

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

УТВЕРЖДАЮ
Директор ИПР


А.Ю. Дмитриев
«29» июня 2015 г.

АНАЛИЗ МИКРОФЛОРЫ ВОЗДУХА И ВОДЫ

Методические указания к выполнению лабораторной работы
по дисциплинам «Микробиология», «Фармакология, биохимия, микробиология»
и «Биотехнология» для студентов ИПР, ИФВТ дневной формы обучения

Составитель А.П. Асташкина

Издательство
Томского политехнического университета
2015

План коллоквиума

по теме «Питание микроорганизмов и закономерности микробного роста»

1. Питание микроорганизмов. Классификация бактерий по типам
2. Закономерности роста популяций микроорганизмов. Удельное время роста. Время генерации. Культивирование. Виды культивирования.
3. Культивирование микроорганизмов в лабораторных условиях. Питательные среды. Классификация питательных сред. Приготовление питательных сред. Стерилизация.
4. Культивирование аэробных микроорганизмов.

Список литературы

1. Лысак, В.В. Микробиология : учебное пособие. – Минск, БГУ, 2007. – 426 с.
2. Нетрусов А.И., Котова И.Б. Микробиология : учебник. – М., Академия, 2006. – 352 с.
3. Тимощенко Л.В., Чубик М.В., Пестряков А.Н. Основы микробиологии и биотехнологии : учебное пособие. – Томск, Изд-во ТПУ, 2012. – 188 с.
4. Калганова, Т. Н. Практикум по микробиологии и биотехнологии: лабораторные работы. – Южно-Сахалинск: Изд-во СахГУ, 2011. – 56 с.
5. Алёхина Г.П. Микробиология с основами вирусологии : методические указания к лабораторным занятиям. – Оренбург, ГОУ-ОГУ, 2003. – 73 с.

Теоретическая часть

Микроорганизмы широко распространены в природе и обнаруживаются во всех природных средах. Обнаружение и количественный учет микроорганизмов в объектах окружающей среды необходимы при санитарно-гигиенических и экологических исследованиях для моделирования природных систем и разработки основ управления природными процессами.

О росте микроорганизмов в естественных субстратах или питательных средах судят по изменению количества клеток или биомассы в единице объема. Методы определения этих показателей могут быть прямыми и косвенными. Косвенные методы основаны на изменении параметров, величина которых зависит от количества или биомассы микроорганизмов (содержания в ней белка, рассеяние или поглощение суспензией света и т. п.). По прямые методы основаны не посредственно на подсчете клеток под микроскопом или взвешиванием. Выбор метода зависит от природы субстрата или свойств питательной среды, от целей исследования, а также особенностей роста и морфологии микроорганизмов.

При подсчете численности микроорганизмов в естественных субстратах, особенно в почве, необходимо помнить, что их клетки находятся в прикрепленном (адгезированном) состоянии или в виде микроколоний. Поэтому перед началом подсчета их необходимо десорбировать от субстрата. Выбор метода десорбции определяется свойствами питательной среды и природой субстрата. В качестве метода десорбции обычно используют механическое перемешивание суспензий клеток, растирание, обработка ультразвуком, применение поверхностно-активных веществ и др.

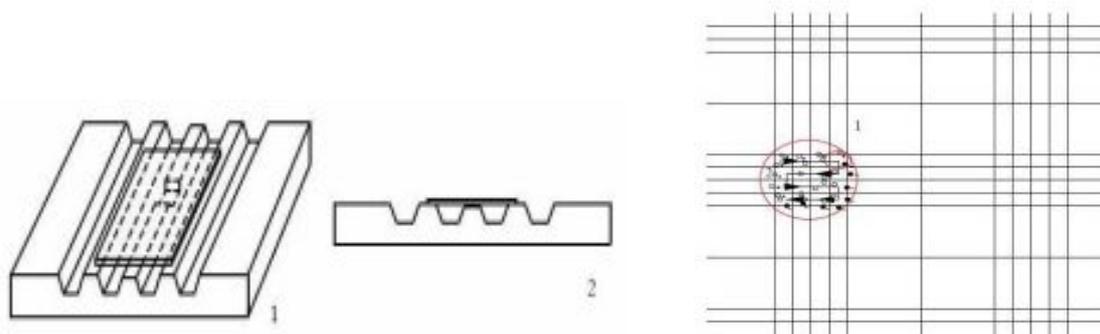
1. Методы количественного учета микроорганизмов

а. Определение количества клеток под микроскопом

Определение количества живых и мертвых клеток микроорганизмов прямым методом возможно только с помощью микроскопов, обеспечивающих увеличение исследуемых объектов в сотни (световая микроскопия) и десятки тысяч (электронная микроскопия).

Подсчитать клетки микроорганизмов под микроскопом можно используя счетные камеры, капилляры Перфильева, препараты фиксированных и окрашенных клеток, приготовленные на предметных стеклах или мембранных фильтрах. Перечисленные методы позволяют определить общее количество клеток в единице объема (мертвых и живых). Основное ограничение большинства указанных методов – высокая концентрация клеток в единице объема исследуемого субстрата.

Подсчет клеток в счетных камерах. Этот метод рекомендуется использовать для подсчета крупных объектов – дрожжей, одноклеточных водорослей, конидий грибов и некоторых относительно крупных бактерий. Обычно используют камеру Горяева – Тома (рис. 1), хотя можно применять и другие счетные камеры. Число клеток подсчитывают с объективом 8х или 40х.



Камера Горяева: 1 – вид сверху; 2 – вид сбоку

Сетка Горяева: 1 – маленький квадрат; 2 – большой квадрат

Рис. 1. Камера для подсчета количества клеток Горяева-Тома

В камере Горяева (рис. 1) подсчитывают клетки микроорганизмов в 10 больших или 20 маленьких квадратах сетки, перемещая последние по диагонали. Учитывают все клетки, лежащие в квадрате сетки, а также клетки, пересекающие верхнюю и правую стороны квадрата. При подсчете количество клеток в большом квадрате не должно превышать 20, а в малом – 10, в противном случае исходную суспензию разводят водопроводной водой. Для получения достоверного результата общее число подсчитанных клеток микроорганизмов должно быть не менее 600.

Количество клеток в 1 мл исследуемой суспензии вычисляют по формуле:

$$M = \frac{a \cdot 10^3}{h \cdot S} \cdot n,$$

где M – число клеток в 1 мл суспензии; a – среднее количество живых клеток в квадрате сетки; h – высота камеры, мм; S – площадь квадрата сетки, мм²; 10^3 – коэффициент перевода в мм³; n – коэффициент разведения исследуемой суспензии.

б. Капиллярный метод прямого счета микроорганизмов

Для подсчета микроорганизмов Б.В. Перфильев предложил использовать капилляры с плоскопараллельными стенками (рис. 2). Таким образом, благодаря плоским стеклам и узкому параллельному просвету

каналов капилляры с клетками можно рассматривать под микроскопом при большем увеличении и с иммерсией, в отличие от камеры Горяева. Поэтому данный метод нашел применение для подсчета микробных клеток и контроля роста бактерий в промышленной, пищевой, а также медицинской микробиологии.

При погружении капилляра в субстрат он заполняется за счет капиллярных свойств. Затем капилляр помещают на предметное стекло, заливая расплавленным парафином и подсчитывают клетки при увеличении 40х, 90х или используют фазово-контрастное устройство. Подсчитывают клетки в 50–100 полях зрения, подсчет ведут во всех капиллярах. Количество клеток в 1 мл исследуемого субстрата определяют по формуле:

$$M = \frac{a \cdot 10^3}{h \cdot l \cdot d} \cdot n,$$

где M – число клеток в 1 мл исследуемого субстрата; a – среднее количество живых клеток в капилляре длиной в диаметр поля зрения; h – глубина капилляра, мм; l – ширина капилляра, мм; d – длина капилляра, мм; S – площадь квадрата сетки, мм²; 10^3 – коэффициент перевода в мм³; n – коэффициент разведения исследуемого субстрата.

в. Подсчет клеток на фиксированных окрашенных мазках (метод Виноградского-Брида)

Этот метод применяется в различных модификациях для определения числа микроорганизмов в различных естественных субстратах (почва, загрязненная вода, оптически не прозрачные среды и др.).

Для приготовления препарата на хорошо обезжиренное подготовленное предметное стекло с сеткой (предметное стекло помещают миллиметровую бумагу, на которой отмечен прямоугольник площадью 4 или 6 см²) из микропипетки наносят точно измеренный объем исследуемой суспензии (0,01, 0,02 или 0,03 см³) и каплю 0,03–0,1%-го водного раствора агара. Нанесенную суспензию равномерно распределяют петлей по площади, отмеченной на миллиметровой бумаге. Препарат подсушивают на воздухе, фиксируют 10–20 мин 96%-м спиртом и окрашивают 1–2 мин фуксином Циля. Препарат промывают от красителя, последовательно погружая стекло в дистиллированную воду и высушивают на воздухе. В таком виде препараты хорошо сохраняются. Препарат микроскопируют с иммерсионным объективом. Подсчитывают клетки с использованием иммерсионного объектива в 50–100 полях зрения. Общее количество подсчитанных клеток не должно быть менее

600. Количество клеток микроорганизмов, содержащихся в 1 мл исследуемого субстрата, вычисляют по формуле

$$M = \frac{a \cdot S}{s \cdot V} \cdot n,$$

где M – число клеток в 1 мл исследуемого субстрата; a – среднее количество живых клеток в капилляре длиной в диаметр поля зрения; s – площадь квадрата сетки (площадь поля зрения, $S = \pi r^2$), мм²; V – объем нанесенной на стекло суспензии, см³; S – площадь мазка, мм²; n – коэффициент разведения исследуемого субстрата.

Преимущество метода заключается в том, что фиксированные окрашенные препараты хорошо сохраняются, поэтому подсчет можно проводить в удобное для исследователя время.

г. Подсчет клеток на мембранных фильтрах

Метод применяется для определения численности микроорганизмов в субстратах с низкой плотностью клеток. Его применяют для определения количества микроорганизмов в различных водоемах, при санитарно-бактериологических исследованиях. Фильтрование пробы известного объема позволяет сконцентрировать на поверхности фильтра содержащиеся в пробе клетки микроорганизмов. Для фильтрования выбирают фильтр, размеры пор которого позволяют задерживать микроорганизмы, находящиеся в субстрате. Клетки осевшие на фильтре окрашивают карболовым эритрозинном и подсчитывают. Количество клеток микроорганизмов подсчитывают с иммерсионным объективом 90х в поле зрения микроскопа. Количество клеток в 1 мл исследуемого субстрата вычисляют по формуле:

$$M = \frac{a \cdot F \cdot 10^6}{s \cdot V},$$

где M – число клеток в 1 мл исследуемого субстрата; a – среднее количество живых клеток в капилляре длиной в диаметр поля зрения, мм; F – площадь мембранного фильтра, мм²; S – площадь квадрата окулярной сетки (площадь поля зрения, $S = \pi r^2$), мм²; 10^6 – коэффициент перевода в [мм²] в [мкм²]; V – объем профильтрованной жидкости, см³.

2. Определение количества клеток микроорганизмов высевом питательные среды

В отличие от подсчета микроорганизмов под микроскопом этот метод дает возможность определить только жизнеспособные культивируемые формы микроорганизмов. Данный метод нашел широкое применение для определения численности клеток в естественных субстратах и в лабораторных культурах.

2.1. Высев на плотные питательные среды (чашечный метод Коха)

В основе метода лежит принцип Коха, согласно которому каждая колония является потомством одной клетки. *Колония* – это изолированное скопление клеток одного вида, выросшее в большинстве случаев из одной клетки. На основании числа колоний, выросших после посева на плотную питательную среду определенного объема исследуемой суспензии, можно судить об исходном содержании в ней клеток микроорганизмов. Результаты количественного учета микроорганизмов, проведенного методом Коха, часто выражают не в числе клеток, а в условных единицах – так называемых колониобразующих единицах (КОЕ).

Определение числа микроорганизмов этим методом включает три этапа: приготовление разведений, посев на плотную среду в чашки Петри и подсчет выросших колоний.

Приготовление разведений: Численность популяций микроорганизмов обычно велика, поэтому для получения изолированных колоний необходимо приготовить ряд последовательных разведений. Степень разведения зависит от плотности исследуемой популяции микроорганизмов, она тем больше, чем больше плотность популяций. Разведение готовят в стерильной водопроводной воде или 0,9%-м растворе хлориде натрия (физиологический раствор). В ходе опыта используют коэффициент разведения 10 (рис. 3).

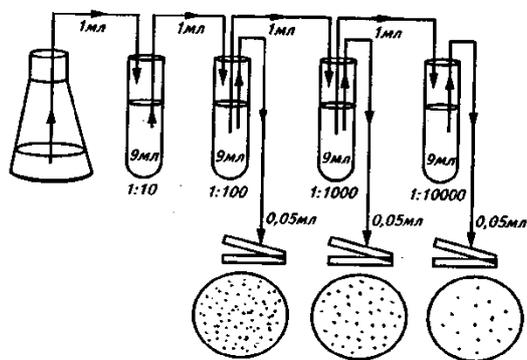


Рис. 3 Схема приготовления разведений и посева суспензии микроорганизмов

Посев. Высевать суспензию можно поверхностным или глубинным способом. Перед посевом поверхностным способом разливают расплавленную, чаще всего агаризованную, питательную среду в ряд стерильных чашек Петри по 15–20 см³ в каждую. Чашки оставляют на горизонтальной поверхности, пока среда не застынет. Поверхность агаризованных сред перед посевом рекомендуется подсушивать для удаления конденсационной воды. После того как среда готова, на ее поверхность стерильной пипеткой наносят точно измеренный объем (0,05 или 0,1 мл)

соответствующего разведения и равномерно распределяют по поверхности среды. При глубинном посеве точно измеренный объем (как правило, 0,1; 0,5 или 1,0 мл) исходной суспензии или разведения вносят в стерильные чашки Петри и сверху заливают чашки по 15–20 см³ расплавленной и остуженной до 48–50 °С агаризованной средой. Как только среда застынет, чашки Петри в перевернутом виде помещают в термостат.

Подсчет выросших колоний. Колонии микроорганизмов в зависимости от скорости роста подсчитывают через 2–15 суток инкубации. Подсчет, как правило, проводят, не открывая чашек Петри. Для удобства каждую просчитанную колонию отмечают точкой на наружной стороне дна чашки. При большом количестве колоний дно чашки Петри делят на секторы, просчитывают колонии в каждом секторе и суммируют результаты. Результаты учитывают на тех чашках Петри, на которых вырастает от 30–50 до 100–150 колоний. Если число выросших колоний оказалось меньше 10, то эти результаты для расчета количества клеток в исходном материале не используют.

Количество клеток в 1 мл исследуемого субстрата вычисляют по формуле:

$$M = \frac{a \cdot 10^n}{V},$$

где M – число клеток в 1 мл исследуемого субстрата; a – среднее число колоний, выросших после посева из данного разведения; V – объем суспензии, взятый для посева, см³; профильтрованной жидкости, см³; 10^n – коэффициент разведения.

2.2. Высев на жидкие среды (метод предельных разведений или метод Мак-Креди)

Метод используется для подсчета микроорганизмов, которые плохо или совсем не растут на плотных питательных средах. В пробирки с жидкой питательной средой вносят строго измеренных объем из различных разведений питательного субстрата. Разведения исходной суспензии готовят как и для чашечного метода. После инкубации исходя из числа пробирок регистрируют рост микроорганизмов (помутнение среды, образование пленки, осадка, газа и др.) или его отсутствие и определяют наиболее вероятное число микроорганизмов в единице объема исходного субстрата по таблице Мак-Креди (Прил. 1), разработанной на основании методов вариационной статистики.

Для расчета наиболее вероятного количества микробных клеток в 1 см³ пробы методом предельных разведений составляли числовую ха-

рактеристику (ЧХ), которая включает три цифры. Первая цифра показывает число пробирок в том последнем разведении, при высеве из которого во всех засеянных пробирках был отмечен рост. Две следующие цифры означают число пробирок, в которых отмечен рост микроорганизмов при засеве из двух последующих разведений. Затем по таблице находили наиболее вероятное число микроорганизмов, соответствующее данному значению числовой характеристики. Количество микроорганизмов в 1 см³ исходной суспензии соответствует этому числу, умноженному на то разведение, при котором был рост во всех пробирках.

Например:

Характеристика	Показатель				
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Разведение исходной суспензии	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Число засеянных пробирок	2	2	2	2	2
Число пробирок, в которых обнаружен рост	2	2	2	1	0
Числовая характеристика (ЧХ)	210				
Наиболее вероятное число микроорганизмов* ¹	6,0				
Количество микроорганизмов в 1 см ³ исходной суспензии	6,0·10 ³				

3. Косвенные методы определение биомассы или количества клеток микроорганизмов

3.1. Определение количества клеток и биомассы нефелометрическим методом

В основе метода лежит измерение ослабления светового пучка света при его прохождении через суспензию клеток. В определенных пределах оно и пропорционально концентрации клеток и обусловлено преимущественно рассеянием света клетками. Величина этого показателя зависит от многих факторов (формы и размеров клеток, оптических свойств культуральной среды, длины волны падающего света и т. д.). Поэтому нефелометрический метод пригоден лишь для тех микроорганизмов, рост которых вызывает помутнение среды и не сопровождается заметным изменением формы и размеров клеток, образованием мицелия, пленок или других скоплений. Питательная среда, в которой предполагается определять число клеток, должна быть оптически прозрач-

¹ Используется таблица Мак-Креди (прил. 1).

ной. Изменение интенсивности света при прохождении через суспензию клеток измеряют с помощью фотоэлектроколориметра (ФЭК) или спектрофотометра, выбирая длину волны (обычно в интервале 540–650 нм), при которой поглощение света данной суспензией клеток является минимальным. При высоких концентрациях клеток в культуральной среде происходит вторичное рассеивание света, что приводит к занижению результатов.

Для определения количества клеток предварительно проводят калибровку прибора с различным содержанием клеток и в каждой из них определяют оптическую плотность суспензии. Калибровочный график строят в координатах оптическая плотность от количества клеток в 1 мл суспензии или биомассу в г/л. Для каждого микроорганизма строят свой калибровочный график.

3.2. Стандарты мутности

В ряде случаев количество клеток в суспензии бывает достаточно определить визуально путем сравнения со стандартом мутности. Стандарты мутности, выпускаемые государственным НИИ стандартизации и контроля медицинских и биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича, представляют собой взвесь частиц стекла пирекс в дистиллированной воде.

За единицу стандарта мутности общего назначения условно принята мутность суспензии в физиологическом растворе бактерий – возбудителей тифа с концентрацией клеток 100 млн/мл. Стандарт мутности включает 4 эталона на 11, 10, 9 и 5 единиц, что соответствует содержанию $1,1 \cdot 10^9$; $1 \cdot 10^9$; $0,9 \cdot 10^9$ и $0,5 \cdot 10^9$ клеток в 1 мл взвеси. Для определения количества клеток пробирку с исследуемой суспензией ставят рядом с эталоном 10 и рассматривают их в отраженном и проходящем свете на фоне белого листа бумаги, в центре которого нанесено несколько черных линий.

4. Культуральные и физико-биохимические свойства микроорганизмов

Для установления принадлежности микроорганизмов к таксону (класс, порядок, семейство) достаточно определять только некоторые культуральные свойства и физиолого-биохимические особенности культуры. К культуральным свойствам относятся характерные особенности роста культуры микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах. При характеристике физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов учитывают способность их расти на питательных средах и вызывать определенные превращения веществ, входящих в со-

став сред. Учитывают использование в среде соединений углерода, азота, серы, способность образовывать антибиотические вещества, проявлять ферментативную активность в отношении определенных субстратов и др. На особенность колонии также влияет возраст, состав среды и температуру культивирования. Для описания колоний и роста многие микроорганизмы культивируют на мясопептонном агаре.

4.1. Рост на плотных питательных средах

На поверхности плотных питательных сред в зависимости от посева микроорганизмы могут расти в виде колонии, штриха или сплошного газона. В зависимости от развития клеток на плотной питательной среде (на поверхности, в толще или на дне сосуда) различают поверхностные, глубинные и донные колонии.

Образование поверхностных колоний наиболее существенная особенность роста многих микроорганизмов на плотном субстрате. Поверхностные колонии отличаются большим разнообразием (рис. 4).

При описании колоний учитывают следующие **признаки**:

1. Форму округлая, амебовидная, неправильная, ризоидная и т. д. (рис. 4).

2. Размер {диаметр} измеряют в миллиметрах. Если размеры колонии $d > 4-6$ мм крупная, $d = 2-4$ мм средняя, $d = 1-2$ мм мелкая, $d < 1$ мм точечная.

3. Поверхность гладкая, шероховатая, бороздчатая, складчатая, морщинистая, с концентрическими кругами или радиально исчерченная;

4. Профиль плоский, выпуклый, кратерообразный, конусовидный и т. д. (рис. 5).

5. Блеск (прозрачность) колония блестящая, матовая, тусклая, мучнистая, прозрачная;

6. Цвет бесцветная (грязно-белые колонии относят к бесцветным) или пигментированная (белая, желтая, золотистая, оранжевая, сиреневая, красная, черная и т. д.) и наличие пигмента.

7. Форма края ровный, волнистый, зубчатый (рис. 6)

8. Структура – однородная, мелко- или крупнозернистая, струйчатая, волокнистая (рис. 7).

9. Консистенцию. Определяют консистенцию, прикасаясь к поверхности колонии петлей. Колония может быть плотной, мягкой, легко сниматься с агара, растающей в агар, слизистой, тягучей, в виде пленки, хрупкой (легко ломается при прикосновении петлей) и др.

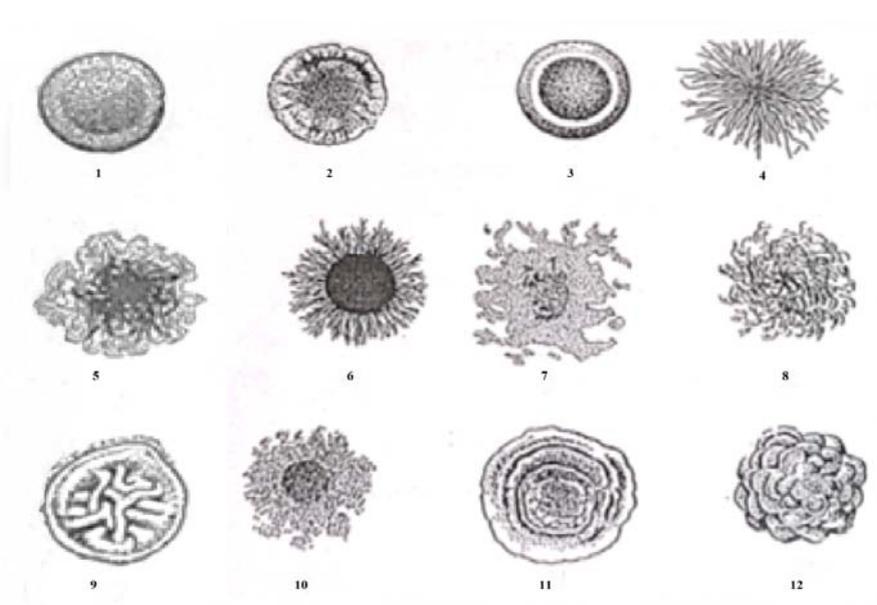


Рис. 4. Форма колонии: 1 – круглая; 2 – круглая с фестончатым краем; 3 – круглая с валиком по краю; 4, 5 – ризоидные; 6 – с ризоидным краем; 7 – амёбовидная; 8 – нитевидная; 9 – складчатая; 10 – неправильная; 11 – концентрическая; 12 – сложная

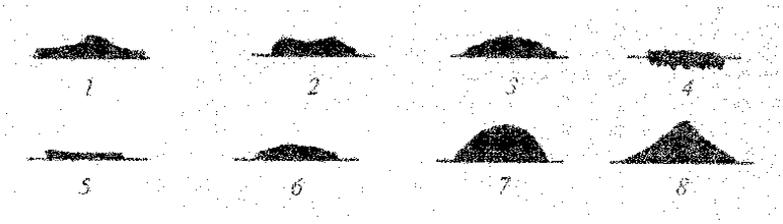


Рис. 5 Профиль колонии: 1 – изогнутый; 2 – кратерообразный; 3 – бугристый; 4 – врастающий в субстрат; 5 – плоский; 6 – выпуклый; 7 – каплевидный; 8 – конусовидный

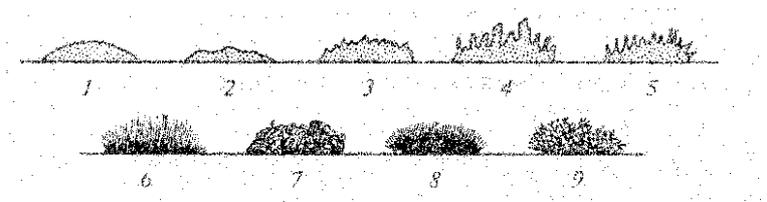


Рис. 6. Край колонии: 1 – гладкий; 2 – волнистый; 3 – зубчатый; 4 – лопастной; 5 – неправильный; 6 – реснитчатый; 7 – нитчатый; 8 – ворсинчатый; 9 – ветвистый

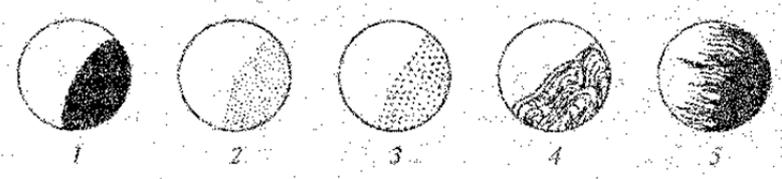


Рис. 7. Структура колонии: 1 – однородная; 2 – мелкозернистая; 3 – крупнозернистая; 4 – струйчатая; 5 – волокнистая

При описании роста колоний по штриху отмечают следующие особенности: скудный, обильный, сплошной с ровным или волнистым краем и др. (рис. 8). Характеризуют оптические свойства налета, его цвет, поверхность, консистенцию.

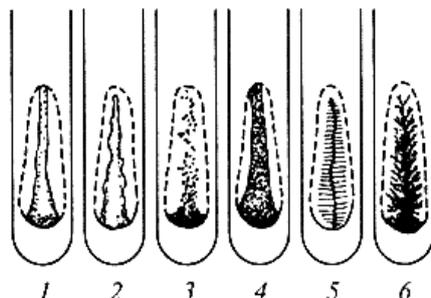


Рис. 8. Рост бактерий по штриху: 1 – сплошной с ровным краем; 2 – сплошной с волнистым краем; 3 – четковидный; 4 – диффузный; 5 – перистый; 6 – ризоидный

Глубинные колонии в отличие от поверхностных довольно однообразны. Образование глубинных колоний часто сопровождается разрывом плотной среды. У немногих бактерий глубинные колонии напоминают пучки ваты с нитевидными выростами.

4.2. Рост в жидких питательных средах

Для описания характера роста микроорганизмов в жидких средах их выращивают на мясо-пептоном бульоне (МПБ) или другой среде, обеспечивающей хороший рост. Рост микроорганизмов в жидких питательных средах более однообразен и сопровождается помутнением среды, образованием пленки или осадка. При описании культуральных свойств на жидкой питательной среде отмечают степень помутнения (слабая, умеренная, сильная), особенности пленки (тонкая, плотная, гладкая, складчатая), наличие осадка (скудный, обильный, консистенцию), наличие запаха, пигментации среды, выделение газа.

Экспериментальная часть

Лабораторная работа № 1 «Анализ микрофлоры воздуха»

Цель: знакомство с микрофлорой воздуха.

План работы:

1. Описать колонии микроорганизмов, выросшие в чашках Петри.
2. Рассчитать количество микроорганизмов в 10 л воздуха.
3. Провести окраску по Граму некоторых колоний микроорганизмов, рассмотреть с иммерсией и зарисовать.

Материалы и оборудование.

Оборудование: микроскоп, термостат, сушильный шкаф, технические весы, плитка.

Материалы: колбы на 100 и 50 см³, химический стакан на 50 см³, чашки Петри предметные стекла, стеклянная палочка, стерильные пробирки на 20 см³, спиртовка, колонии микроорганизмов, выросшие на МПА в чашках Петри при посеве микрофлоры воздуха.

Реактивы: дистиллированная стерильная вода, фуксин, раствор Люголя, генцианвиолет, раствор 96%-м этилового спирта.

1. Описание колоний

Из воздуха прорастает от 30 до 60 % всех обитающих микроорганизмов и спор.

Выберите любую изолированную колонию, выросшую на чашке Петри и охарактеризуйте ее по следующим показателям: размер, форма, цвет, поверхность, профиль колонии и др. Используя рис. 4–7, заполните таблицу.

Культуральные свойства микроорганизмов микрофлоры воздуха

Показатель колонии	Описание	Примечание
Размер		
Форма		
Цвет		
Поверхность		
Профиль		
Край		
Структура		
Консистенция		
Оптические свойства		

2. Определение количества микроорганизмов при прямом посеве из воздуха

Считаем, что каждая колония возникла из одной клетки или споры. Подсчитайте общее количество колоний (точечные, мелкие, крупные, средние) микроорганизмов, выросших в чашке Петри. Для удобства поле чашки Петри делят на сектора (3–5), просчитывая колонии в каждом секторе и затем суммируя результат.

Крупные и средние колонии просчитываются полностью. Расчет числа мелких и точечных колоний ведут с использованием «глазка». Для этого из миллиметровой бумаги вырезается квадрат размером 3×3 см, в центре квадрата делается «глазок» – поле зрения 1 см². «Глазок» квадрата передвигают по нижней части чашки Петри в 3–5 различных участках сектора и просчитывают общее количество всех мелких и точечных колоний, попавших в поле зрения 1 см². Затем по всем участкам подсчитывают среднее количество микроорганизмов в 1 см² и делают перерасчет на всю площадь чашки Петри согласно уравнению 1:

$$n = a \cdot S, \quad (1)$$

где n – количество мелких и точечных колоний микроорганизмов в 1 см², a – среднее количество микроорганизмов в 1 см², S – площадь чашки Петри, см².

Полученное число мелких и точечных колоний (n) суммируют с количеством средних и крупных колоний микроорганизмов, подсчитанных на всей площади чашки Петри. По полученным данным делаем пересчет на 10 л воздуха. Согласно приблизительным подсчетам Омелянского В.Л. на площади в 100 см² оседает в течение 5 мин. столько микроорганизмов и спор, сколько их содержится в 10 л воздуха. Следовательно, по пропорции можем рассчитать общее количество микроорганизмов в 10 л воздуха:

$$A = \frac{N \cdot S}{100} \quad (2)$$

где A – количество микроорганизмов в 10 л воздуха, N – общее количество колоний микроорганизмов, выросших на всей чашки Петри, S – площадь чашки Петри, см².

Полученные данные заносят в таблицу и делают вывод о влиянии ультрафиолетового облучения на рост колоний.

№ пробы	Общее микробное число в воздухе по методу оседания	
	Без УФ облучения	При УФ облучении

3. Микроскопическое обследование колоний

Микроскопическое обследование микроорганизмов проводят наиболее интересных колоний, выросших на питательной среде в чашках Петри. Для этого готовят фиксированные окрашенные препараты и рассматривают их под микроскопом с иммерсионным объективом. Определяют, к какой группе относятся обнаруженные микроорганизмы (кокки, палочки и др.) и как они делятся по Граму.

3.1. Приготовление фиксированных препаратов

1. На центр чистого обезжиренного предметного стекла пипеткой Пастера наносят каплю стерильной дистиллированной воды.

2. В каплю дистиллированной воды вносят с помощью микробиологической петли наиболее интересную колонию и равномерно этой же петлей очень тонким слоем распределяют суспензию на 1/5 центральной части поверхности предметного стекла.

3. Высушивают мазок на воздухе или высоко над пламенем спиртовки.

4. Зафиксируют мазок сухим жаром (термическая фиксация): закрепив предметное стекло пинцетом мазком вверх, проводят его сквозь пламя спиртовки плавными круговыми движениями 3–5 раз. При этом микроорганизмы убиваются и прочно прикрепляются к стеклу.

Микроскопируют с иммерсионным объективом и зарисовывают получившуюся картинку (прил. 2). Определяют, к какой группе относятся обнаруженные микроорганизмы: кокки, палочки, сарцины, дрожжи или грибы.

3.2. Окраска бактерий по Граму

1. На фиксированный мазок наносят с помощью пипетки каплю карболово-спиртового раствора генцианового фиолетового, накрывают полоской фильтровальной бумаги. Через 1–2 мин снимают ее, а краситель смывают.

2. Наносят раствор Люголя на 2 мин.

3. Обесцвечивают препарат 95%-м этиловым спиртом в течении 30–60 с до прекращения отхождения фиолетовых струек красителя.

4. Промыть препарат водой.

5. Проводят докрасивание препарата фуксином на 1–2 мин, промывают водой, подсушивают на воздухе.

6. Рассматривают с иммерсией и зарисовывают (прил. 2). Делают вывод о принадлежности культуры к грам(+) и грам(-).

3.2.1. Экспресс-метод определения грам-типа микроорганизмов

1. На центр чистого обезжиренного предметного стекла пипеткой Пастера наносят каплю раствора 3%-го КОН.
2. Микробиологической петлей в каплю вносят анализируемую колонию.
3. Тщательно перемешивают колонию с раствором гидроксида калия с помощью петли.
4. Через 5–10 с медленно поднимают микробиологическую петлю на 2–3 см и устанавливают наличие или отсутствие слизи.

Наличие слизи свидетельствует о том, что анализируемая культура относится к грам (+) типу микроорганизмов. Отсутствие слизи говорит о том, что реакция отрицательная – культура грам(–).

Лабораторная работа № 2 «Анализ микрофлоры воды»

Цель: проанализировать микрофлору воды, посеянной по методу разбавления.

План работы:

1. Описать колонии микроорганизмов, выросшие в чашках Петри.
2. Рассчитать количество микроорганизмов в 1 мл воды.
3. Провести окраску по Граму некоторых колоний микроорганизмов, рассмотреть с иммерсией и зарисовать.
4. Сделать вывод, к какой зоне сапробности относится анализируемая вода

Материалы и оборудование.

Оборудование: микроскоп, термостат, сушильный шкаф, технические весы, плитка.

Материалы: колбы на 100 и 50 см³, химический стакан на 50 см³, чашки Петри предметные стекла, стеклянная палочка, стерильные пробирки на 20 см³, спиртовка; колонии микроорганизмов, выросшие на МПА в чашках Петри при посеве микрофлоры воды, флаконы с микроорганизмами, посеянными по методу Мак-Креди.

Реактивы: дистиллированная стерильная вода, карболовый фуксин, раствор Люголя, генцианвиолет, раствор 96%-м этилового спирта.

1. Описание колоний

Выберите любую изолированную колонию, выросшую на чашке Петри и охарактеризуйте ее по следующим показателям: размер, форма, цвет, поверхность, профиль колонии и др. Используя рис. 4-7, заполните таблицу по следующим показателям.

Таблица

Культуральные свойства микроорганизмов микрофлоры воздуха

Показатель колонии	Описание	Примечание
Размер		
Форма		
Цвет		
Поверхность		
Профиль		
Край		
Структура		
Консистенция		
Оптические свойства		

2. Определение количества микроорганизмов в 1 см³ суспензии воды

Чашечный метод и метод предельных разведений требуют особой чистоты и аккуратности при выполнении всех операций. Необходимо тщательно оберегать пипетки, пробирки и среды от заражения микроорганизмами из воздуха, так как каждая случайно попавшая клетка может заметно завысить число микроорганизмов в анализируемой пробе.

Вариант 1 Определение количества клеток на плотных питательных средах (метод Коха)

Подсчет колоний в чашках Петри при посевах микрофлоры воды ведется аналогично с предыдущей работой. Вначале рассчитывается число крупных и средних колоний, выросших на всей площади чашки, которая для удобства подсчета делится на секторы. Затем рассчитывается число мелких и точечных колоний вначале в площади «глазка» – 1 см² в различных участках чашки Петри, затем среднее количество колоний в 1 см² пересчитывается на площадь чашки Петри и суммируется с числом средних и крупных колоний. После этого ведется пересчет числа колоний на 1 мл исходной посеянной жидкости с учетом разбавления. A (колоний/мл):

$$A = \frac{N \cdot S}{10^{-m}} \quad (3)$$

где A – количество микроорганизмов в 1 мл воды (колоний/мл); N – общее количество колоний микроорганизмов, выросших на всей чашки Петри, S – площадь чашки Петри, см², 10^{-m} – степень разбавления при посеве.

Вариант 2 Определение количества микробных клеток по методу предельных разведений (метод Мак-Креди)

Для расчета наиболее вероятного количества микробных клеток в 1 см³ пробы методом предельных разведений составляем числовую характеристику (ЧХ). Далее, с использованием таблицы Мак-Креди (прил. 1), по соответствующее данному значению числовой характеристики определяют наиболее вероятное число микроорганизмов.

Заполните таблицу и рассчитайте количество клеток микроорганизмов в 1 см³ исходной суспензии.

Характеристика	Показатель					
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Разведение исходной суспензии						
Число засеянных пробирок						
Число пробирок, в которых обнаружен рост						
Числовая характеристика (ЧХ)						
Наиболее вероятное число микроорганизмов* ²						
Количество микроорганизмов в 1 см ³ исходной суспензии						

Сравните полученные значения количества микроорганизмов по двум методам. Сделайте вывод о степени загрязненности воды.

3. Определение степени загрязненности водоемов

Степень загрязненности водоемов различными микроорганизмами соответствует определенным зонам сапробности:

- а) олигосапробная, или малозагрязненная, зона содержит в 1 см³ микроорганизмов от 10^1 – 10^3 ;
- б) мезосапробная, или зона средней загрязненности содержит в 1 см³ микроорганизмов от 10^3 – 10^6 ;
- в) полисапробная, или сильнозагрязненная, зона содержит в 1 см³ микроорганизмов более 10^6 .

4. Микроскопическое обследование колоний

Микроскопическое обследование микроорганизмов проводят из наиболее интересных колоний, выросших на питательной среде в чашках Петри аналогично с предыдущей работой. Для этого готовят фиксированные окрашенные препараты и рассматривают их под микроскопом с иммерсионным объективом. Определяют, к какой группе относятся обнаруженные микроорганизмы (кокки, палочки, сарцины, дрожжи, грибы), устанавливают, как они делятся по Граму (прил. 2).

В работе сделать вывод, к какой зоне сапробности относится анализируемая вода. Зарисовать окрашенные по Граму микроорганизмы, сделать вывод об их принадлежности к группе грам(+) или грам(–) микроорганизмов.

² Используется таблица Мак-Креди (приложение 1).

Контрольные вопросы

1. Опишите основные методы изучения количественного состава микробов?
2. В чем сущность метода серийных разбавлений и предельных разбавлений воды и суспензий?
3. Какие вам известны культуральные и физико-биохимические характеристики микроорганизмов? Для чего проводят изучение физико-биохимические свойства микроорганизмов?
4. В какой среде – воде, воздухе – наиболее обильно представлены микроорганизмы? Какие микроорганизмы преобладают (кокки, палочки, сарцины, дрожжи, грибы)?

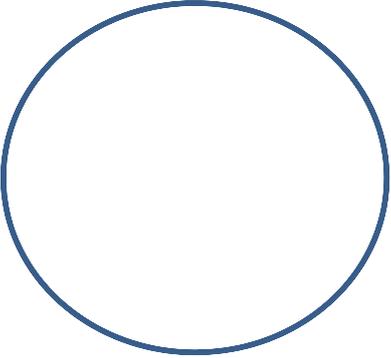
ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Таблица 1

Наиболее вероятное количество клеток микроорганизмов в единице объема исходной суспензии (по Мак – Креди)

Числовая характеристика	Наиболее вероятное число микробов при засеве параллельных пробирок			
	2	3	4	5
200	2,5	0,9	0,6	0,5
201	5,0	1,4	0,9	0,7
202	–	2,0	1,2	0,9
203	–	–	1,6	1,2
210	6,0	1,5	0,9	0,7
211	13,0	2,0	1,3	0,9
212	20,0	3,0	1,6	1,2
213	–	–	2,0	–
220	25,0	2,0	1,3	0,9
221	70,0	3,0	1,6	1,2
222	110,0	3,5	2,0	1,4
223	–	4,0	–	–
230	–	3,0	1,7	1,2
231	–	3,5	2,0	1,4
232	–	4,0	–	–
240	–	–	2,0	1,4
241	–	–	3,0	–
300	–	2,5	1,1	0,8

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

 <p><i>Рис. 1. Окраска по Граму</i></p>	<p><i>Описание наблюдений:</i></p>
--	---

Учебное издание

АНАЛИЗ МИКРОФЛОРЫ ВОЗДУХА И ВОДЫ

Методические указания к выполнению лабораторной работы по дисциплинам «Микробиология», «Фармакология, биохимия, микробиология» и «Биотехнология» для студентов ИПР, ИФВТ дневной формы обучения

Составитель

АСТАШКИНА Анна Павловна

Издано в авторской редакции

Компьютерная верстка *Д.В. Сотникова*

Подписано к печати 12.10.2015. Формат 60х84/16. Бумага «Снегурочка».

Печать XEROX. Усл. печ. л. 1,45. Уч.-изд. л. 1,31.

Заказ 404-15. Тираж 100 экз.



Национальный исследовательский Томский политехнический университет

Система менеджмента качества

Издательства Томского политехнического университета

Сертифицирована в соответствии с требованиями ISO 9001:2008



ИЗДАТЕЛЬСТВО  **ТПУ**. 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30
Тел./факс: 8(3822)56-35-35, www.tpu.ru