# ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБЩЕОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ

# ЛУГАНСКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ

«АЛЧЕВСКАЯ ГИМНАЗИЯ ИМЕНИ ГЕРОЯ СОВЕТСКОГО СОЮЗА

ПЕТРА НИКОЛАЕВИЧА ЛИПОВЕНКО»

|  |
| --- |
| Отделение: химико-биологическое |
| экологии и аграрных наук |
| Секция: экология и природопользование |

НАУЧНО −ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ РАБОТА

« ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОФЛОРЫ ВОЗДУХА И ВОДЫ

ОТКРЫТОГО БИОТОПА»

Выполнила

Минка Диана

ученица 9-А класса

Научный руководитель

Беденко Ольга Геннадиевна

учитель химии

Алчевск 2022 г.

СОДЕРЖАНИЕ

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ВВЕДЕНИЕ | | 4 |
| РАЗДЕЛ 1 | ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 6 |
| 1.1 | Характеристика микрофлоры воды открытого биотопа - пруда. | 6 |
| 1.2 | Характеристика микрофлоры воздуха открытого биотопа. | 11 |
| 1.3 | Характеристика морфологии бактерий | 13 |
| РАЗДЕЛ 2 | ОБЪЕКТ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ | 15 |
| 2.1 | Отбор образцов и высевание на питательные среды | 15 |
| 2.1.1 | Определение общего микробного числа (ОМЧ) | 15 |
| 2.1.2 | Определение индекса БГКП | 16 |
| 2.2 | Выделение чистой культуры. | 17 |
| 2.3 | Определение физиолого-биохимических особенностей и антибиотической активности выделенного изолята. | 17 |
| РАЗДЕЛ 3 | РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ | 19 |
| 3.1 | Определение общего количества микроорганизмов в исследованной воде и воздухе. | 29 |
| 3.2 | Описание морфолого-культуральных особенностей выделенного изолята | 20 |
| 3.2.1 | Культурально – морфологические свойства выделенного изолята из воздуха | 20 |
| 3.2.2 | Культурально – морфологические свойства выделенного изолята из воды | 20 |
| 3.3 | Определение физиолого-биохимических свойств и антибиотической активности выделенного изолята | 20 |
|  | ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 25 |
|  | СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ |  |
|  | ПРИЛОЖЕНИЯ |  |

|  |  |
| --- | --- |
| **Сокращение** | **Расшифровка** |
| ОМЧ | Общее микробное число |
| БГКП | Бактерии группы кишечные палочки |
| КОЕ | Колониеобразующие единицы |
| МПА | Мясопептонный агар |
| ЖСА | Желточно-солевой агар |
| КМАФАнМ | Количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов |

ВВЕДЕНИЕ

Загрязнение окружающей среды, безусловно, является одной из самых острых проблем для современных ученых. Загрязнение водоемов, воздуха и почвы химическими отходами, газовыми выхлопами и токсичными соединениями не только ухудшает условия нашей жизни, но и способствует стремительному размножению микроорганизмов в разных экологических нишах. Бактерии распространены по всей планете, во всех биотопах, как закрытого, так и открытого типа. Кажется, невозможно найти такое место, где бы ни было выявлено наличие микроорганизмов, но увеличение их количества может быть серьезной проблемой для человека, будь-то цветение водоемов или разрушение канализационных труб. Именно для того, чтобы не допустить возникновения подобных ситуаций, и необходимо контролировать, следить за экологическим состоянием окружающей среды и искать эффективные методы для поддержания ее чистоты.

**Актуальность** нашей работы заключается в том , что на современном этапе проблеме загрязнения водоемов и воздуха уделяется много внимания, и с каждым годом выясняются новые факты, позволяющие глубже понять механизмы этого процесса. Постоянно проводятся интенсивные исследования, которые позволяют изобрести новые методы очистки биотопов и улучшения, таким образом, экологического состояния. Наряду с этим ученые следят за уровнем загрязнения и наличием патогенных бактерий в воздухе и водоемах с целью предотвращения эпидемий и массовых заболеваний населения.

**Цель исследования:** установить возможный состав микрофлоры воздуха и воды открытого биотопа и определить культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства отдельных представителей.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи:**

**-** изучение литературы по данному вопросу;

- проведение учета количественного и качественного состава микрофлоры в отобранных образцах воды и воздуха открытого биотопа;

- описание культурально-морфологических свойств колоний и микроорганизмов;

- определение физиолого-биохимических свойств выделенного изолята;

- идентификация выделенной культуры.

**Объект исследования:** бактерии воды и воздуха открытого биотопа.

**Предмет исследования:** образцы воды верхнего Лиманского пруда г.Алчевска и воздуха на территории ГОУ ЛНР «АГ им. П.Н. Липовенко»

**Методы исследования:**

– теоретические (изучение и анализ научной литературы);

– экспериментальные (взятие проб, проведение лабораторных опытов);

– наблюдения, анализа и обобщения полученных данных.

**Практическая значимость:** результаты исследования могут использоваться учащимися на уроках экологии, биологии; будут способствовать лучшему пониманию биологического разнообразия окружающего мира, зависимости здоровья человека от микромира; будут полезны для всех, кто стремится лучше узнать свою ойкумену в целом и свой родной край в частности.

**Личный вклад:** исследование проводились самостоятельно автором в 2021 году.

РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

* 1. Характеристика микрофлоры воды открытого биотопа – пруда

Особенно богатой микрофлорой является именно микрофлора открытых водоемов, в том числе прудов, так как для целого ряда микроорганизмов вода является естественной средой обитания. На формирование и развитие микрофлоры в данной среде влияют различные факторы:

- количество и постоянство источников загрязнения;

- наличие населенных пунктов неподалеку от берегов водоема;

- сезонные и метеорологические факторы;

- физико-химические особенности водоема;

-глубина водоема;

- видовой состав и количество гидробионтов [1].

В зависимости от физиологических особенностей бактерий, для их нормального развития необходима определенная концентрация органических и неорганических веществ в воде, под этим определением подразумевается сапробность бактерий. «Сапробность - это способность водных организмов существовать в воде, содержащей различное количество органических веществ» [1].

Различают три зоны сапробности водоемов (табл.1.1)

Таблица 1.1. Зоны сапробности водоемов.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Зона | Содержание кислорода и органических веществ | Виды |
| Полисапробные  (зона сильного  загрязнение) | Дефицит кислорода: проникает в поверхностный слой за счет атмосферной аэрации и полностью расходуется на окисление ; имеется значительное количество нестойких органических веществ и продуктов их анаэробного распада, в основном белкового происхождения, также сероводород и метан; количество бактерий в 1 мл достигает более 1 млн. | Бактерии родов  Sphaerotilus, Beggiatoa, Zoogloea, |
| Мезасапробные  (зона умеренного загрязнения) | Состав кислорода и углекислого газа варьирует в зависимости от времени суток: днем избыток О2 и дефицит СО2, ночью – наоборот; отсутствуют неустойчивые органические вещества, происходит интенсивный процесс минерализации; количество бактерий в 1 мл колеблется от 1 тыс. до 100 тыс. | Бактерии родов  Clostridium, Pseudomonas, Mycobacterium, Candida, Streptomyces |
| Олигосапробные (зона чистой воды) | Практически чистая вода: содержание кислорода не колеблется; активный процесс минерализации, содержание органических остатков низкий; количество бактерий в 1 мл не более 1 тыс. |  |

Стоит заметить, что патогенные микроорганизмы, попадающие в воду, содержащиеся в больших количествах в полисапробных зонах, в мезосапробных это количество уменьшается, в олигосапробных их может быть только несколько клеток[2].

Зона воды может меняться, то есть она не является постоянной, поскольку в проточном пруду происходят процессы самоочищения. Самоочищение – это свойство водоемов постепенно освобождаться от загрязнений путем постепенного распада и минерализации органических веществ. Факторы, влияющие на этот процесс разделяются на:

-физико-химические (механическое движение воды, солнечный свет, окислительные процессы);

- биологические (деятельность бактерий, растений)

В проточном пруду самоочищения происходит достаточно быстро, из-за наличия поступательных движений воды.

С экологической точки зрения воду разделяют на аутохтонную и алахтонную. Аутохтонная микрофлора - это естественная постоянная микрофлора водоёма. Большое количество микроорганизмов, сюда относящихся, являются мезофилами, оптимальная температура для роста которых - 18-20°С. Аутохтонная микрофлора способствует самоочищению реки.

Алахтонная микрофлора попадает в водоемы извне – стоки, ливни или дожди. Как правило, данная микрофлора надолго не сохраняется в проточном водоёме, поскольку температура, рН, концентрация органических веществ, химический состав не соответствует требованиям данных организмов[1].

Исходя из этого, следует отметить, что присутствие тех или иных патогенных бактерий в воде не бывает постоянным, закономерным явлением, это определяется целым комплексом условий, которые указаны выше. Но все-таки необходимо проводить исследования микрофлоры воды для выявления степени её загрязнения, с целью ограждения человека от заражения патогенными бактериями. Заражение может происходить в следующих случаях:

- возбудитель из реки попадает на кожу или на слизистые пути, вследствие чего происходит развитие инфекции;

- возбудитель вместе с водой попадает в полость рта, в пищеварительный тракт и провоцирует развитие инфекции[1].

Степень загрязнения реки определяется коли-индексом – то есть количеством бактерий кишечной палочки в 1 л воды и коли-титром – наименьшим количество исследуемого материала в мл, в котором обнаружена одна кишечная палочка. Чистая вода содержит до 10 микроорганизмов в 1 мл; умеренно грязная – от 11 до 100; грязная вода содержит от 101 до 1000 микроорганизмов, а сильно грязная вода содержит в себе от 1001 до 10000 клеток микроорганизмов[3].

Также проводят определение общего микробного числа (ОМЧ) – количество микробов в 1 мл исследованной воды, по количеству колоний, вырастающих на агаре при температуре 37 °С в течение 24 час. Нормальным показателем ОМЧ является 100 КОЕ/мл.

Еще одним способом исследования степени загрязнения воды в реке является определение индекса бактерий группы кишечных палочек (БГКП) в 1 л воды. Нормальный показатель индекса - 3.

### Для исследования мы брали воду из Верхнего Лиманского пруда г. Алчевска со стороны оборудованного спуска.

Согласно ГСанПИН 2.2.4-171-10 мы определили показатели для питьевой воды:

### Табл.1.2. Показатели эпидемической безопасности питьевой воды

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименование показателей | Единица измерения | Нормативы для питьевой воды ГCанПиН 2.2.4-171-10 | | |
| водопроводной, с пунктов разлива и бюветов | из колодцев и каптажей источников | фасованной |
| Общее микробное число  при t = 37 °C – 24 часа\* | КОЕ/см3 | ≤ 100  (≤ 50)\*\* | не определяется | ≤ 20 |
| Общее микробное число  при t = 22 °C – 72 часа | КОЕ/см3 | не определяется | не определяется | ≤ 100 |
| Общие колиформы\*\*\* | КОЕ/100 см3 | отсутствие | ≤ 1 | отсутствие |
| E.coli\*\*\* | КОЕ/100 см3 | отсутствие | отсутствие | отсутствие |
| Энтерококки\*\*\* | КОЕ/100 см3 | отсутствие | не определяется | отсутствие |
| Синегнойная палочка  (Pseudomonas aeruginosa) | КОЕ/100 см3 | не определяется | не определяется | отсутствие |
| Патогенные энтеробактерии | наличие в 1 дм3 | отсутствие | отсутствие | отсутствие |
| Колифаги\*\*\*\* | БОЕ/дм3 | отсутствие | отсутствие | отсутствие |
| Энтеровирусы, аденовирусы, антигены ротавирусов, реовируса, вируса гепатита А и другие | наличие в 10 дм3 | отсутствие | отсутствие | отсутствие |
| Патогенные кишечные самые простые: цисты криптоспоридий, изоспор, цисты лямблий, дизентерийных амеб, балантидия кишечного и другие | клетки, цисты в  50 дм3 | отсутствие | отсутствие | отсутствие |
| Кишечные гельминты | клетки, яйца, личинки, в 50 дм3 | отсутствие | отсутствие | отсутствие |

Во время выбора воды, был ветер, что повлияло на количество бактерий в выборе. Также мы выбрали воду у берега, где из почвы активно поступают микроорганизмы в воду.

* 1. Характеристика микрофлоры воздуха открытого биотопа

По сравнению с водой, воздух содержит гораздо меньше микроорганизмов, поскольку эта среда является непригодной для их размножения. В воздухе отсутствуют питательные вещества , также присутствуют вредные солнечные лучи, нет постоянной температуры. На воздухе всё высыхает. Всё это усложняет условия для выживания бактерий.

На формирование и развитие микрофлоры воздуха действуют такие факторы, как время года (летом бактерий в воздухе вдвое больше, чем зимой), метеорологические условия, местность (в городе в воздухе богаче микрофлора, чем в деревне), микрофлора почвы и воды (поскольку отсюда главным образом попадают бактерии в воздух), количество пыли в воздухе (чем больше его количество, тем больше микроорганизмов в воздухе). Также в воздух попадают бактерии из дыхательных путей человека или с его кожи, вместе с чешуйками ее эпителия. Еще следует учесть количество зеленых насаждений, ведь известно, что листья деревьев и кустов прекрасно задерживают пыль с микроорганизмами[4].

Качественный состав микрофлоры воздуха не является стабильным и в значительной степени зависит от источника загрязнения. Обычно, при анализе микрофлоры воздуха в больших количествах, выделяют пигментные сапрофитные бактерии рода Micrococcus(до 66%), споровые формы рода Bacillus (до 25%), сарцины, а также актиномицеты и плесневые грибы. Споры грибов и бактерий способны подниматься на значительную высоту – до 85 км и более. Многочисленные анализы атмосферного воздуха позволили идентифицировать 1200 видов различных бактерий и актиномицетов[6].

Состав микрофлоры воздуха разнообразен. Наиболее часто в воздухе встречаются следующие виды: Bacillus subtilis, Bacillus mesentericus, Bacillus mycoides, Penicillium glaucum, Mucor mucedo, Actinomyces griseus, Micrococcusroseus, Micrococcus candicans, Staphilococcus citreus, Staphilococcus albus и др[6].

Могут выживать и некоторые патогенные организмы, например, туберкулезные палочки способны существовать в пыли до 3 месяцев, в то время как возбудители чумы умирают быстро.

Распространение микроорганизмов в воздухе связано с образованием так называемого аэрозоля. Аэрозоль – это коллоидная система, которая содержит в своем составе воздух, капли или твердые частицы с микроорганизмами. Размер аэрозольных частиц разный – от 10 до 2000 нм. Различают следующие фазы аэрозоля:

-капельная фаза - состоит из бактериальных клеток, которые окружены водно-солевой оболочкой. Диаметр частиц достигает 0,1 мм. Время нахождения в воздухе составляет не более нескольких секунд;

- мелкоядерная фаза - образуется при высыхании частиц первой фазы. В данной фазе размер частиц наименьший, они легко перемещаются потоками воздуха, долго находятся во взвешенном состоянии. Именно таким образом распространяются большинство возбудителей воздушно-капельных инфекций. Например, в воздухе в состоянии мелкоядерной фазы могут находиться споры Bacillus anthracis, Corunebacterium diphtheria могут сохранять жизнеспособность в течение суток, гемолитические стрептококки - до 2 суток, а Mycobacterium tuberculosis–до 18 суток;

- фаза «бактериальной пыли» - состоит из крупных частиц , они быстро оседают, образуя пыль, которая может легко подниматься в воздух[4].

Понятно, что в воздухе открытого биотопа значительно меньше микроорганизмов, чем в закрытых помещениях и поэтому опасность заразиться инфекцией ниже, но все равно следует проводить исследования состава воздуха, чтобы установить необходимость проведения дополнительной очистки, и не представляет ли этот воздух опасности для людей, например, с ослабленным иммунитетом.

Для исследования состава воздуха используют метод Коха, или, как его еще называют, седиментационный метод исследования воздуха. Чашки Петри со средой раскладывают в разные места, где необходимо исследовать воздух, и открывают на 15-30 минут; затем инкубируют и определяют видовую принадлежность микроорганизмов. Чаще всего в воздухе определяют общее число микроорганизмов (используют среда МПА, время экспозиции 10-30 минут).

Воздух проверяют на наличие стафилококков (используют среды - выше ЖСА, время экспозиции 15 мин.). В воздухе могут находиться и грибы, наличие которых проверяют средой Сабуро. При спокойном состоянии воздуха на плоскость 100 см2 осаждается столько микроорганизмов, сколько их имеется в 0,01 м3 воздуха[5].

Табл.1.3 Санитарно-микробиологические показатели воздуха(Лерина И.В. и Педенко А.К., 1980)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Степень чистоты воздуха | КОЕ в I м3 | Гемолитический стрептококк |
| Чистый | До 2000 | До 10 |
| Удовлетворительный | 2000-4000 | 11-40 |
| Слабо загрязненный | 4000-7000 | 40-110 |
| Сильно загрязненный | Более 7000 | Более 120 |

* 1. Характеристика морфологии бактерий

Различают 3 основные формы клеток бактерий: сферические (или кокки), цилиндрические (или палочковидные) и извилистые.

Сферические формы – наиболее простые в морфологическом плане бактерии. Это клетки небольшого диаметра – 0,3 – 3,5 мкм. Широко распространенные, как правило не образуют спор. Могут быть в виде единичных клеток или образовывать группировки, такие как диплококи (попарно), стрептококки (в виде цепочки), тетракоки (скоплении четырех клеток), сарцины (пакеты клеток) и стафилококки (неравномерные скопления).

Цилиндрические (палочковидные или бациллы) бактерии очень разнообразны по размерам, соотношению длины к ширине и расположению клеток. По расположению в поле зрения, различают одиночные, диплобактерии, стрептобактерии. Бациллы способны образовывать споры. Расположение спор может быть центральным и терминальным. Некоторые бациллы, которые образуют споры, не меняют форму клеток, другие изменяют. Одни приобретают форму барабанной палочки, другие – форму веретена.

Типичные виды сферической формы, которые можно встретить в воздухе и в воде – Micrococcus aurantiacus, Sarcinaureae. Типичные палочковидные бактерии, которые содержатся в воздухе – Bacillus mesentericus, Bacillus subtilis. В воде встречаются такие палочковидные микроорганизмы как Pseudomonasaureginosa. Среди патогенных как в воде, так и в воздухе различают Escherichiacoli.

### Вывод. В результате проведённого исследования литературы мы установили основные характеристики микрофлоры воды и воздуха открытого биотопа; факторы, влияющие на её формирование и развитие; установили санитарно-микробиологические показатели воздуха различной степени чистоты и показатели эпидемической безопасности питьевой воды.Также были рассмотрены морфологические характеристики бактерий, которые могут нам встретиться в ходе исследований.

РАЗДЕЛ 2 ОБЪЕКТ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Отбор образцов и высев на питательные среды

### Образец воды для микробиологического анализа был отобран из Вернего Лиманского пруда г. Алчевска со стороны оборудованного спуска.

Дата отбора – 08.04.2021, в 14:45.

Старлись  соблюсти стерильности: забор воды. Достоверность получаемых результатов и выводов зависят от правильности забора проб. Вода для санитарно-бактериологического анализа забирается в объеме 0,5 л в стеклянные бутыли или флаконы, закрытые ватно-марлевыми пробками и завязанные сверху бумажными колпачками. При необходимости исследования воды на присутствие возбудителей кишечных инфекций количество воды увеличивают до 2,5 л. Забор производился на расстоянии 5 м от берега с глубины до 1м при помощи самодельного батометра, привреплённого к шесту[ 8].

Образец воздуха для микробиологического анализа был отобран на территории гимназии им. П.Н.Липовенко по адресу ул. Гагарина, 35. Дата отбора - 18.04.2021, в 16:00.

**Был использован седиментационный метод отбора пробы воздуха**. Он основан на оседании бактериальных частиц и капель под влиянием силы тяжести на поверхности агара открытых чашек Петри. Их устанавливают в точках отбора на горизонтальной поверхности. Для определения общей микробной обсемененности воздуха чашки Петри с МПА оставляют открытыми на 5-10-15 мин в зависимости от предполагаемого бактериального загрязнения. Инкубацию посевов проводят при 37° 24 ч, затем чашки Петри оставляют при комнатной температуре на 48 ч для образования пигмента пигментообразующими бактериями [8].

2.1.1 Определение общего микробного числа (ОМЧ)

Для определения ОМЧ в исследуемом образце воды делали посев, соблюдая правила стерильности, в чашку Петри со средой КМАФАнМ (количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов) методом заливки. В зависимости от предполагаемого загрязнений высева, заранее приготовили в стерильной воде десятикратное разведения опытной пробы (в 105). Разведенную опытную воду объемом 1 мл вносили в пустую стерильную чашку Петри, в которую после этого наливали расплавленный теплый КАФАнМ (с температурой не выше 45°с) объемом 20 мл. Воду и КМАФАнМ тщательно перемешивали и после застывания среды, посев выращивали в термостате при температуре 37°С в течение 24 ч. Повторное определение ЗМЧв опытному образца воды проводили методом прямого высева на чашки Петри с КМАФАнМ из десятикратного разведения (105) 0,1 мл суспензии.

2.1.2 Определение индекса БГКП

Определение индекса БГКП проводили бродильным методом. Каждый объем разбавленной воды засеивали в среду Эйкмана следующим образом: 100 мл опытной воды вносили во флакон из 50 мл среды Эйкмана, также в 3 пробирки в среде Эйкмана объемом 5 мл вносили по 10, 1 и 0,1 мл опытной разбавленной воды относительно. Высевы инкубировали при температуре 37°С на протяжении 7 суток.

Изменение цвета среды, ее помутнение и газообразование свидетельствует о положительном результате, отсутствие таких процессов указывает на негативную реакцию.

Определение индекса БГКП проводили также методом прямого высева в чашку Петри со средой Эндо 0,1 мл исследуемой разбавленной воды. Высев инкубировали в термостате при температуре 37°С в течение 24 ч.

Наличие на среде Эндо темно-красных колоний с металлическим блеском свидетельствует о присутствие в составе опытного образца патогенных кишечных палочек.

Для определения ОМЧ в опытном образце воздуха делали посев в 3 чашки Петри с мясопептонним агаром (МПА), средой Сабуро (СС) и желтково-солевой агар (ЖСА) относительно, по методу Коха, оставив их открытыми в выбранном для исследования месте на 15 минут. Посев выращивали в термостате при температуре 37°С в течение 24 ч. Высчитанное количество колоний выражали в КОЕ в 1м3.

2.2 Выделение чистой культуры

Для выделения чистой культуры, делали посев, соблюдая правила стерильности, в чашку Петри со средой МПА методом истощения. Для высева была выбрана колония из чашки Петри с ЖСА округлой формы, мелкого размера, белого цвета, с гладкой, волнообразной, блестящей поверхностью, с волнистым профилем и с гладким краем и с пастообразной консистенцией. Клетки этой колонии по морфологическому признаку были сферической формы. Посев выращивали в термостате при температуре 37°С в течение 48 ч.

2.3 Определение физиолого-биохимических особенностей и антибиотической активности выделенного изолята

Для определения способности микроорганизмов к ферментации углеводов использовался «пестрый ряд» Гиса, а именно, делали посев, соблюдая правила стерильности, в 5 пробирок с питательными средами, которые содержали глюкозу, манит, мальтозу, сахарозу и лактозу, методом укола. Полученный высев культивировали в термостате при температуре 32°С в течение 7 суток. Полученные результаты сравнивали с контрольным "пестрым рядом" Гиса.

Чувствительности изолята к антибиотикам определяли путем посева, соблюдая правила стерильности, в чашку Петри со средой АХО 0,1 мл заранее приготовленной стандартизированной взвеси тест-культуры. Изготовление такой суспензии осуществляли путем стерильного внесения бактериологической петлей культуры исследуемого штамма в физиологический раствор NaCl до получения концентрации до 0,5 единиц оптической плотности по Мак Фарланду.

После посева газоном, чашку Петри оставили на 10 мин. После этого, при помощи стерильного пинцета, в чашку Петри с тест-культурой разложили стандартные диски с такими антибиотиками: эритромицин, тетрациклин, левомицетин, карбенициллин и олеандомицин. Высев инкубировали в термостате при температуре 35°С в течение 48 ч.

Для определения способности выделенной культуры до гидролиза крахмала делали посев опытной культуры, соблюдая условия стерильности, в чашку Петри со средой картофельный агар (КА) методом бляшек. Полученный посев культивировали в термостате при температуре 32°С в течение 7 суток. После культивирования в чашку Петри внесли содержащее воду соединение, после чего фиксировали результат. Реакция является положительной в случае образования вокруг колоний прозрачной зоны на фоне фиолетовой среды.

Способность выделенной культуры к синтезу оксидазы проверяли с применением стандартных дисков, насыщенных водным раствором диметил-n-фенилендиамина. Стерильной зубочисткой (поскольку оксидаза чувствительна к металлу) отобрали колонию бактерий, нанесли на диск и растерли. Изменение цвета диска свидетельствует о положительной реакции.

Определение способности опытного микроорганизма к синтезу каталазы проводили путем внесения несколько капель 3 - % раствора Н2О2 на поверхность культуры, выросшей на МПА. Образование пузырьков газа свидетельствует о положительной реакции.

Определение грампозитивности/грамнегативности выделенной культуры проводилось экспресс-методом: на предметном стекле с каплей 3-% раствором NaOH ресуспендировали бактериологической потлею клетки бактерий в течение 1-2 минут. Образование слизистых тяжей свидетельствует о наличие грамм отрицательных бактерий.

**Выводы:** в результате работы над этим разделом были отобраны и высеяны образцы микрофлоры воды и воздуха открытого биотопа. Бло определено общее микробное число (ОМЧ), определен индекс БГКП, произведено выделение чистой культуры; определены физиолого-биохимические особенности и антибиотическая активность выделенного изолята.

РАЗДЕЛ 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Определение общего количества микробов в исследованной воде и воздухе

Микробиологический контроль предполагает подсчет общего микробной загрязненности (то есть общее микробное число – ОМЧ). Точное определение такого числа невозможно, поскольку нельзя создать такие условия, которые бы удовлетворяли условиям роста и размножения всех микроорганизмов имеющихся в исследуемом биотопе. Поэтому, в качестве критерия было выбрано содержание мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, объединенных потребностями в питании и условиях культивирование-число бактерий, которые способны образовывать колонии на поверхности и/ или в питательном агаре при температуре 37°С в течение 24 ч.

Общее количество КОЕ в 1 м3 воздуха определили по формуле Омелянского:

где - количество микробов в 1 м3 воздуха;

- количество колоний в чашке Петри;

-площадь чашки Петри;

- время, на протяжении которого была открытая чашка;

100- площадь ( в см2 ), на какую происходило осаждение;

1000- исследуемый объем воздуха.

КОЕ в 1м3 воздуха.

Для определения общего микробного числа воды подсчитали общее количество колоний, выросших в чашках Петри (глубинный посев и посев на поверхности сплошным газоном) и определили количества микроорганизмов в 1 мл исследованной воды, пользуясь формулой:

,

Где ОМЧ- общее количество КОЕ в 1мл воды,

К- общее количество колоний в чашках Петри,

V1- объем исследуемого образца воды в первой чашке Петри,

V2- объем исследуемого образца воды во второй чашке Петри,

Определяем ОМЧ=11/(1+0,1)=10 КОЕ в 1 мл воды

3.2 Описание культурально-морфологических особенностей выделенного изолята

3.2.1 Культурально-морфологические свойства выделенного изолята из воздуха

На среде ЖСА было идентифицировано только 2 одинаковые колонии. На среде Сабуро ничего не выросло. На среде МПА выросло 14 колоний.

При описании культурально-морфологических особенностей колоний и клеток микроорганизмов исследуемого воздуха был проведен микроскопический анализ. (Приложение 1.)

3.2.2 Культурально-морфологические свойства выделенного изолята из воды

На среде КМАФАнМ, на котором посев осуществлялся глубинным способом, выросло 3 колонии, а на среде КМАФАнМ, на котором осуществлялся откос на поверхности сплошным газоном было индефицировано 8 колоний. На среде Эйкмана зафиксирован рост микроорганизмов, поскольку окраска сред, по сравнению с контролем, изменилась. На среде Эндо ничего не выросло.

При описании культурально-морфологических особенностей колоний и клеток микроорганизмов опытного воздуха был проведен микроскопический анализ. (Приложение 2)

3.3 Определение физиолого-биохимических свойств и антибиотической активности выделенного изолята

После инкубации «пестрого ряда» Гисса с посевами, сравнили полученные результаты с контролем (Приложение 3)

Изменение цвета среды свидетельствует об изменении рН, зависящем от примененного индикатора. В даном случае использовался индикатор бромтиловий синий. Сравнив полученные результаты с интервалом перехода цвета среды в зависимости от рН, установили, что в среде с глюкозой и мальтозой рН изменился к интервалу 0 – 5, а в среде с маннитом в интервале 5-6, следовательно среды стали кислыми, что указывает на положительный результат. Среды с лактозой и сахарозой дали отрицательный результат, поскольку цвет, а следовательно ИРН не изменился.

Рост микроорганизма в полужидкой питательной среде в пробирках проходил вдоль укола, или на поверхности, что указывает на неподвижность культуры.

Для исследования чувствительности тест-культуры к антибиотикам, был проведен учет результатов опыта путем фиксирования к каким антибиотикам чувствительна культура и измерения диаметра зоны задержки роста с помощью специальной линейки (табл. 3.3.2).

Таблица 3.1. Чувствительность тест-микроорганизма к различным антибиотикам, определенная методом стандартных бумажных дисков.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Чувствительность тест-культуры до антибиотиков  (мм диаметра зоны задержки роста) | | | | |
| Тетрациклин | Олеандомицин | Карбеницелин | Эритромицин | Левомицетин |
| 22 мм | 18 мм | 35 мм | 23 мм | 26 мм |

Итак тест-культура чувствительна ко всем представленным антибиотикам, а к олеандомицину культура является умеренно чувствительной. На основе этих данных была построена гистограмма.

Гистаграмма 3.1. чувствительность тест-культуры к антибиотикам

При определении грамотрицательности/грамположительности выделенной культуры экспресс-методом образования слизистых тяжей не наблюдалось, следовательно, в культуре отсутствуют грамотрицательные бактерии.

При нанесении 3-% раствора Н2О2 на колонии выделенной культуры наблюдалось активное образование пузырьков газа, что свидетельствует о способности микроорганизма синтезировать каталазу.

Выделенная культура не способнак гидролизу ваты крахмала, поскольку при добавлении йодсодержащего соединения, образование прозрачных зон вокруг колоний не происходило.

Также, выделенный изолят не способен синтезировать оксидазу, поскольку при нанесении культуры на стандартные тест-диски, изменение цвета не наблюдалось.

Общая характеристика культурно-морфологических и физиолого-биохимических выделенного изолята приведена в таблице

Таблица 3.2. Морфолого-культуральные и физиолого-биохимические свойства выделенной культуры

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Признак | Изолят | Типичный вид бактерий, к которому проявляла наивысшую степень сходства выделенная культура (провести сравнительный анализ с выбранным вами самостоятельно эталонным видом по определителю бактерий Берджи-положительный контроль) |
| Признак колонии | Округлой формы, мелкого размера (2мм), белого цвета, с гладкой, блестящей и волнообразной поверхностью, профиль волнистый, край ровный, консистенция пастовидная | Колонии непрозрачные, белые, кремовые |
| Морфология клеток | Кокки, диплококки, одиночные, овальной формы, крупные по размеру | Клетки сферические одиночные или в парах, диаметром 0, 5-1, 5 мкм |
| Грамположительные /грамотрицательные | Грамположительные | Грамположительные |
| Способность к образованию эндоспор | - | - |
| Способность к движению | - | - |
| Способность к синтезу ферментов:  - амилазы  - каталазы  - оксидазы | -  +  - | -  +  - |
| Окисление с образованием кислоты:  - глюкозы  - лактозы  - мальтозы  - сахарозы  - Маниту | +  -  +  -  + | -  +  - |
| Образование газа во время окисления:  - глюкозы  - лактозы  - мальтозы  - сахарозы  - Маниту | -  -  -  -  - | -  -  -  -  - |
| Чувствительность к антибиотикам:  - тетрамицин  - эритромицин  - левомицетин  - карбеницелин  - олеандомицин | +  +  +  +  + | +  +  +  +  + |

Проанализировав и сравнив данные с определителем Берджи, был сделан вывод, что данная культура относится к группе 17 Грамположительные кокки, и было предположено, что данный изолят принадлежит к роду Staphylococcus, возможно это вид Ѕ. caprae.

**Выводы:** общее количество микробов в исследованной воде и воздухе: 10 КОЕ в 1 мл воды и КОЕ в 1м3 воздуха соответственно. Был проведен микроскопический анализ культурально-морфологических особенностей колоний и клеток микроорганизмов исследуемого воздуха, составлена обощающая таблица. Был проведен микроскопический анализ культурально-морфологических особенностей колоний и клеток микроорганизмов выделенного изолята опытного воздуха и воды. Определены физиолого-биохимические свойства и антибиотическая активности выделенного изолята методом стандартных бумажных дисков. Установлено, что в культуре отсутствуют грамотрицательные бактерии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Данное исследование микрофлоры воды и воздуха открытого биотопа показало невысокую степень загрязнение и не слишком большое разнообразие микроорганизмов;

2. ОМЧ в опытном воздухе открытого биотопа равна 679,4 КОЕ в 1м3, а в опытном воде открытого биотопа – 10 КОЕ в 1 мл. Поэтому степень загрязненности данных биотопов находится в умеренном диапазоне.

3. Выделенный изолят способен синтезировать каталазу и расщеплять углеводы до образования кислоты: глюкозу, мальтозу, маннит.

4. Исследования тест-культуры к действию антибиотиков показали чувствительность к эритромицину, олеандомицину, левомицетина, карбеницелину и террамицина.

5. Выделенный из воздуха микроорганизм принадлежит к роду Staphylococcus, предполагаем, что это вид Staphylococcus caprae.

**Цель исследования:** установить возможный состав микрофлоры воздуха и воды открытого биотопа и определить культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства отдельных представителей, в результате проведённых исследований, достигнута.

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ**

1. Водный фактор в передаче инфекции / Н. И. Хотько–Пенза. – 2002. – Режим доступу: <http://medbookaide.ru/books/fold1002/book1107/content.php>
2. Количественная гидроэкология: методы системной идентификации / В. К. Шитиков – Тольятти : Институт экологии Волжского бассейна, 2003. – Режим доступа:<http://www.ievbras.ru/ecostat/Kiril/Library/Book1/Content0/Content0.htm#Ref>
3. Медицинская энциклопедия – Режим доступа: <http://medical-enc.com.ua/coli_index.htm>
4. Микрофлора воздуха – Режим доступа: <http://laktiale.com.ua/mikroflora-kishechnika/mikroflora/mikroorganizmy-vozduha-330.html>
5. Мікрофлора повітря –Режим доступа: <http://ua.textreferat.com/referat-122-1.html>
6. Определитель Бактерий Берджи в 2х томах / Хоулт. Дж., Криг Н. и др. – Режим доступа: <http://www.rfbr.ru/rffi/ru/books/o_59110>
7. Lakes: BiologicalProcesses [Электронний ресурс] : WaterEncyclo

pediaScienceandIssues. – Режим доступа: <http://www.waterencyclopedia.com/Hy-La/Lakes-Biological-Processes.html>

1. [Электронный ресурс]. – режим доступа: <https://studopedia.net/14_37356_sanitarno-mikrobiologicheskoe-issledovanie-vozduha.html>

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение 1. Морфолого-культуральные свойства микроорганизмов.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Исследуемый  биотип | Питательная  среда | Количество  колоний одного типа | Признаки колоний | | | | | | | Морфология клеток |
| форма | размер | цвет | поверхность | профиль | Край 2 колонии | Консистенция |
| воздух | ЖСА | 2 | круглая | Мелкий 2 мм | белый | Гладкая,  блестящая,  волнообразная | волнистый | ровный | пастообразная | Коки, диплококи, одиночные,овальной формы, большого размера, грампо-зитивны |
| воздух | МПА | 2 | неправильная | Большой 5 мм | Белый | шерсть | поднятый | волнистый | маслянистая | Длинные палочки с закругленными концами, одиночно, тонкие |
| Воздух | МПА | 8 | Круглая | Средний 3мм | кремовый | Гладкая, блестящая | конусоподобная | ровная | водянистая | Небольшие коки, неправильной овальной формы, одиночно, есть диплококи |
| воздух | МПА | 4 | неправильная | Большой  6 мм | розовобелый | морщинистая | поднятая | зазубренные | мягкая | Длинные тоненькие палочки с закругленными концами, есть короткие формы |

Приложение 2. Морфолого-культуральные свойства микроорганизмов

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Исследуемый биотип | Питательная среда | Количество колоний одного типа | Характеристики колоний | | | | | | | Морфология клеток |
| форма | размер | цвет | поверхность | профиль | край | конститенция |
| Вода | КМА-ФАнМ (гл. п) | 3 | Неправильная | Большой, 1-5 см | Кремовый | Шерстяна | Плоская | Нитчатый | Масля  нистый | Палочки с круглыми краями |
| Вода | КМА-ФАнМ (на пов.) | 7 | Неправильная | Большой, 0,7-1,5 см | Серый | Шерстяна | Плоская | Нитчатый | Пастооб  разный | Коко среднего размеру |
| Вода | КМА-ФАнМ (на пов.) | 1 | круглая | Большой 4-6мм | Желтый | Гладкая | поднятая | ровный | Масля  нистый | Палочки с круглыми краями |

Приложение 3. Изменение цвета среды Гисса.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| пёстрый ряд Гисса | Цвет среды | | | | |
| Глюкоза | Мальтоза | Лактоза | Сахароза | Манит |
| Контроль | Синий | Темно-синий | Темно-красный | Фиолетовый | Фиолетовый |
| Исследовательский | Желтый, рост на поверхности среды | Желтый, рост вдоль укола | Темно-красный | Фиолетовый | Желто-зеленый,  рост вдоль укола |