

Школа ОЧУ МГ Сколково

## **Картина «Новогодняя елка» в чашке Петри**

Автор:

Лесман Ольга Денисовна

Руководитель:

Медведева Светлана Анатольевна

Москва, 2024 г.

## Оглавление

Цель работы .....	3
Задачи работы.....	3
Актуальность .....	3
I. Введение.....	3
II. Обзор литературы .....	4
III. Материалы и методы .....	6
Материалы .....	6
Методы.....	7
Результаты .....	11
Обсуждение .....	11
Литература .....	11
Приложение 1 .....	12
Приложение 2 .....	13

### **Цель работы:**

Создание картины «Новогодняя елка» с помощью микроорганизмов.

### **Задачи работы:**

1. Найти бактерии, которые образуют колонии, имеющие различную пигментацию, в т.ч. используя для посева различные среды.
2. Разработать технологию создания картины, в т.ч.:
  - выбрать метод посева;
  - найти способ использования в одной чаше Петри разных сред.
3. Подобрать время и температуру культивирования для найденных видов бактерий, которые обеспечат сбалансированный рост для создания картины.

### **Актуальность:**

Разработка новых методов культивирования позволит расширить применение бактерий в медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве и в других областях.

## **I. Введение**

Бактерии – одна из первых форм жизни на Земле, возникшая около 4 млрд лет назад. На сегодняшний день бактерии являются одними из самых многочисленных обитателей Земли. Бактерии живут в пресной и соленой воде, горячих источниках и озерах Антарктиды, в земле, населяют организмы животных, растений и грибов. Некоторые бактерии могут обитать даже в радиоактивных отходах. Один грамм почвы содержит около 40 млн бактериальных клеток, а в одном мл свежей воды содержится миллион бактериальных клеток. По подсчетам ученых всего на Земле насчитывается  $5 \cdot 10^{30}$  бактерий и их биомасса превышает биомассу всех живущих растений и животных.

Бактерии играют огромную роль в экосистеме Земли. Они разлагают останки животных и растений, составляют сложные симбиотические системы со многими организмами. Если представить себе исчезновение бактерий, то это приведет к глобальной экологической катастрофе.

Для человека бактерии также играют огромную роль. В человеческом теле обитает около 39 триллионов бактерий разных видов. Это число больше, чем количество наших собственных клеток. Самое большое количество бактерий обитает в кишечнике человека. Бактерии не только помогают усваивать пищу, но и, заселяя человеческий организм, не позволяют поселиться в нем микроорганизмам, которые могут принести вред, являясь, таким образом, частью нашей иммунной системы.

На сегодняшний день бактерии используются во многих областях деятельности человека: производстве антибиотиков и удобрений, переработке отходов, ликвидации разливов нефти, в пищевой и парфюмерной промышленности и др.

В настоящее время известно около 5 тысяч видов бактерий, но ученые предполагают, что общее число видов составляет от 10 миллионов до миллиарда. Это означает, что в настоящее время известно всего от 0,05 до 0,00005% от общего числа видов бактерий. Изучение новых видов позволит расширить сферу использования бактерий человеком – например, найти новые эффективные антибиотики, новые методы переработки пластика, токсичных отходов.

В моей работе проведено исследование культуральных свойств бактерий, полученных из пробы воды из пруда, для создания картины в чашке Петри. Создание картины требует подобрать такие условия культивирования, чтобы получить не только заданную пигментацию колоний, но и их сбалансированный рост.

## II. Обзор литературы

Бактерии – это живые одноклеточные организмы, не обладающие ядром (прокариоты), которые нельзя увидеть невооруженным глазом. Размер бактерий колеблется в пределах 0,2–10,0 мкм. Встречаются среди бактерий и «карлики», т. н. нанобактерии (около 0,05 мкм), и «гиганты» (длина до 100 мкм).

Форма клеток бактерий разнообразна: бактериальные клетки могут иметь вид палочки, быть сферическими (кокки) или извитыми (вибрионы, спириллы и спирохеты). Обнаружены виды с треугольными, квадратными, звездчатыми и плоскими (тарелкообразными) клетками.

Встречаются как подвижные, так и неподвижные бактерии. Подвижные чаще всего перемещаются с помощью жгутиков, иногда путём скольжения клеток (миксобактерии, цианобактерии, спирохеты и др.). Известно также «прыгающее» движение, природа которого не выяснена. Для подвижных форм описаны явления активного движения в ответ на действия физических или химических факторов.

Бактериальная клетка чаще всего окружена мембраной и клеточной стенкой. Основу клеточной стенки всех бактерий составляет муреин, обеспечивающий эластичность клеточной стенки. По типу устройства клеточной стенки бактерии делят на две группы – грамположительные и грамотрицательные. Грамположительные бактерии (грам+) имеют толстые клеточные стенки, содержащие до 40 муреиновых слоев; грамотрицательные (грам-) бактерии имеют довольно тонкие клеточные стенки, имеющие лишь один слой муреиновых волокон (исключение составляют цианобактерии). Муреин свойственен только бактериям, у животных и растительных клеток он отсутствует. Особые свойства муреина, наличие его только у бактерий дают возможность разрабатывать лекарственные препараты, которые разрушают клеточные стенки бактерий и вызывают их гибель. Для эукариотических клеток такие препараты абсолютно безвредны. К таким веществам, в частности, относится лизоцим, открытый А. Флемингом в 1922 г. в слезной жидкости и в слизи верхних дыхательных путей.

Многие бактерии живут на теле и в организме людей и животных — на коже и в дыхательных путях, во рту, пищеварительном тракте, половых и мочевыводящих путях. По влиянию бактерий на живые организмы их можно разделить на три вида – патогенные, условно-патогенные и непатогенные. Непатогенные бактерии – бактерии, которые никогда не приводят к болезням, даже в том случае если их численность достаточно велика. Условно-патогенные - бактерии, которые наносят вред живому организму. При наступлении благоприятных условий (ослабление иммунитета, нарушение микрофлоры) их колония вырастает и становится настоящей угрозой. В здоровой микрофлоре такие бактерии не могут нанести вред живому организму.

Наличие патогенных бактерий в организме всегда означает развитие инфекции. Даже небольшая колония способна нанести вред.

Для изучения бактерий важно уметь выращивать их в условиях лаборатории. Такие методы исследования называются культуральными, так как они позволяют получать культуры разных видов бактерий. Основой культурального метода являются питательные среды. Первые из них были разработаны во времена знаменитых исследований Луи Пастера и Роберта Коха на основе желатина. Немного позже исследовательница лаборатории Коха Анджелина Гессе предложила агар, как компонент питательной среды. С помощью агара (химическое вещество, используемое для уплотнения питательных сред) были разрешены многие технические проблемы, препятствующие развитию экспериментов, что позволило микробиологии получить интенсивное развитие. По настоящее время роль питательной среды в работе микробиологов остается определяющей.

Питательной средой называют основу, содержащую различные соединения сложного и простого состава, обеспечивающие культивирование и рост микроорганизмов в лабораторных или промышленных условиях.

Для того чтобы бактерии размножались, можно использовать разные виды питательных сред. Среды по происхождению делятся на естественные, искусственные и синтетические.

По консистенции среды бывают жидкие, которые используются для накопления бактериальных культур, полужидкие и твердые - используются для получения колоний микроорганизмов.

По назначению питательные среды делятся на среды общего назначения (универсальные), которые используются для культивирования многих видов микроорганизмов, и специальные - они применяются для некоторых видов микроорганизмов с целью изучения их свойств и определения видовой принадлежности.

К специальным средам относятся дифференциально-диагностические среды, которые применяют для изучения способности разных видов бактерий перерабатывать входящие в среды питательные вещества (например, различные сахара). Часто в состав таких сред включаются различные красители, которые изменяют цвет среды при изменении ее кислотности.

Например, среда Эндо позволяет отличить микроорганизмы, способные перерабатывать сахар лактозу. Состав среды включает питательную основу, агар, лактозу и цветной индикатор – основной фуксин. Исходная питательная среда имеет розовый цвет. Микроорганизмы, не перерабатывающие лактозу, образуют на среде бесцветные или розовые колонии в тон среды. При переработке лактозы колонии окрашиваются в малиновый или красный цвет с металлическим блеском.

Также к специальным средам относятся селективные среды. Селективные среды обеспечивают преимущественное развитие определенных видов микроорганизмов. Избирательность среды достигается путем добавления различных компонентов, таких как антибиотики или различные химические вещества. Например, на среде Эндо подавляется рост грамположительных бактерий за счет содержания в среде основного фуксина.

Некоторые бактерии вырабатывают вещества, называемые пигментами, которые при выращивании колоний на средах общего назначения приводят к окрашиванию колоний в различные цвета. Так, например, некоторые бактерии, относящиеся к роду *Micrococcus* (Микрококки), на средах общего назначения образуют колонии желтого или оранжевого

цвета, *Pseudomonas aeruginosa* (Синегнойная палочка) образует колонии сине-зеленого цвета.

На специализированных средах, в состав которых входят красители, колонии также могут окрашиваться в различные цвета. В этом случае окрашивание колоний может быть связано с тем, что краситель, содержащийся в среде, вместе с питательными веществами потребляется бактериями, но не может быть полностью ими переработан и выводится в окружающую среду, меняя цвет колонии. Такие свойства сред и бактерий помогают определять вид бактерий.

Культивирование микроорганизмов, помимо состава питательной среды, зависит от различных факторов: температуры, света, наличия кислорода и др., поэтому для культивирования определенного вида бактерий важно не только подобрать правильную среду, но и создать оптимальные для культивирования условия. От условий культивирования может зависеть не только сам рост колоний, но и проявляемые культивируемыми бактериями свойства. Например, многие виды бактерий вырабатывают цветные пигменты только на свету и при определенной температуре.

На сегодняшний день разработано большое количество различных сред и методов культивирования, однако только около 50% известных видов бактерий культивируются в условиях лаборатории.

### **III. Материалы и методы**

#### **Материалы**

Оборудование:

- Микроскоп Levenhuk с увеличением 1 000 крат (Oil);
- Камера для микроскопа цифровая Levenhuk M500 BASE (разрешение 2592x1944);
- Инкубатор для яиц
- Горелка;

Среды микробиологические:

- Среда ГРМ-бульон;
- Агар Эндо-ГРМ;
- Среда Гисса-ГРМ с глюкозой;
- Среда Гисса-ГРМ с глюкозой;
- Среда База для кровяного агара;
- Раствор натрия хлорида 0,9%;

Прочие материалы:

- Масло иммерсионное;
- Генциановый фиолетовый карболовый;
- Раствор Люголя;
- Раствор сафранина;
- Этиловый спирт 95%;
- Раствор натрия хлорида 0,9%;
- Этиловый спирт 95%;
- Вода дистиллированная;
- Парафин нефтяной твердый, марка П-2
- Чашки Петри 60X18 мм, 100 X 20 мм
- Пипетки стерильные;
- Бактериологические петли;

- Стерильные палочки-тампоны ватные;
- Пинцеты;
- Салфетки медицинские спиртовые.

### Методы

Для получения разных видов бактерий был сделан забор воды из пруда в Воронцовском парке в стерильную пробирку. Забор воды производился 28.08.24 г. В течение 5 дней до забора воды дневная температура составляла 26-28°C, ночная – 16-19°C, что способствует развитию и размножению бактерий.

В течение 4 часов после забора воды был сделан посев методом штриха на различные среды:

- агаризованный ГРМ-бульон;
- среду Гисса с мальтозой;
- среду Гисса с глюкозой;
- среду Эндо.

Чашки Петри были помещены в инкубатор, где выдерживались при температуре 37°C в течение 24 часов. Во всех чашках Петри был получен рост колоний. Описание колоний приведено в Таблице 1.

*Таблица 1. Описание колоний*

№ п/п	Среда	Описание колоний
1	Агаризованный LB бульон (Приложение 1, фото 1)	Получен 1 вид колоний. Округлые бесцветные матовые (цвета среды) колонии с ровными краями, диаметром 3-5 мм, слегка выпуклые. По консистенции – однородные, слизистые.
2	Среда Эндо (Приложение 1, фото 2)	Получены 4 вида колоний: 1. Темно-розовые колонии, круглые, гладкие, блестящие, слегка выпуклые с гладкими краями, диаметром 4-5 мм. По консистенции – однородные, мягкие. 2. Красные колонии с металлическим блеском, круглые, блестящие, плоские с гладкими краями, диаметром 2-3 мм. По консистенции – однородные, мягкие. 3. Светло-розовые колонии с более светлыми, кремовыми краями. Круглые, глянцевые, слегка выпуклые с гладкими краями, диаметром 2-3 мм. По консистенции однородные мягкие. 4. Многочисленные колонии грязно-розового цвета. Круглые, гладкие, глянцевые, слегка выпуклые с ровными краями, диаметром 0,5-1 мм. По консистенции – однородные, мягкие.
3	Среда Гисса с мальтозой (Приложение 1, фото 3)	Получены 5 видов колоний: 1. Светло-желтые колонии, глянцевые, круглые, диаметром 8-10 мм, края ровные, плоские. Консистенция – однородные, мягкие, достаточно плотные. Хорошо снимаются со среды и с петли. 2. Грязно-оранжевые, глянцевые, круглые, диаметром 2 мм, с куполообразным выступом в середине и выпуклостью по

№ п/п	Среда	Описание колоний
		<p>краям. Консистенция – однородные, мягкие, достаточно плотные. Хорошо снимаются со среды и с петли.</p> <p>3. Темно-зеленые, с насыщенным цветом в середине и более прозрачным по краям, глянцевые, круглые, диаметром 2 мм. Плоские.</p> <p>4. Мелкие, грязно-зеленого ненасыщенного цвета. Края ровные, выпуклые, глянцевые. Диаметр 1 мм.</p> <p>5. Мелкие, белые, круглые, глянцевые, края ровные, выпуклые. Диаметр 2 мм.</p>
4	Среда Гисса глюкозой (Приложение 1, фото 4)	<p>Получено три вида колоний:</p> <p>1. Прозрачные глянцевые округлые плоские колонии, диаметром 2-3 мм, края ровные. Консистенция – однородные, слизистые. Тянутся за петлей.</p> <p>2. Круглые колонии болотного цвета в центре и прозрачные по краям, слегка выпуклые, диаметром 3-4 мм. Консистенция – однородные, мягкие. Хорошо снимаются со среды и с петли.</p> <p>3. Округлые плоские глянцевые колонии грязно-желтого цвета в центре и прозрачные по краям, диаметром 5-6 мм. Консистенция – однородные, мягкие. Хорошо снимаются со среды и с петли.</p>

Для получения картины «Новогодняя елка» необходимо получить колонии нескольких цветов:

- зеленого для изображения елки;
- белого для изображения снега;
- разных цветов, контрастирующих с зеленым, для шариков на елке.

Для накопления чистых культур перечисленных цветов были проведены следующие посевы:

- микроорганизмы из колоний грязно-зеленого цвета со среды Гисса с мальтозой пересеяны на среду Гисса с мальтозой (далее Посев 1);
- микроорганизмы из колоний грязно зеленого цвета со среды Гисса с глюкозой на среду Гисса с глюкозой (далее Посев 2);
- микроорганизмы со среды Гисса с мальтозой белого цвета на агаризованный ГРМ-бульон (далее Посев 3);
- микроорганизмы из колоний грязно-розового цвета со среды Эндо на среду Эндо (далее Посев 4);
- микроорганизмы из колоний красного цвета с металлическим блеском со среды Эндо на среду Эндо (далее Посев 5);

Посевы проведены методом газона или методом штриха. После посева чашки были помещены в инкубатор с температурой 37°C на 24 часа. Во всех чашках получен рост колоний. Результаты посевов приведены в таблице 2.

Таблица 2. Накопление чистой культуры

№ п/п	Среда	Описание колоний
1	Посев 1 (Приложение 1, фото 5)	Получен рост колоний по всей поверхности среды. Получены колонии желтого цвета.
2	Посев 2 (Приложение 1, фото 6)	Получен рост колоний по всей поверхности среды. Получены колонии ярко-зеленого цвета.
3	Посев 3 (Приложение 1, фото 7)	Получен рост колоний по всей поверхности среды. Получены колонии белого цвета.
4	Посев 4 (Приложение 1, фото 8)	Получен рост колоний по всей поверхности среды. Получены колонии розового цвета.
5	Посев 5 (Приложение 1, фото 9)	Получен рост колоний по всей поверхности среды. Получены колонии желтого цвета. Получены колонии с зеленым металлическим блеском. .

Для определения Царства, к которому относятся полученные микроорганизмы, была проведена микроскопия с окраской по Граму. Данные по микроскопии приведены в таблице 3.

Таблица 3. Данные микроскопии

Колония	Окраска по Граму	Описание микроорганизмов
Посев 1 (Приложение 1, фото 10)	Отрицательная	Палочки, размером около 1 мкм. Расположены поодиночке.
Посев 2 (Приложение 1, фото 11)	Отрицательная	Палочки, размером 3,5-4 x 0,5 мкм, расположены поодиночке или короткими цепочками.
Посев 3 (Приложение 1, фото 12, 13)	Положительная	Кокки, размером 0,8-1 мкм. Расположены парами, тетрадами или короткими цепочками. На одном из фото виден крупный микроорганизм, попавший из воды.
Посев 4 (Приложение 1, фото 14)	Отрицательная	Палочки, размером 1,5-2 x 0,5 мкм. Расположены поодиночке.
Посев 5 (Приложение 1, фото 15)	Отрицательная	Палочки, размером 1,8-2 мкм. Расположены поодиночке, попарно или в виде цепочек. (Вероятно, <i>Escherichia coli</i> )

Данные микроскопии говорят о том, что найденные микроорганизмы являются бактериями. По морфологии все бактерии относятся к разным видам.

Дизайн первого варианта картины елки включает елку и снег. Для рисования картины была использована среда Гисса с глюкозой с увеличением плотности среды путем добавления 0,6 мг агара на 100 мл среды. Для прорисовки елки использованы микроорганизмы из Посева 2, для снега микроорганизмы из Посева 3. Посев для

получения елки проводится методом газона бактериологической петлей, для снега стерильной палочкой-тампоном. Чашка Петри с посевом помещалась в инкубатор, инкубирование проводилось в течение 24 часов при температуре 37°C. Картина приведена в Приложении 2, фото 1.

Для увеличения контраста между цветами елки и пространства со снегом можно использовать две разные среды. Дизайн второго варианта картины включает в себя елку и снег с использованием двух разных сред. Для фона со снегом использован агаризованный ГРМ-бульон с добавлением голубого пищевого красителя. Для получения елки использована среда, состоящая из среды Гисса с мальтозой и основы для кровяного агара, которые смешивались в соотношении 1:3. Такой состав среды имеет меньшее содержание мальтозы и позволяет использовать микроорганизмы из Посева 1, т.к. пожелтения колоний не происходит. Технология получения картины включает следующие шаги:

1. Чашка Петри заливается агаризованным ГРМ-бульоном с добавлением пищевого красителя.
2. После застывания среды с помощью трафарета из среды вырезается елка (Приложение 2, фото 2).
3. В полученное отверстие заливается среда, приготовленная из среды Гисса с мальтозой и основы для кровяного агара (Приложение 2, фото 3).
4. После застывания среды методом посева газонном с помощью петли производится посев микроорганизмов из Посева 1.
5. С помощью стерильной палочки-тампона на среде, использованной как фон, прорисовываются снежинки, снег под елкой и снег на ветках.
6. Чашка Петри помещается в инкубатор на 20 часов при температуре 37°C.

Полученная картина приведена в Приложении 2, фото 4.

Для того, чтобы «нарядить» елку необходимы елочные украшения, которые можно нарисовать с помощью колоний, полученных на среде Эндо. Так можно получить украшения розового и золотистого цвета. Украшения третьего цвета можно получить на агаризованном ГРМ-бульоне с добавлением пищевого красителя.

Поскольку для получения украшений необходимо использовать другие среды, чем среда, использованная для елки, то на елке должны быть сделаны отверстия в среде, для заливки среды Эндо и агаризованного ГРМ-бульона. Проведенные эксперименты показали, что при таком подходе, среда, которая залита для украшений (шариков), в ходе инкубации быстро теряет влагу и шарики получаются не выпуклыми, а наоборот с углублением в центре. Для решения этой проблемы можно использовать водоотталкивающий материал. При обработке дна и стенок отверстий подобным материалом, шарики будут выпуклыми. В качестве такого материала был использован микробиологический парафин (прототип шариков показан в Приложении 2, фото 5,6).

Дизайн картины с украшениями включает в себя елку, снег и украшения в виде шариков. Технология получения картины включает следующие шаги:

1. Чашка Петри заливается агаризованным ГРМ-бульоном с добавлением пищевого голубого красителя.
2. После застывания среды с помощью трафарета из среды вырезается елка.
3. В полученное отверстие заливается среда, приготовленная из среды Гисса с мальтозой и основы для кровяного агара.

4. После застывания среды методом посева газонем с помощью петли производится посев микроорганизмов из Посева 1.
5. С помощью стерильной палочки-тампона на фоне прорисовываются снежинки.
6. С помощью стерильной палочки-тампона наносится колония *Bacillus subtilis* (Сенной палочки) на верхушку елки.
7. Чашка Петри помещается в инкубатор. Инкубирование производится 20 часов при температуре 37°C.
8. Через 20 часов инкубирования на елке с помощью простерилизованной пробирки вырезаются круги для создания шариков.
9. Полученные отверстия обрабатываются парафином.
10. После застывания парафина в отверстия заливается среда для шариков.
11. Производится посев бактерий со среды Эндо.
12. Чашка Петри помещается в инкубатор на 18 часов при температуре 37°C.
13. Через 18 часов чашка Петри помещается в темное место при комнатной температуре на двое суток.

Время выдерживания чашки Петри в инкубаторе и при комнатной температуре определялось экспериментально. Дополнительное время необходимо для создания иллюзии свечения елки.

Фото полученной елки приведены в Приложении 2, фото 7,8.

### **Результаты**

Получены бактерии на различных средах, дающие пигментацию колоний заданных цветов (зеленого, цветные для шариков). Разработана технология проведения посевов на разных средах в одной чашке Петри. Подобраны условия инкубирования для получения картины.

### **Обсуждение**

Бактерии играют важную роль в жизни человека. Разработка методов культивирования для новых, неизученных видов или видов, которые пока не удается культивировать - это важная задача для поиска новых лекарств, технологий использования бактерий в разных областях. Мне кажется, что подход к изучению бактерий в школе с помощью создания картин - это очень увлекательный и познавательный метод изучения бактерий.

### **Литература**

1. Микробиология. Практикум / Л.С. Лавренчук, А.А. Ермошин – Екатеринбург, Издательство Уральского университета, 2019
2. Изучение распространения пигментообразующих бактерий в различных субстратах / Ахмедова Ф.Р., Джафарова У.Д. - УДК 57.579.262, 2012
3. <https://ru.wikipedia.org/>

## Приложение 1



Фото 1. Колонии на агаризованном ГРМ-бульоне



Фото 2. Колонии на среде Эндо



Фото 3. Колонии на среде Гисса с мальтозой



Фото 4. Колонии на среде Гисса с глюкозой



Фото 5. Колонии на среде Гисса с мальтозой



Фото 6. Колонии на среде Гисса с глюкозой



Фото 7. Колонии на агаризованном ГРМ-бульоне



Фото 8. Колонии на среде Эндо



Фото 9. Колонии на среде Эндо



Фото 10. Бактерии из посева 1



Фото 11. Колонии из посева 2



Фото 12. Бактерии из посева 3



Фото 13. Колонии из посева 3



Фото 14. Бактерии из посева 4



Фото 15. Колонии из посева 5

## Приложение 2



Фото 1. «Елка со снегом», дизайн 1



Фото 2. Фон и отверстие для среды для посева елки



Фото 3. Чашка Петри со средами



Фото 4. Елка со снегом



Фото 5. Подготовка отверстий для шариков



Фото 6. Шарики



Фото 7. Елка с шариками через 20 часов инкубирования при температуре 37°C



Фото 8. Елка с шариками через 20 часов инкубирования при температуре 37°C и роста колоний при комнатной температуре в течение 2-х суток