

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет» Факультет естественных наук

Отчет по микробиологии по теме:

**Микробиологический анализ внешней и внутренней поверхностей
ноутбука**

Работу выполнила:
студентка 3 курса группы 20404.3
Корепина Мария Олеговна
Преподаватель:
Забелина Дарья Сергеевна

Новосибирск, 2023

Содержание

1) Введение.....	3
2) Материалы и методы.....	5
3) Результаты и обсуждения.....	9
4) Список литературы.....	13

Введение

Микробиология (от греч. mikros – малый, bios – жизнь, logos – учение) – это наука, изучающая строение, функции, химическую деятельность, распространение, условия развития, роль и значение в жизни человека микроорганизмов. Мир микроорганизмов многочислен и разнообразен. Они повсеместно распространены в природе: в почве, водоемах, воздухе, находятся на продуктах питания и всех предметах, окружающих человека, а также в нем самом, животных и растениях. Микроорганизмы выполняют колоссальную по значимости биохимическую работу: они разлагают растительные и животные остатки на поверхности планеты, используются в технологии производства многих пищевых продуктов, различных биологически активных соединений (например, витаминов, антибиотиков), в генной инженерии, а также различных отраслях народного хозяйства.

Бактериология - это раздел и специальность биологии, которая изучает морфологию, экологию, генетику и биохимию бактерий, а также многие другие аспекты, связанные с ними. Этот раздел микробиологии включает в себя идентификацию, классификацию и характеристику видов бактерий. Бактерии часто являются симбионтами и паразитами растений и животных. Большинство бактерий к настоящему времени не описано, и представители лишь половины типов бактерий могут быть выращены в лаборатории.

Каждый человек в процессе своей жизнедеятельности так или иначе контактирует с различными микроорганизмами. Некоторые из них могут оказаться патогенными и вызвать различные заболевания, другие же являются нейтральными по влиянию на здоровье. Поэтому важными являются исследования видового состава поверхностей предметов, с которыми человек контактирует чаще всего. Для видового анализа используется целый набор признаков: морфологии колоний, которые они образуют, по форме клетки, строению мембраны, биохимическим особенностям и по экологической нише, занимаемой бактерией.

Цель работы:

Установление таксономической принадлежности бактерий на внешней и внутренней поверхностях ноутбука.

Задачи:

- 1) Осуществить сбор материала с исследуемых поверхностей.
- 2) Освоить различные методы анализа бактерий.
- 3) Описать основные морфологические, физиолого-биохимические и биологические характеристики выделенных культур бактерий.

Материалы и методы

Материалами для данного исследования послужили культуры бактерий, собранные с внешней и внутренней поверхности рабочего ноутбука. В ходе работы были применены следующие методы:

- Смыв бактерий с поверхностей и посев на твердую питательную среду: стерильный ватный тампон, удерживаемый пинцетом, увлажнить, обмакнув в пробирку с 300 мкл физ. раствора (0,9% раствора NaCl) и несколько раз тщательно провести им по поверхности исследуемого предмета. Ватный тампон снова поместить в физ. раствор и аккуратно перемешать. Далее пипеткой из пробирки отобрать 50 мкл жидкости и капнуть на агаризованную питательную среду в чашке Петри. Стерильным микробиологическим шпателем равномерно растереть каплю по среде. Чашку Петри поместить в термостат с температурным режимом 37 °C на один день, далее переместить в холодильник на неделю.
- Получение чистой культурой методом истончающегося штриха: из колоний, выросших из одной из чашки Петри, необходимо выбрать одну, растущую изолированно. Затем с помощью стерильной петли взять небольшое количество бактериальной массы из выбранной колонии, слегка к ней прикасаясь. Петлю с бактериями перенести в правый верхний сектор чашки Петри с твердой питательной средой, предварительно разделенную маркером на четыре сектора. Петлю культуры “расштриховывают” в первом секторе агаровой пластины, затем петлю прожигают, захватывают стерильной петлей предыдущий газон и продолжают штриховать уже во втором секторе. Петлю вновь стерилизуют и продолжают до тех пор, пока не будут заполнены все четыре сектора. После посева чашку оставляют при комнатной температуре крышкой вниз и выдерживают в течении 7 суток. Визуально рост микроорганизмов по штриху должен быть однороден.
- Определение морфологии колоний бактерий методом простого окрашивания: на предметные стекла предварительно помещают небольшую каплю дистиллированной воды. Затем стерильной микробиологической петлей взять небольшую пробу колоний (всего 4) и растереть по центру предметного стекла, просушить в верхних

слоях пламени спиртовки, а затем зафиксировать кратковременным прогревом в средних слоях пламени спиртовки. Провести процедуру окраски фуксином в течение 1-2 минут, отмывают препарат дистиллированной водой и аккуратно промакивают сухой фильтровальной бумагой до полного удаления влаги. Полученные препараты исследовать на микроскопе.

- Окраска по Граму: на одно обезжиренное предметное стекло наносят три мазка микроорганизмов: грамположительный контроль на один край стекла, грамотрицательный контроль на другой край стекла, образец посередине. Мазки высушивают над пламенем спиртовки и фиксируют. Для фиксации предметное стекло с препаратом берут пинцетом или пальцами правой руки за рёбра мазком кверху и плавным движением проводят 2—3 раза над верхней частью пламени горелки. Препарат окрашивают кристалвиолетом в течение 1 минуты и сливают его. После этого препарат вытравливают раствором Люголя (раствором йода в водном растворе йодиде калия) в течение одной минуты, после чего также сливают его и промывают препарат спиртом до обесцвечивания грамотрицательного контроля. Стекло тщательно промывают дистиллированной водой. После этого в течение 1-2 минут препарат окрашивают фуксином, сливают его, промывают и промакивают стекло фильтровальной бумагой. Перед использованием микроскопа препарат должен полностью высохнуть.
- Определение каталазной активности: каталазная активность свойственна большинству аэробных микроорганизмов. Облигатные анаэробы и многие микроаэрофилы каталазу не образуют. Катализа разлагает перекись водорода с образованием кислорода с соответствием с реакцией: $2\text{H}_2\text{O}_2 = \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$. Каталазную активность выявляют следующим образом. Культуру бактерий снимают с поверхности агара и суспендируют в капле 3%-й перекиси водорода на предметном стекле. Выделение O_2 , хорошо заметное по образованию пузырьков газа, свидетельствуют о наличии в клетках каталазы.
- Определение способности бактерий к спорообразованию: при пастеризации (нагревание в течение 10 мин при 80°C или 15 мин при 75°C) погибают только вегетативные формы бактерий, а споры

обладают высокой термоустойчивостью, остаются жизнеспособными и могут дать рост новым колониям бактерий. Готовят 2 суспензии: а) из заведомо спорообразующей культуры (*Sporosarcina ugae*) - положительный контроль; б) из исследуемой культуры. Суспензии должны быть очень концентрированными, поэтому берут небольшое количество физиологического раствора (0.5 мл) и достаточное количество биомассы. Не забываем, что перед взятием материала необходимо встряхивать пробирку, поскольку бактерии имеют массу и оседают на дно. Чашку Петри с МПА делят на 4 сектора: 2 сектора сверху контроль (К) и опыт (О) до пастеризации; 2 сектора внизу - контроль (К') и опыт (О') после пастеризации. В центре секторов К и О вносят по капле суспензии А и В. После этого пробирки с бактериальными суспензиями строго вертикально переносят на водяную баню. Для контроля температуры такую же пробирку с водой и термометром одновременно ставят в водяную баню. Необходимо убедиться, что уровень воды в бане выше уровня бактериальной суспензии. Отсчет времени начинают с того момента, когда столбик термометра достигает отметки в 75-89°C. По истечении времени пастеризации пробирки вынимают из водяной бани, хорошо встряхивают и вносят по капле бактериальной суспензии в сектора К' и О'. Чашку Петри оставляют на неделю при комнатной температуре. Через неделю, если тест поставлен корректно, колонии бактерий должны обнаруживаться в секторах К и О и К'. Если бактерии вырастут еще и в секторе О', культура является спорообразующей. Если же роста не будет, то культура не образует спор. Следует помнить, что палочки могут быть как спорообразующими, так и неспорообразующими. Кокки же, за одним исключением (*Sporosarcina ugae*), только неспорообразующие.

- Определение подвижности бактерий: на середину обезжиренного предметного стекла наносят каплю хлорамина. В каплю бактериологической петлей вносят небольшое количество бактериальной культуры и перемешивают. Осторожно накрывают покровным стеклом. Капля тонким слоем заполняет пространство между покровным и предметным стеклом. Фильтровальной бумагой удаляют излишки выступившей жидкости. Полученный препарат исследуют под микроскопом. Хлорамина оказывает на бактерий

токсическое действие и используется в качестве дезинфицирующего агента, и помещение бактерий в соответствующий раствор приносит им дискомфорт, повышая подвижность. Она проявляется в дрожании отдельных бактерий и наблюдается под микроскопом.

- Определение отношения бактерий к кислороду: по отношению к кислороду микроорганизмы делятся на 4 группы: облигатные аэробы; микроаэрофилы; факультативные анаэробы; облигатные анаэробы. Для описания микроорганизмов и дальнейшей идентификации ограничиваются наблюдением роста изучаемого микроорганизма после посева уколом в агаризованную среду или после посева в расплавленную агаризованную среду. Чтобы судить о принадлежности микроорганизма к той или иной группе, поступают следующим образом. Благоприятную для роста микроорганизмов среду разливают по пробиркам на $\frac{1}{2}$ их высоты и стерилизуют. В одну пробирку посев проводят уколом, а в другой МПА расплавляют в кипящей водяной бане, а микробную суспензию высевают в пробирку с остуженной до 40-45°C агаризованной питательной средой, причем петлю пускают в среду на всю длину до держателя. Бактерии хорошо размещают в среде. Через 7 дней проводят учет результатов теста. Строгие аэробы растут на поверхности и в верхнем слое среды, микроаэрофилы - на некотором расстоянии от поверхности (но не на поверхности), факультативные анаэробы обычно развиваются по всей толще среды, а строгие анаэробы растут только в глубине среды, у самого дна пробирки.

Результаты и обсуждения

По результатам смыва бактерий с внутренней части ноутбука на питательной среде в чашке Петри выросло больше колоний, чем со смыва с внешней части. Для дальнейшего анализа были выбраны 4 колонии (по 2 с каждой чашки Петри: 1 и 2 колонии с внешней части ноутбука, 3 и 4 - с внутренней) и выделены методом истончающегося штриха. После проведения простого окрашивания были сделаны следующие наблюдения: все колонии представляли из себя кокки, во 2 колонии размер кокков был значительно меньше, чем в колониях 1, 3 и 4. Окрашивание по Граму показало, что все колонии являются грам-положительными бактериями. Тест на каталазную активность дал положительные результаты также для всех колоний. Тест на оксифильность показал, что колония 1, по-видимому, образована факультативно анаэробными бактериями, колонии 2, 3 и 4 - облигатными аэробами. Колонии 1 и 2 образованы неподвижными бактериями, колонии 3 и 4 - подвижными. К спорообразованию оказались способны колонии 3 и 4. Ниже представлена обобщающая результаты таблица:

Колонии	Форма клеток	Аэробность	Грам-окраска	Подвижность	Каталазная активность	Спорообразование	Таксономическая принадлежность
1 (желтые)	Кокки	Факультативный анаэроб	+	-	+	-	Род <i>Staphylococcus</i>
2 (оранжевые)	Кокки	Облигатный аэроб	+	-	+	-	Род <i>Micrococcus</i>
3 (бежевые)	Кокки	Облигатный аэроб	+	+	+	+	Род <i>Sporosarcina</i>
4 (бежево-белые)	Кокки	Облигатный аэроб	+	+	+	+	Род <i>Sporosarcina</i>

На основе полученных данных с помощью определителя бактерий Берджи были установлены таксономические принадлежности бактерий их посеянных колоний. Все исследуемые колонии принадлежат категории II: грамположительные эубактерии, имеющие клеточные стенки. В данной категории бактерии принадлежат 17 и 18 группам со следующими характеристиками:

**Таблица V.2. Группы основной категории II
(грамположительные эубактерии, имеющие клеточные стенки)**

Группа	Название	Существенные признаки
17	Грамположительные кокки	Хемоорганотрофные, мезофильные, не образующие спор грамположительные кокки, подразделяемые следующим образом: I. Аэробные кокки, встречающиеся в парах, скоплениях или тетрадах. Каталазоположительные. Содержат цитохромы. В клеточных стенках отсутствуют тейхоевые кислоты. Образование кислот из углеводов часто отсутствует или выражено в слабой степени. II. Факультативно анаэробные или микроаэрофильные кокки, в парах, цепочках, кластерах или тетрадах. Присутствие каталазы, цитохромов и тейхоевых кислот в составе клеточной стенки – переменные признаки. III. Строго анаэробные кокки; встречаются в парах, цепочках, тетрадах или пакетах кубической формы. Цитохромы у исследованных родов не обнаружены. Результаты теста на каталазу обычно отрицательные, хотя в некоторых случаях наблюдается слабая или псевдокаталазная активность.
18	Образующие эндоспоры грамположительные палочки и кокки	Бактерии, образующие устойчивые к нагреванию <i>эндоспоры</i> . Для проверки на присутствие эндоспор лучшим тестом служит нагревание при 70–80°C в течение 10 мин с последующим культивированием в благоприятных условиях. Чаще всего подвижные палочки или нити, однако один род представлен неподвижными кокками (в тетрадах или кубических пакетах). В большинстве грамположительные, по крайней мере в молодых культурах, однако у одного рода грамотрицательные. Облигатные аэробы, факультативные анаэробы, микроаэрофилы или строгие анаэробы. У одного рода анаэробных бактерий анаэробное дыхание происходит с использованием сульфата.

К 17 группе принадлежат бактерии из колоний 1 и 2.

Колония 1 принадлежит Роду *Staphylococcus*. Его характеристика:

Род *Staphylococcus*

Клетки сферические, диаметром 0,5-1,5 мкм, одиночные, в парах и в группах неправильной формы. Грам-положительные; неподвижные; неспорообразующие. Факультативные анаэробы. Хемоорганотрофы, обладающие и дыхательным, и бродильным типами метаболизма. Колонии обычно непрозрачные, белые или кремовые, иногда от желтых до оранжевых. Как правило, каталазоположительные, содержат цитохромы, но обычно оксидазоотрицательные. Обычно восстанавливают нитрат до нитрита. Лизируются под действием лизоцима, но не лизоцима (Schleifer, Kloos, J. Clin. Microbiol. 1: 337-338, 1975). Обычно растут в присутствии 10% NaCl. Оптимальная температура для роста 30--37°C. В основном ассоциированы с кожными покровами и слизистыми оболочками теплокровных позвоночных, но часто могут быть выделены из

пищевых продуктов, пыли и воды. Некоторые микробы вызывают оппортунистические инфекции у человека и животных либо выделяют внеклеточные токсины.

Типовой вид: *Staphylococcus aureus*.

Данное описание подходит в соответствии с полученными в ходе исследования данными.

Колония 2 принадлежит Роду *Micrococcus*. Его характеристика:

Род *Micrococcus*

Клетки сферические, диаметром 0,5--2,0 мкм, в парах, тетрадах или скоплениях неправильной формы, но не в цепочках. Грамположительные. Редко подвижные; неспорообразующие. Обязательные аэробы. Колонии обычно желтые или красные. Хемоорганотрофы; метаболизм дыхательного типа; при использовании углеводов кислоту часто образуют в небольших количествах или не образуют. Обычно растут на простых средах. Каталазоположительные и часто слабо оксидазоположительные.

Как правило, галотолерантные, растут в присутствии 5% NaCl. Содержат цитохромы и устойчивы к лизостафину (Schleifer, Kloss, J. Clin. Microbiol. 1: 337-338, 1975). Оптимальная температура для роста 25-37°C. Встречаются главным образом на коже млекопитающих и в почве, однако выделены в основном из пищевых продуктов и из воздуха.

Типовой вид: *Micrococcus futeus*.

Данное описание подходит в соответствии с полученными в ходе исследования данными.

Колонии 3 и 4 принадлежат Роду *Sporosarcina*. Его характеристика:

Род *Sporosarcina*

Клетки сферические или овальные, 1-2 × 2-3 мкм, в основном в виде диплококков и тетрад, но иногда в виде кубических пакетов. Грамположительные. Подвижные за счет немногочисленных жгутиков, имеющих у каждой клетки. Эндоспоры сферические (диаметр 0,5--1,5 мкм). Хемоорганотрофы. Обязательные аэробы. Хорошо растут на МПА, образуя колонии от кремовых до оранжевых. *S. halophila* нуждается в добавлении к среде 3% NaCl и 0,5% MgCl₂. Растут при температуре 15-37°C. Широко распространены в почвах, включая соленые марши.

Типовой вид: *Sporosarcina ureae*.

Данное описание подходит в соответствии с полученными в ходе исследования данными.

Таким образом, были установлены таксономические принадлежности бактерий на внешней и внутренней поверхностях ноутбука. Представители Родов *Sporosarcina* и *Micrococcus* не являются патогенными, но стоит уделить внимание на наличие представителей бактерий Рода *Staphylococcus*, т.к. его некоторые широко распространенные представители могут вызывать заболевания при несоблюдении достаточных гигиенических и санитарных мер.

Список литературы

- 1) Мудрецова-Висс К.А., Дедюхина В.П., Масленникова Е.В. Основы микробиологии // М.: ИНФРА-М, 2014. – 354 с.
- 2) Ильичев А.А., Ильичева Т.Н., Романовская А.А., Щербакова Н.С. Практикум по микробиологии. Выделение и идентификация микроорганизмов-нефтедеструкторов. Титрование нитчатых бактериофагов методом агаровых слоев по Грациа. Методические указания // НГУ. – 2009.
- 3) Хоулт Дж. и др. Определитель бактерий Берджи //М.: Мир. – 1997. – Т. 2. – 325 с.