

# **49-ая Эстонская Школьная биологическая олимпиада**

## **Практическая работа по микробиологии**

---



Имя : .....

Фамилия : .....

Школа : .....

Класс : .....

Группа : .....

**Руководитель: Трийну Виснапуу, докторант TÜ MRI**

## 1. Измерение содержания микробов в воздухе (седиментационный метод Коха) (7 б)

### Введение:

Воздух может содержать различные микроорганизмы в большом количестве. Несмотря на то, что их клетки тяжелее воздуха, движение (людей, животных) и воздушные потоки могут переносить микроорганизмы с поверхностей на значительные расстояния и поднимать высоко вверх.

На чашку Петри с питательной средой в течение пяти минут осаждались микробы. После этого чашку Петри инкубировали в течение одной недели при комнатной температуре, для того, чтобы из одиночных клеток образовались колонии.

### Материалы:

Чашка Петри с осажденными на ней микроорганизмами,  
маркер,  
калькулятор.

### Практическая часть:

- Посчитай количество колоний бактерий и плесени на среде. Помечай посчитанные колонии маркером, что не посчитать одну колонию несколько раз.

**На чашке №. .... было ..... колоний.**

- Посчитай сколько образующих колоний микробных клеток (*CFU – colony forming unit*) находится в  $1 \text{ м}^3$  воздуха, если известно, что в течение пяти минут на поверхность в  $100 \text{ см}^2$  осаждается количество микробов, содержащееся в  $10 \text{ дм}^3$  воздуха. Радиус чашки с питательной средой равен  $4.25 \text{ см}$ .

.....  $\text{CFU}/\text{м}^3$

### Дополнительный вопрос:

**Микробы с какими признаками будут самыми стойкими в воздушной среде?**

## 2. Микробиологическое содержание йогурта (18 б)

### Введение:

В производстве йогурта используется маложирное молоко и разные культуры бактерий. Молочнокислые бактерии производят молочную кислоту и вкусовые соединения (например органические кислоты, ацетальдегид, диацетил). Для закваски чаще всего используются штаммы *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*.

Вдобавок к ферментирующим бактериям, многие йогурты содержат также полезные для здоровья пробиотические культуры (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* и *Bifidobacterium*).

### Материалы:

йогурт,  
предметное стекло,  
пинцеты,  
газовая горелка,  
спички,  
микробиологические пластиковые петли,  
дистиллированная вода,  
кристаллический фиолетовый (модификация Хакера),  
посуда для мытья,  
фильтровальная бумага,  
световой микроскоп,  
иммерсионное масло,  
бумага для очистки объектива,  
смесь эфира и этанола.

### Практическая часть:

- Изготовь из йогурта препарат для микроскопа и исследуй его под световым микроскопом, используя иммерсионное масло.
- 1) Подожди газовую горелку. Возьми пинцетом предметное стекло из раствора этанола и проведи его над пламенем. Дай сгореть этанолу.
  - 2) Капни из бутылки с водой каплю дистиллированной воды на остывшее предметное стекло. Возьми пластиковой петлей немного материала и просуспендируй его в капле воды, до образования слегка мутной смеси. **Не бери слишком много материала!**
  - 3) Размажь каплю по препаративному стеклу, чтобы препарат быстрее высох. **NB! Не растирай каплю слишком сильно.** Оставь высыхать на столе.
  - 4) Фиксируй высохший препарат термически. Для этого проведи предметное стекло с клетками пару раз над пламенем, так чтобы при прикосновении стекло было горячим. **Не нагревай мокрое стекло и не дай материалу пригореть!**
  - 5) Окрашивай фиксированный препарат в течение одной минуты кристаллическим фиолетовым (мод. Хакера). Для этого, прежде всего, покрой препарат кристаллическим фиолетовым. Через минуту аккуратно смой лишнюю краску дистиллированной водой в посуду для мытья.
  - 6) Просуши края препарата фильтровальной бумагой, дай препарату высохнуть и исследуй его под световым микроскопом, используя иммерсионное масло. Для этого капни одну каплю масла на препаратное стекло, поверни вниз объектив микроскопа, который используется для масла (100x увеличение) и сфокусируй изображение препарата, используя макро- и микровинты. Препарат на предметном столе можешь двигать, используя соответствующее колесо. Объектив должен быть погружен в каплю масла.
  - 7) **Покажи руководителю готовый препарат!**

8) После использования очисти объектив специальной бумагой, смоченной в смеси эфира и этанола!

- **Найди в препарате разнообразные, содержащиеся в йогурте бактерии. Нарисуй и/или опиши их (форма, размер, агрегация).**

**Дополнительный вопрос:**

**Из чего микробы производят молочную кислоту? Назови различные факторы, от которых зависит скорость производства кислоты и ее количество!**

### 3. Использование сахаров штаммами бактерий (15 б)

#### Введение:

Для идентификации и определения неизвестных бактерий, надо изучить характерные им генотипические (например последовательность гена 16S рРНК) и фенотипические признаки (биохимические, физиологические и др.). Использование разных источников углерода часто применяется при определении разных групп микроорганизмов, а также является важным критерием при идентификации вида бактерий. Для использования источников углерода и производства из них кислых продуктов, бактериям нужны как разлагающие субстрат ферменты, так и транспортные ферменты.

Известно, что природный штамм, принадлежащей к энтеробактериям *Escherichia coli*, не может использовать сахарозу, но может использовать фруктозу, ксилозу и маннитол. Близкая к *E. coli* бактерия *Citrobacter freundii* использует вдобавок сахарозу. Почвенные бактерии *Pseudomonas stutzeri* и *P. mendocina* используют в целом меньше сахаров. *P. mendocina* не использует ни одного сахара из данного перечня и *P. stutzeri* использует только ксилозу.

#### Материалы:

Пробирки, содержащие питательную среду с источниками углерода, куда высеяли штаммы бактерий.

#### Практическая часть:

- Рассмотрите пробирки, куда в среды, содержащие разные сахара, как источник углерода, были высеяны каждая из вышеупомянутых культур. Сравните цвет сред с цветом среды, куда бактерии не высеивались (К). Занесите результаты в таблицу.
- Базовая среда содержит два индикаторных красителя. С их помощью можно оценить использовал ли данный штамм соответствующий сахар. Бромтимолсиний имеет в кислой среде желтый цвет, а в щелочной среде – синий цвет, фенол красный при низком рН желтый, а при высоком рН – красный.
- Если штамм ферментирует данный сахар, тогда среда ..... (цвет), а если бактерия использует пептон, а не сахар и кислых продуктов не образуется, то среда ..... (цвет).

Среда	Цвет среды	рН	Использует ли штамм данный сахар?
Контроль (К)			X
Фруктоза (Fru)			
Сахароза (Sah)			
Маннитол (Man)			
Ксилоза (Ksül)			

- По тому, какие сахара используются, определите, с каким штаммом имеем дело.

### **Дополнительный вопрос:**

**С какой группой микробов имеем дело, если в базовой среде (богатая питательными веществами среда) есть рост бактерий на поверхности при комнатной температуре (~23°C)?**

Питательные среды и растворы:

#### **Питательный агар**

Мясной экстракт 3 г; пептон 5 г; агар 15 г на 1 л дест. воды. рН среды 6.8.

#### **Базовая среда**

Дрожжевой экстракт 1 г; пептон 2 г; фенол красный 0.04 г; бромтимолсиний 0.02 г; агар 2.5 г на 1 л дест. воды. рН среды 7.1. После автоклавирования были добавлены стерилизованные фильтрованием сахара с конечной концентрацией 1%

Среды были стерилизованы автоклавированием в течение 15 минут при 121°C.

#### **Кристаллический фиолетовый (модификация Хакера)**

Изготавливается смешением А и В растворов. А – 2 г кристаллического фиолетового в 20 мл 95% этанола; В – 0.8 г оксалата аммония в 80 мл дист. воды. Раствор фильтруется.

#### **Смесь для отчистки от иммерсионного масла**

Эфир 70%; этанол 30%.

Использованная литература

Alamäe, T. jt. Bioloogia gümnaasiumile II osa. Tartu, 2000.

Heinaru, E. ja Vedler, E. Praktilisi töid mikrobioloogiast. Tartu, 2007.

[http://www.loodusajakiri.ee/eesti\\_loodus/artikkel442\\_415.html](http://www.loodusajakiri.ee/eesti_loodus/artikkel442_415.html)

<http://www.miksike.ee/docs/lisa/5klass/2keemia/jogurtivalmistamine.htm>