микроорганизмов по группам, представленным в табл. 2 и фиксировать состояние микроорганизмов (см. табл. 4).

После завершения подсчета простейших и колеровок (во всем препарате) заполнить табл. 6, рассчитав количество микроорганизмов каждой группы по формуле:

$$N_i = \frac{n_i}{M}, \quad (9)$$

где N_i – количество микроорганизмов i -й группы (амебы, жгутиковые и т. д.), тыс. шт./г активного ила; n_i – число микроорганизмов i -й группы в препарате, найденное в ходе микроскопирования, шт.; M – количество ила в препарате, мг.

Таблица 4 – Результаты микроскопирования препарата активного ила

Микроорганизмы	Количество микроорганизмов	
	В препарате шт.	Тыс. шт/г активного ила
Жгутиковые		
Амебы		
Равноресничные инфузории		
Спиралересничные инфузории		
Кругоресничные инфузории		
Сосущие инфузории		
Цисты простейших		
Колероватки		
Черви		
Свободноплавающие бактерии		

3. Заключение о состоянии активного ила и качестве биологической очистки.

По данным табл. 4 (в сопоставлении с табл. 2) с учетом структуры хлопьев, состояния простейших и колеровок (см. табл. 3) сделать мотивированное заключение, в котором отразить следующее:

- состояние активного ила (высоконагруженный, средненагруженный, низконагруженный);
- ориентировочная эффективность очистки в аэротенке по БПК₅;
- уровень токсичности сточных вод, поступающих на очистку (высокая или невысокая);
- режим очистки (стационарный или нестационарный);
- обеспеченность кислородом;
- наличие застойных зон в аэротенке.

Вопросы для самоконтроля

1. Кто такие индикаторные организмы? Какова их роль в биологической очистке?
2. Что включает в себя биологический анализ, его цель и роль для очистки воды?
3. Какими факторами определяется зависимость состава биоценоза активного ила от качества среды (сточной воды)?
4. Назовите основные способы питания простейших.
5. Как изменяется видовое разнообразие биоценоза активного ила по мере уменьшения концентрации растворенных органических веществ и свободноплавающих бактерий?
6. Что такое участок минерализация? Как его идентифицировать под микроскопом?
7. Какие характеристики ила вы знаете? Как они изменяются?
8. Какие изменения биоценоза активного ила происходят при изменении характеристики сточных вод и технологических параметров процесса биологической очистки в аэротенках?
9. Какие пункты следует отразить при составлении заключения о состоянии активного ила и качестве биологической очистки?

Лабораторная работа № 4

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ РАСТВОРЕННОГО КИСЛОРОДА НА СКОРОСТЬ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель работы. Освоить метод оксиметрического определения концентрации растворенного кислорода и скорости его потребления микроорганизмами. Научиться снимать зависимость скорости роста аэробных микроорганизмов от концентрации растворенного кислорода, находить критическую концентрацию кислорода и константу Моно.

Основные положения. По отношению к молекулярно растворенному кислороду микроорганизмы делятся на 3 группы: аэробы, анаэробы, факультативные анаэробы (или факультативные аэробы).

Аэробы нуждаются в кислороде, используя его в качестве акцептора электронов окисляемых веществ

Анаэробы не используют молекулярный кислород, напротив, он ингибирует их рост. Безусловные (облигатные) анаэробы способны расти только при очень низком содержании кислорода в питательном растворе (при концентрации кислорода менее 0,01 мг/л). Факультативные анаэробы способны расти как в присутствии кислорода, так и без него. В аэробных условиях, когда в среде содержится кислород, факультативы ведут себя как аэробы. При низких концентрациях кислорода (менее 0,1 мг л), т. е. в условиях, близких к анаэробным, факультативные формы переходят на анаэробный метаболизм, т. е. растут подобно анаэробам. Однако переключение клеточного метаболизма с аэробного на анаэробный (а также с анаэробного на аэробный) требует значительного времени (около 2 – 3 клеточных генераций). Поэтому при быстром (в течение нескольких минут) уменьшении концентрации растворенного кислорода факультативы ведут себя как аэробы даже при содержании кислорода менее 0,1 мг/л.

Когда кислород является лимитирующим рост фактором, то его влияние на удельную скорость роста микроорганизмов (аэробов или факультативных аэробов при быстром уменьшении концентрации кислорода) описывается уравнением Моно:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \times C}{K_c \times C}, \quad (10)$$

где μ – удельная скорость роста, час⁻¹; μ_{\max} – максимальная удельная скорость роста, час⁻¹; C – концентрация растворенного кислорода, мг/л; K_c – константа насыщения (константа Моно), мг/л.

Для аэробных бактерий константа K_c имеет очень низкие значения (около 0,1 мг/л). Это создает экспериментальные трудности в ее определении. По этой причине иногда находят критическую концентрацию ($C_{кр}$) растворенного кислорода, определяемую как концентрация кислорода, ниже которой скорость роста микроорганизмов падает. При математическом описании вводят кусочно-линейную аппроксимацию уравнению Моно:

$$\mu = \begin{cases} K \times C, & \text{при } C < C_{кр} \\ \mu_{max}, & \text{при } C > C_{кр} \end{cases} \quad (11)$$

Зависимости (10) и (11) приведены на рис. 18. Как видно из графика, константа Моно (K_c) численно равна концентрации кислорода, при которой удельная скорость равна половине максимальной.

Если удалось экспериментально снять зависимость (рис. 18) и получить значение K_c , то критическая концентрация вводится по соотношению:

$$C_{кр} = 2 \times K_c \quad (12)$$

Если точность экспериментальной техники не позволяет получить зависимость в области низких концентраций кислорода, то определение K_c невозможно. В этом случае находят критическую концентрацию непосредственно по экспериментальным данным (рис. 19).

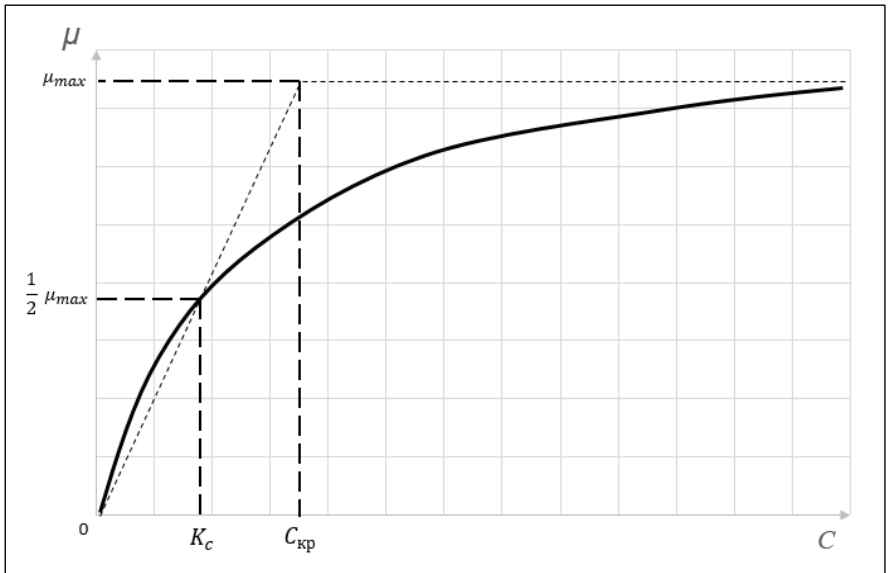


Рис. 18. Зависимость $\mu(C)$ по уравнению Моно и согласно кусочно-линейной аппроксимации

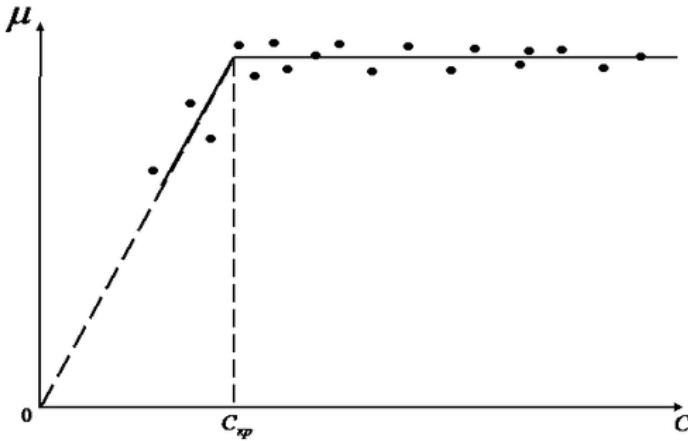


Рис. 19. Определение $C_{кр}$ по экспериментальным данным

Метод прямого определения скорости роста микроорганизмов является трудоемким и имеет невысокую точность. Упростить технику эксперимента и повысить его точность можно, перейдя к измерению скорости потребления кислорода, которая связана со скоростью роста соотношением:

$$\mu = \frac{y}{z \times X} \times U, \quad (13)$$

где y – экономический коэффициент (прирост биомассы на единицу потребленного субстрата), мг биомассы/мг субстрата; z – энергетическим коэффициент (потребление кислорода на единицу потребленного субстрата), мг кислорода/мг субстрата; X – концентрация биомассы, мг биомассы/л; U – скорость потребления кислорода микроорганизмами, мг кислорода/л.

Если в ходе эксперимента значения параметров y , z , X были постоянны, то μ и U прямо пропорциональны:

$$\mu = a \times U \quad (14)$$

$$a = \frac{y}{z \times X} = const. \quad (15)$$

Следовательно, зависимость $U > (C)$ будет такой же, как зависимость $\mu (C)$. Тогда значения константы Моно (K_c) и критической концентрации ($C_{кр}$) можно найти, получив экспериментально зависимость $\mu (C)$.

Зависимость скорости роста или скорости потребления кислорода от его концентрации в водной среде необходима для расчета систем аэробной биологической очистки сточных вод (аэротенков), а также для описания микробиологических превращений в водоемах.

В аэротенках микроорганизмы находятся в виде хлопьев активного ила, состоящих из тысяч бактериальных клеток. Внутри хлопьев кислород проникает за счет диффузии. Вследствие диффузионных процессов концентрация

кислорода внутри хлопьев ила существенно меньше, чем в растворе. Так как экспериментально определяется концентрация кислорода в растворе, то зависимость от нее скорости роста микроорганизмов активного ила растягивается по оси абсцисс в сравнении с аналогичной зависимостью для свободноплавающих бактерий.

Собственно, константа K_c и критическая концентрация кислорода увеличиваются. Поэтому для активного ила типичные значения K_c составляют $0,5 \div 2$ мг/л, т. е. примерно в 10 раз больше, чем для свободно плавающих клеток.

Задание

1. Приготовить модельную сточную воду.
2. Снять кинетическую кривую потребления кислорода активным илом в системе «активный ил – модельная сточная вода».
3. Обработать экспериментальные данные и получить зависимость скорости потребления кислорода от его концентрации, а также значения константы Моно и критической концентрации растворенного кислорода.

Ход работы

1. Приготовление модельной сточной воды

Модельная сточная вода готовится по одному из трех вариантов (вариант задается преподавателем).

Вариант I. В 1 литре предварительно отстоянной и аэрированной водопроводной воды растворить 500 мг глюкозы (можно использовать сахарозу или ксилозу), 54 мг хлористого аммония (NH_4Cl) и 13 мг дигидрофосфата калия (KH_2PO_4). Контролировать pH. Если pH оказался ниже 6,5, то добавить раствор едкого натра (NaOH), чтобы выполнялось $\text{pH} = 6,5 \div 8,0$. Полученная модельная сточная вода имеет $\text{БПК}_5 = 300$ мг/л и содержит азот и фосфор в соотношении $\text{БПК}_5:\text{N}:\text{P} = 100:4:1$.

Вариант II. Черный сульфатный щелок развести в 100 раз водопроводной водой и добавить биогенные соли (NH_4Cl , KH_2PO_4 или K_2HPO_4) из соотношения $\text{БПК}_3:\text{N}:\text{P}=100:4:1$ (величина БПК_5 разбавленного щелока задается преподавателем). Полученный раствор нейтрализовать серной кислотой до $\text{pH} = 6,5 - 8,0$. Описанными методами моделируется вода сульфатно-целлюлозного производства.

Вариант III. Модельная сточная вода сульфитно-целлюлозного производства готовится разбавлением отработанного сульфитного щелока так же, как в варианте II, но для нейтрализации используется раствор едкого натра.

2. Получение кинетической кривой потребления кислорода активным илом

Наиболее точно потребление кислорода измеряется оксиметрическим методом. Принцип метода состоит в следующем. Насыщенную кислородом сточную воду смешивают с активным илом и помещают в сосуд с мешалкой. Затем в сосуд помещают датчик анализатора кислорода (оксиметра) таким образом, чтобы обеспечить герметичность сосуда и полное отсутствие в нем

воздуха. Включают перемешивание. В результате потребления кислорода микроорганизмами его концентрация падает. Концентрация кислорода непрерывно измеряется оксиметром и фиксируется на ленте самописца, где вычерчивается кинетическая кривая $C(t)$. Схема лабораторной установки для измерения потребления кислорода активным илом приведена на рис. 20.

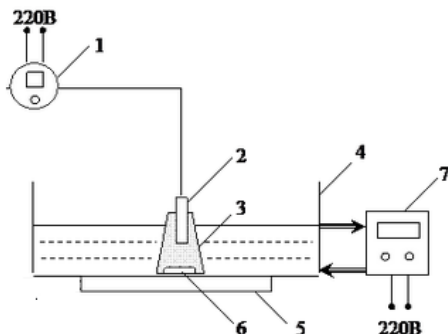


Рис. 20. Схема установки для определения потребления кислорода активным илом:

- 1 – оксиметр (кислородомер); 2 – датчик оксиметра (кислородомера);
 3 – рабочий сосуд с активным илом; 4 – ванна термостатирования;
 5 – магнитная мешалка; 6 – перемешивающее устройство (магнитная мешалка); 7 – термостат

При выполнении работы необходимо соблюдать определенную последовательность операций:

– Измерить объем жидкости (воды) в сосуде 3 при погруженном в него датчике 2. Для этого в сосуд наливают воду и опускают датчик так, чтобы часть воды вытеснялась из сосуда и вылилась в ванну 4. Затем датчик вынимают, а воду переливают в мерный цилиндр и измеряют ее объем (V).

– Рассчитать объем ила ($V_{и}$) и сточной воды ($V_{в}$) так, чтобы выполнялось:

$$V_{и} + V_{в} = V; \quad (16)$$

$$V_{в} : V_{и} \approx 4. \quad (17)$$

– Отобрать из лабораторного аэротенка иловую смесь объемом около $5 V_{и}$ и поместить ее в цилиндр для отстаивания. Когда объем, занимаемый осевшим илом, станет меньше $V_{и}$, слить сифоном надсадочную воду до отметки $V_{и}$. Активный ил объемом $V_{и}$ из цилиндра перелить в сосуд 3 с перемешивающим устройством 6.

– Модельную сточную воду объемом $V_{в}$, предварительно насыщенную кислородом (аэрация в течение 5 мин. от микрокомпрессора), перелить в сосуд 3 с перемешивающим устройством 6.

– Опустить в сосуд с мешалкой датчик 2 оксиметра 1. Убедиться, что в сосуде отсутствуют пузырьки воздуха (могут прилипнуть к датчику), и жидкость занимает весь объем сосуда.

– включить магнитную мешалку 5. Убедиться, что обеспечивается хорошее перемешивание иловой смеси.

– Включить секундомер. Включить оксиметр. Контролировать ход процесса. Снимаем показания оксиметра, занося результаты в таблицу (см. табл. 5).

Таблица 5 – Результаты определения кинетики потребления кислорода активным илом

t, сек.	0
C, мг/л	5,0	4,8	4,6 4,4 4,2 4,0 3,8...2,0... 1,9 1,8...

Продолжаем отсчет времени через каждые 0,1 мг/л (см. табл. 5), пока концентрация кислорода не достигнет нуля.

Обработка экспериментальных данных

По данным табл. 5 строим график зависимости $C(t)$ и находим скорость потребления кислорода, как показано на рис. 21. Определив скорость для 7 – 15 точек на криволинейном участке зависимости $C(t)$, получаем таблицу 6.

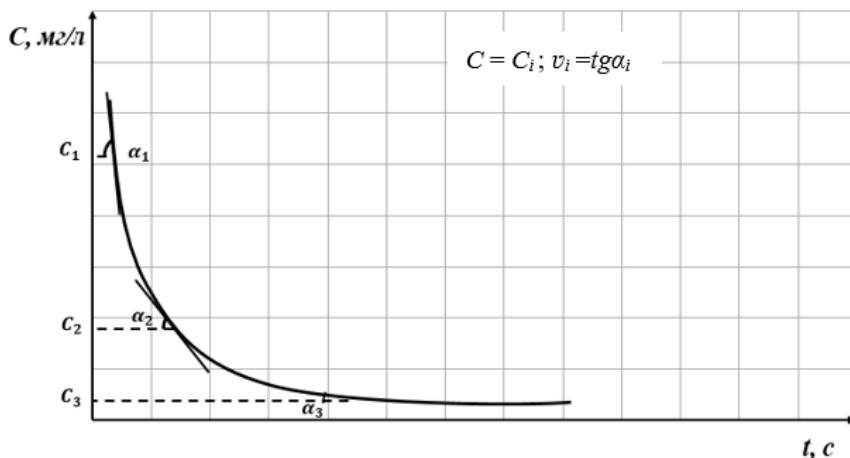


Рис. 21. Кинетика потребления кислорода

Таблица 6 – Зависимость скорости потребления кислорода от его концентрации

С, мг/л	
v мг/л-час	

По данным табл. 6 строим график и находим константу Моно (см. рис. 22). Для более точного определения константы K_c можно выполнить линеаризацию уравнения Моно, как показано на рис. 23. По уравнению (12) рассчитываем $C_{кр}$.

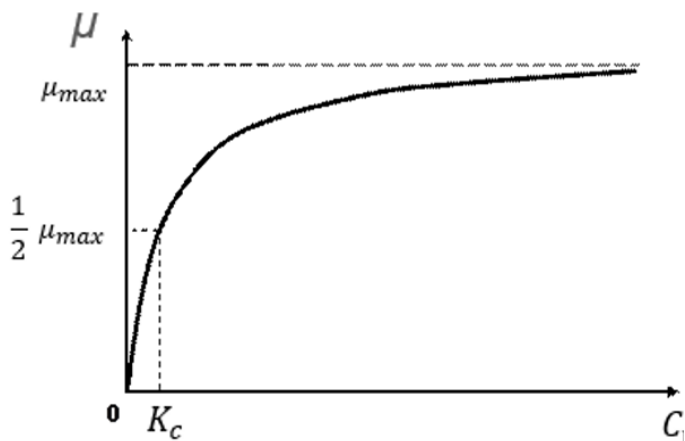


Рис. 22. Зависимость $v(C)$

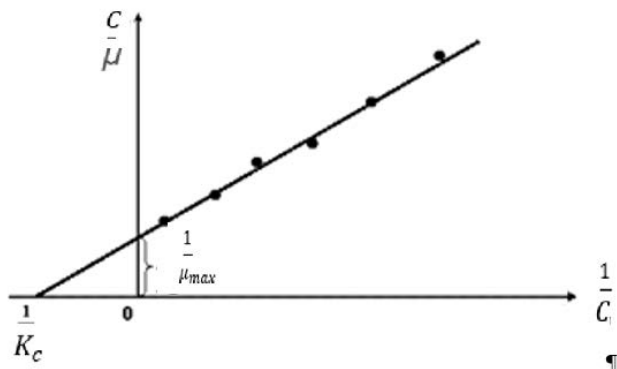


Рис. 23. Линеаризованная форма уравнения Моно

При недостаточной точности полученных данных критическую концентрацию находим, как показано на рис. 19.

Вопросы для самоконтроля

1. Деление микроорганизмов по отношению к молекулярно растворенному кислороду. Дать характеристику групп.
2. Кто такие факультативные анаэробы? При какой концентрации молекулярно растворенного кислорода переходят на анаэробный метаболизм? И сколько времени необходимо для перехода клеточного метаболизма с аэробного на анаэробный?
3. Когда применяется уравнение Моно?
4. Что такое K_s и $C_{кр}$ из уравнения Моно? Как они связаны между собой? Как их определить из графика?
5. По какой причине определяют критическую концентрацию ($C_{кр}$) растворенного кислорода и что она характеризует?
6. Как зависит скорость потребления кислорода от его концентрации? Привести примеры использования.
7. Привести типичные значения константы насыщения K_s для активного ила?
8. Как готовить модельную сточную воду для проведения эксперимента? Какие реактивы необходимо использовать для приготовления, какое соотношение БПК_t:N:P должно выполняться? Какое значение pH должно быть у модельной воды? Почему необходимо контролировать данные параметры сточной модельной?
9. Схема установки для измерения потребления кислорода активным илом. Пояснить снятие кривой зависимости скорости роста аэробных микроорганизмов от концентрации растворенного кислорода.
10. Принцип работы и устройство оксиметра.

Лабораторная работа № 5 ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ НА СКОРОСТЬ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель работы. Научиться производить выбор уравнения регрессии для математического описания экспериментальных данных.

Основные положения. Температура водных микроорганизмов равна температуре окружающей среды, поэтому воздействие фактора температуры на клетки неизбежно. Температура влияет как на скорость биохимических реакций, так и на видовой состав биомассы в биореакторе.

В зависимости от температурного интервала роста и диапазона оптимальных температур бактерии делят на три основные группы (см. табл. 7): психрофилы (любят низкие температуры), мезофилы (любят средние температуры) и термофилы (любят высокие температуры). Соответствующую терминологию используют и для обозначения температурного режима роста клеток, например, «психрофильные условия», «термофильный режим», «биореактор мезофильного сбраживания» и т. д.

Таблица 7 – Классификация бактерий по отношению к температуре

Наименование группы бактерий	Подгруппа	Температурный интервал роста (от ... до ...), °С	Диапазон оптимальных температур, °С
Психрофилы	Облигатные психрофилы	от -(10÷20) до +20	15÷30
	Факультативные психрофилы	от -10 до +(32÷35)	20÷30
Мезофилы	-	от +10 до +(42÷45)	30÷40
Термофилы	Факультативные термофилы	от +20 до +(70÷80)	60÷70
	Облигатные термофилы	от +(42÷42) до +(65÷70)	50÷60

Для описания влияния температуры на скорость роста микроорганизмов применяют следующие уравнения:

- уравнение Аррениуса:

$$U = U^* \times \exp \frac{E_a}{R \times T_k}; \quad (18)$$

- эмпирическая формула СНиП 2.04.03-85:

$$U = U_{15} \times \frac{T_c}{15}; \quad (19)$$

- эмпирическая зависимость:

$$U = U_{10} \times \left(\frac{T_c}{15}\right)^m, \quad (20)$$

где U – скорость роста (или скорость потребления кислорода), мг/(л·ч); U^* – константа, мг/(л·ч); E_a – энергия активации, ккал/моль; R – универсальная газовая постоянная, $R = 1,98 \cdot 10^{-3}$ ккал/(моль·К); T_c – абсолютная температура, °К; U_{15} , U_{10} – скорость роста (или скорость потребления кислорода) при температуре 15 и 10 °С соответственно, мг/(л·ч); T_c – температура, °С; m – эмпирический коэффициент.

С целью интерполяции, экстраполяции, а также выявления механизма изучаемого процесса, часто возникает задача выбора уравнения регрессии, которое наиболее полно описывает экспериментальные данные. В основе такого выбора лежит минимум относительной ошибки расчета по уравнению регрессии в сравнении с экспериментальными значениями.

Включаемые в рассмотрение уравнения регрессии выводятся теоретически, исходя из гипотез о механизме исследуемого процесса, или используются эмпирические уравнения.

Уравнение (19) является линейным уравнением вида $y = b \cdot x$, где $y = u$; $b = \frac{U_{15}}{15}$; $x = T_c$. Если мы имеем экспериментальные данные значений скорости U при различных температурах T_c , то методом наименьших квадратов можем найти параметры линейной регрессии и величину стандартного отклонения:

$$b = \frac{\sum x_i \times y_i}{\sum x_i^2}, \quad (21)$$

$$S_y = S_U = \sqrt{\frac{\sum (y_i - Y_i)^2}{n-2}}, \quad (22)$$

где $x_i = T_{ci}$; $y_i = U_i$; $Y_i = b \times x_i$; n – объем выборки (число измерений).

Тогда абсолютная ошибка расчета по уравнению (19) составит:

$$\epsilon_U = t_{st} \times S_U, \quad (23)$$

где t_{st} – стандартный критерий Стьюдента.

Если обозначить: V – значения U на линии регрессии, то получим относительную ошибку $\epsilon_{отн}$:

$$\epsilon_{отн} = \frac{\epsilon_U}{V}. \quad (24)$$

Как видно, $\epsilon_{отн}$ не является постоянной: с увеличением величины V происходит уменьшение $\epsilon_{отн}$. Если экспериментальный диапазон значений V составляет (V_{min} , V_{max}), то средняя относительная ошибка уравнения (19) в этом диапазоне:

$$\bar{\epsilon}_{отн} = \frac{1}{V_{max} - V_{min}} \times \int_{V_{min}}^{V_{max}} \epsilon_{отн} dV. \quad (25)$$

После подстановки формулы для $\epsilon_{отн}$ (24) в уравнение (25), получим:

$$\bar{\epsilon}_{отн} = \frac{1}{V_{max} - V_{min}} \times \int_{V_{min}}^{V_{max}} \frac{\epsilon_U}{V} dV. \quad (26)$$

Интегрирование выражения (26) позволяет получить расчетную формулу для вычисления $\epsilon_{\text{отн}}$ уравнения (19):

$$\overline{\epsilon_{\text{отн}}} = \frac{\epsilon_0 \times \ln \frac{V_{\text{max}}}{V_{\text{min}}}}{V_{\text{max}} - V_{\text{min}}}. \quad (27)$$

Для применения метода наименьших квадратов к уравнениям (18) и (20) необходима их линеаризация, которая достигается путем логарифмирования:

– Для уравнения (18):

$$\ln U = \ln U^* - \frac{E_a}{R} \times \frac{1}{T_K} \quad (28)$$

$$\text{или } y = a + b \times x,$$

где $y = \ln U$; $a = \ln U^*$; $b = -\frac{E_a}{R}$; $x = \frac{1}{T_K}$.

– Для уравнения (20):

$$\ln U = \ln U_{10} + m \times \ln \frac{T_C}{10} \quad (29)$$

$$\text{или } y = a + b \times x,$$

где $y = \ln U$; $a = \ln U_{10}$; $b = m$; $x = \frac{T_C}{10}$.

По методу наименьших квадратов параметры линеаризованных уравнений (28), (29), стандартные отклонения и абсолютные ошибки составят:

– Для уравнения (28):

$$a = \ln U^* = -\frac{\sum x_i^2 \sum y_i - \sum x_i \sum x_i y_i}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}, \quad (30)$$

$$b = -\frac{E_a}{R} = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}, \quad (31)$$

$$S_y = S_{\ln U} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - Y_i)^2}{n-2}}; \quad \epsilon_y = t_{st} \times S_y, \quad (32)$$

где $x_i = \frac{1}{T_{Ki}}$; $y_i = \ln U_i$; $Y_i = a + b \times x_i$; n – объем выборки (число экспериментальных точек); t_{st} – стандартный критерий Стьюдента при доверительной вероятности 95 % и степеней свободы $f = n-2$.

– Для уравнения (29):

$$a = \ln U_{10} = \frac{\sum x_i^2 \sum y_i - \sum x_i \sum x_i y_i}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}, \quad (33)$$

$$b = m = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}, \quad (34)$$

$$S_y = S_{\ln U} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - Y_i)^2}{n-2}}; \quad \epsilon_y = t_{st} \times S_y, \quad (35)$$

где $x_i = \frac{T_{Ci}}{10}$; $y_i = \ln U_i$; $Y_i = a + b \times x_i$.

Так как с доверительной вероятностью 95 % величина y находится в интервале:

$$Y - \epsilon_y \leq y \leq Y + \epsilon_y; \quad y = \ln U; \quad Y = \ln V;$$

то абсолютная ошибка уравнений (18) и (20) будет равна:

$$\varepsilon_U = \frac{1}{2} V (\exp^{\varepsilon_y} - \exp^{-\varepsilon_y}), \quad (36)$$

где V – значение U на линии регрессии.

Относительная ошибка уравнений (18) и (20) может быть найдена, если подставить выражение (36) в формулу (24):

$$\varepsilon_{\text{отн}} = \frac{1}{2} (\exp^{\varepsilon_y} - \exp^{-\varepsilon_y}), \quad (37)$$

где ε_y – по уравнениям (32) и (35).

Параметры уравнений (18), (19) и (20) задаются соотношениями:

- Для уравнения (18):
 $U^* = \exp^a$; $E_a = -bR$, где a – по уравнению (30), b – по уравнению (31);
- Для уравнения (19):
 $U_{15} = 15 \times b$, где b – по уравнению (21);
- Для уравнения (20):
 $U_{10} = \exp^a$; $m = b$, где a – по уравнению (33), b – по уравнению (34).

Задание

Экспериментально получить зависимость скорости потребления кислорода активным илом от температуры в процессе роста на сложном субстрате.

Выполнить расчет средних относительных ошибок уравнений (18), (19), (20) и выбрать уравнение, наиболее точно описывающее экспериментальные данные. Определить параметры выбранного уравнения.

Ход работы

1. Из лабораторного аэротенка отобрать в цилиндр 1 л иловой смеси. После 10 мин. отстаивания осевший активный ил (около 200 мл) перенести в колбу и при интенсивном перемешивании разделить на 5 равных частей (по 40 мл), каждую из которых поместить в колбы объемом 100 мл. В первой колбе постепенно довести температуру активного ила до 10 °С, во второй – до 15 °С, в третьей – до 20 °С, в четвертой – до 25 °С, в пятой – до 30 °С. В процессе охлаждения (нагрева) активный ил необходимо периодически аэрировать (или перемешивать).

2. Приготовить питательную среду (0,5 л) путем разбавления в 100 раз отработанного сульфитного щелока с последующей его нейтрализацией (до $pH = 7 - 8$) и добавкой биогенных элементов из расчета БПК₅:N:P = 100:5:1 (принять для полученной среды БПК₅ = 200 мг/л). Полученный раствор насытить кислородом (аэрация 10 мин. от микрокомпрессора), а затем разделить на 5 частей (по 100 мл) и довести температуру, соответственно, до 10; 15; 20; 25 и 30 °С.

3. Для измерения скорости потребления кислорода активным илом при различных температурах используется оксиметрическая установка (см. рис. 20).

В оксиметрическую ячейку последовательно вводится 30 мл активного ила и 70 мл питательной среды с той же температурой. В ячейку помещают датчик оксиметра, включают перемешивание и снимают динамику уменьшения концентрации кислорода. Скорость потребления кислорода рассчитывают графоаналитически по динамике уменьшения концентрации растворенного кислорода (строят график зависимости $C(t)$ и находят величину максимальной скорости потребления кислорода).

Пример графика и расчетов приведен на рис. 24.

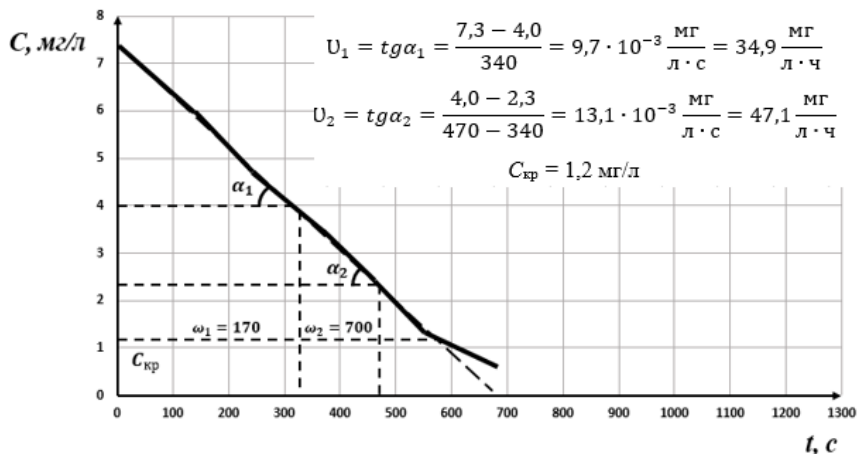


Рис. 24. Кинетика потребления кислорода (с примером расчета скорости потребления кислорода и определения его критической концентрации)

Группа студентов (около 10 человек) делится на 5 бригад (по 2 человека). Каждая бригада определяет скорость потребления кислорода при одной заданной температуре.

Полученная зависимость скорости от температуры изображается в виде графика $U(T_c)$ (строится 5 кривых на одном графике). Если во всем температурном диапазоне скорость возрастает, то в дальнейших расчетах учитываются все пять экспериментальных точек. В противном случае отбор данных для дальнейших расчетов выполняется совместно с преподавателем.

4. Полученные результаты обрабатываются, как описано выше. Выбирается уравнение (см. уравнения 18 – 20), дающее наименьшую относительную ошибку $\mathcal{E}_{\text{отн}}$. Для выбранного уравнения находят входящие в

него параметры. Выбранное уравнение приводится в окончательном виде (после подстановки значений параметров) с указанием абсолютной ошибки.

Вопросы для самоконтроля

1. Деление микроорганизмов по отношению к температуре воды. Дать характеристику групп.
2. Как влияет температура на процессы нитрификации?
3. Как влияет температура на процессы денитрификации?
4. Как влияет температура на процесс биологической очистки воды?
5. Какую температуру нужно поддерживать в аэротенках и почему?
6. Какую температуру нужно поддерживать в сооружениях анаэробной очистки воды и почему?

Лабораторная работа № 6

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ СПОСОБНОСТИ ЭЖЕКТОРНОГО АЭРАТОРА ДЛЯ АЭРОТЕНКА-ОТСТОЙНИКА СО СТРУЙНЫМ АЭРАТОРОМ

Цель работы: определение концентрации растворенного кислорода в воде при использовании пневматического аэратора.

Основные положения. Струйные или эжекторные аппараты – это устройства, в которых происходит смешение и обмен энергией двух имеющих разное давление потоков, один из которых является рабочим, с образованием смешанного потока с промежуточным давлением. Струйные аэраторы наиболее просты, в отличие от механических и пневматических аэраторов, т. к. в них отсутствуют механические устройства для перемешивания жидкости, не требуется подачи сжатого воздуха, что во многих случаях имеет решающее значение.

Работают струйные аэраторы таким образом: сточная вода, подаваемая насосной установкой, с большой скоростью вытекает из сопла в камеру смешения, создавая разрежение в приемной камере, что вызывает поступление через специальный патрубок атмосферного воздуха. Струя жидкости затем увлекает диспергируемый ее воздух из камеры смешения в диффузор. Так как время диспергирования в этих условиях очень мало, а скорость обновления поверхности контакта высока, то интенсивность массообмена (вода – воздух) значительна. Попав в диффузор (зону расширения потока), водовоздушная смесь снижает свою скорость при одновременном повышении давления, что приводит к некоторому укрупнению пузырьков воздуха. При этом парциальное давление кислорода в пузырьках увеличивается и происходит дополнительное насыщение жидкости кислородом. Процесс переноса кислорода в жидкость продолжается с замедляющейся скоростью и за пределами диффузора в течение всего периода контакта двух фаз (вода – воздух).

Количество кислорода, подаваемое таким образом в жидкость в единицу времени называется *производительностью аэратора по кислороду* или *окислительной способностью аэратора* (ОС). Окислительная способность (кг кислорода в час или сутки) служит важной характеристикой для расчета количества аэраторов, подлежащих установке в аэрационном сооружении, т. е.

$$N_a = m_1 \cdot Q_{\text{сут}} \cdot (\alpha_a - \alpha_t) / (m_2 \cdot \text{ОС} \cdot d), \quad (89)$$

где m_1 – потребность в кислороде, кг/кг снятой БПК_{полн}; $Q_{\text{сут}}$ – суточный расход сточных вод, м³; α_a, α_t – БПК_{полн} соответственно поступающих в аэротенк и очищенных сточных вод, кг О₂/м³; m_2 – коэффициент качества сточных вод; ОС – окислительная способность аэратора, кг О₂/сутки; d – разница между концентрацией насыщения и концентрацией растворенного кислорода.

Для аэраторов, серийно выпускаемых промышленностью, ОС принимается по паспортным данным. Во многих же случаях, в частности, при проведении научно-исследовательских работ или при проверке фактической

производительности аэратора окислительную способность определяют экспериментально как в лабораторных условиях, так и непосредственно в условиях работы аэратора. Существуют различные методы экспериментального определения окислительной способности. Наиболее широкое распространение, однако, получил *метод переменного дефицита кислорода* в виду простоты его проведения.

При этом методе аэрационный резервуар заполняется водопроводной водой. Имеющийся в воде растворенный кислород удаляется путем введения в воду сульфата натрия с кобальтовым катализатором (обычно хлорид кобальта) в количестве, необходимом для полного обескислороживания жидкости. Включая затем в работу аэратор, ведут измерение концентрации растворенного кислорода с помощью переносного анализатора кислорода до полного насыщения жидкости кислородом. Окислительную способность, кг/ч, аэратора определяют как:

$$OC = 10^{-6} \cdot K_{La} \cdot C_S \cdot V, \quad (39)$$

где V – объем резервуара, л; C_S – концентрация насыщения кислорода при данной температуре, мг/л; K_{La} – объемный коэффициент массопередачи, характеризующий количество кислорода, переходящее в единицу объема жидкости в единицу времени, ч⁻¹.

Если в момент времени t_1 дефицит кислорода в жидкости (разница между концентраций насыщения и концентрацией растворенного кислорода) обозначить через d_1 , а момент времени t_2 – через d_2 и принимать $t_1 - t_2$ в минутах, объемный коэффициент массопередачи определится как:

$$K_{La} = [138,18 / (t_1 - t_2)] \lg(d_1 / d_2), \text{ ч}^{-1}. \quad (40)$$

Для практических расчетов влиянием температуры на окислительную способность можно пренебречь.

Устройство стенда и принцип его работы

Установка состоит из двух основных частей: аэрационного бассейна и струйного аэратора с компрессором (рис. 25). Аэрационный бассейн имеет форму аэротенка, оборудованного водоподводящей трубой с краном и сливной трубой с краном для опорожнения или отведения воды в нижний резервуар.

Струйный аэратор представляет собой трубку с установленной в ней камерой смешения водовоздушной смеси. Выпуск трубки от аэратора крепится на вертикальном штоке таким образом, что можно изменять высоту расположения выпуска аэратора. Таким образом, установка позволяет определять зависимость окислительной способности аэратора от глубины его погружения в жидкость.

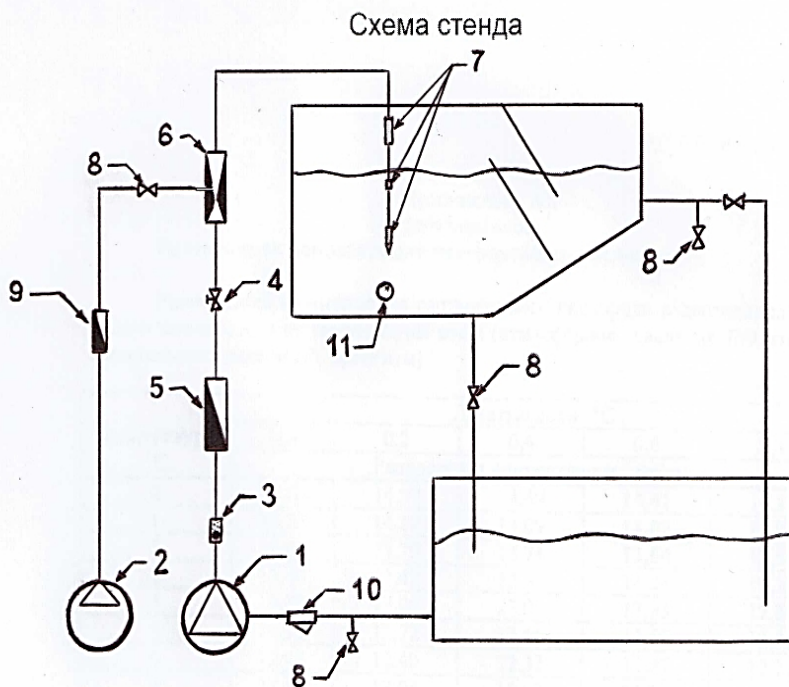


Рис. 25. Схема лабораторного комплекса «Аэротенк отстойник со струйным аэратором»: 1 – насос; 2 – компрессор; 3 – обратный клапан; 4 – регулирующий; 5 – водосчетчик; 6 – эжектор; 7 – аэратор; 8 – шаровой кран; 9 – счетчик воздуха; 10 – фильтр; 11 – термометр

Меры безопасности

К работе на установке «Аэротенк отстойник со струйным аэратором» допускаются лица, ознакомленные с ее устройством, принципом действия и мерами безопасности в соответствии с требованиями, приведенными в настоящем разделе.

Шнур питания установки должен быть подключен к сетевой розетке с защитным проводником.

Наладочные работы, осмотры и ремонт производить только после отключения стенда от сети питания с помощью сетевой вилки.

Выполнение лабораторной работы производится бригадой количеством не менее двух человек, один из которых является наблюдателем и при возникновении опасности обесточивает лабораторный стол.

Инструкция по технике безопасности

Каждый студент, пришедший в лабораторию для выполнения лабораторных работ, должен ознакомиться с правилами по технике безопасности и противопожарной безопасности.

1. До начала работы студент должен подробно ознакомиться с устройством стендов, схемой подсоединения электрических приборов, расположением и работой вентиляей, электровыключателей.
 2. Подача электрического тока в сеть для работы с приборами осуществляется только лаборантом.
 3. В лаборатории категорически ЗАПРЕЩАЕТСЯ:
 - а) трогать, включать и отключать без разрешения руководителя или лаборанта рубильники, приборы, аппараты;
 - б) касаться зажимов приборов и аппаратов, производить переключение и замену приборов в схеме при не выключенном напряжении;
 - в) шуметь, кричать, работать в верхней одежде, шарфах, шляпах и раздеваться в лаборатории;
 - г) загромождать рабочее место предметами, не относящимися к выполняемой работе;
 - д) переходить без разрешения руководителя с одного рабочего места на другое.
 4. После окончания работы электрическую схему необходимо отключить. Произвести уборку на рабочем месте.
 5. Работающие в лаборатории обязаны беречь государственное имущество, бережно относиться к приборам, лабораторному и аудиторному имуществу;
 6. При несчастном случае пострадавшему необходимо оказать первую помощь и сообщить немедленно о случившемся руководителю.
- В случае возникновения пожара принимать все необходимые меры для тушения пожара, спасения людей и имущества и немедленно сообщить о пожаре.

Порядок работы лабораторного стенда

1. Установите необходимое положение аэрационной трубки (по указанию преподавателя) путем ослабления удерживающей гайки (7) и затем выставления необходимого положения по мерной ленте, затем закрепите удерживающую гайку.
2. Установите вентиль на подаче воды от насоса так, чтобы вода не переливалась при попадании в аэрационный бассейн.
3. Включите насос и компрессор путем нажатия кнопок на стенде, при этом закрыть кран (8) на подаче воздуха (убедитесь в том, что насос заполнен

водой, и все уплотняющие муфты крепко закручены. На насосе есть кнопка местного отключения питания).

4. После насоса проверить обратный клапан для избегания попадания воды в напорный патрубок (проверяет преподаватель).

5. Набрать исследуемый объем воды в аэротенк, отключить насос.

6. Засыпать обескислороживающий реагент, количество которого было рассчитано по указанию преподавателя, в аэротенк и аккуратно его перемешать.

7. Взять первую пробу воды для анализа (измерить концентрацию кислорода в воде, нулевая точка).

8. Открыть вентиль (8) на подаче воздуха, дождаться установления определенного значения расхода воздуха (~1 мин.).

9. Начать выполнение лабораторной работы (измерять изменение концентрации кислорода в воде с помощью оксиметра не более 30 мин.).

10. По окончании работы выключите устройство защитного отключения УЗО, закройте вентиль на подаче воздуха от компрессора.

11. Слейте воду с реагентом из верхнего и нижнего резервуаров.

12. Опыты повторять (по заданию преподавателя) для различных значений подачи воздуха и температур в аэрационном бассейне, при этом для каждого нового опыта повторять шаги 1 – 11.

Ход работы

Аэрационный бассейн заполняют водопроводной водой до установленного уровня. Замеряют концентрацию растворенного кислорода и в воду вносят сульфит натрия Na_2SO_3 в количестве 5 – 6 мг/л на 1 мг/л растворенного кислорода для полного обескислороживания воды. Чтобы ускорить процесс обескислороживания в воду добавляется катализатор – хлорид кобальта в количестве из расчета получения концентрации его в 1 мг/л. Плавным перемешиванием раствора в течение 2 – 3 мин. достигается обескислороживание воды.

Устанавливают аэратор на заданной глубине (по заданию преподавателя). После этого включают аэратор, отмечая в журнале время его пуска и работу, и через каждые 1 – 2 мин замеряют концентрацию растворенного кислорода в бассейне. Данные замера концентраций записывают в журнал в соответствии со временем замера концентрации (табл. 8). При достижении концентрации насыщения или концентрации близкой к ней аэратор останавливают и эксперимент прекращают. Данный эксперимент проводится при различных значениях расхода подаваемого воздуха (регулирование производится шаровым краном 8) и температуры перекачиваемой жидкости. Для этого в конструкции стенда предусмотрен ЖК-дисплей с выводом показания расходов воды и воздуха, а также значения температуры воды

При достижении концентрации насыщения или концентрации близкой к ней аэратор останавливают и эксперимент прекращают. По данным замера концентрации растворенного кислорода строят график насыщения жидкости кислородом, дающий наглядное представление об этом процессе, когда по мере

повышения концентрации кислорода в воде замедляется скорость его переноса (массопередачи) из воздуха в жидкость. Этот график показывает экономическую целесообразность поддержания в аэрационном бассейне низких концентраций растворенного кислорода. Затем по формуле (40) вычисляют объемный коэффициент массопередачи, по которому и определяют окислительную способность аэратора в кг растворенного кислорода в час (формула 39).

Таблица 8 – Результаты вычислений искомых величин

№ опыта	Температура воды, °С	t, мин.	Концентрация растворенного воздуха в воде			K _{La}	OC
			табличная	начальная	экспериментальная		
1							
2							
3							

Вопросы для самоконтроля

1. Как рассчитать необходимое количество кислорода для осуществления биологической очистки воды в аэротенке?
2. Классификация промышленных аэраторов.
3. Преимущества и недостатки разных типов аэраторов.
4. Как влияет глубина расположения аэратора на насыщение воды кислородом?
5. В чем отличие аэраторов для аэробных и анаэробных условий процесса биологической очистки воды?
6. Какие параметры влияют на эффективности аэрации воды?