

МУНИЦИПАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ГИМНАЗИЯ № 30»

Исследовательский проект
**«Изучение видового и численного разнообразия бактерий на
различных поверхностях»**

Выполнила:

Ученица 11 «Б» класса

Палыгина Евгения
Александровна

Руководители проекта:

Учитель биологии «Гимназии
30» Соколова Евгения
Анатольевна,

старший преподаватель
кафедры биологии ИВГУ
Сивухин Алексей Николаевич

Иваново, 2024

Оглавление

ОГЛАВГЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ	3
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1. Условия обитания бактерий.....	5
2. Метод окраски по Граму, правила взятия смывов и создания посева	7
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	8
ВВЕДЕНИЕ.....	2
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1. Условия и места обитания бактерий.....	5
Микроорганизмы, обитающие на поверхности рук.....	5
Бактерии на поверхности телефона.	6
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	8

ВВЕДЕНИЕ

Каждому из нас известно, что мы постоянно сталкиваемся со множеством разнообразных микроорганизмов. Мы их не видим и часто даже не задумываемся о них.

«Невидимые, они постоянно сопровождают человека, вторгаясь в его жизнь то как друзья, то как враги», — сказал академик В. Л. Омелянский.

Действительно, микробы есть везде: в воздухе, в воде, в почве, в организме человека и животных, на всех поверхностях и предметах вокруг нас. Ученым удалось подсчитать, что в теле здорового человека находится около 10 000 видов бактерий, большинство из которых не причиняют нам никакого вреда. [\[1\]](#)

Большинство людей в 99% случаев при упоминании слова «микроб» будут воспринимать это как нечто резко негативное, однако, это не так, поскольку лишь 5% от всех существующих на планете Земля микроорганизмов будут относиться к группе патогенных для человека, соответственно остальные 95% существуют с человеком в добрососедских отношениях (симбиоз). Из этого следует, что стоит перестать бояться микробов, как вечных врагов человека, однако, это не означает, что нужно перестать заботиться о своем здоровье, пренебрегая правилами личной гигиены, ведь все-таки 5% микробов представляют для человека опасность. [\[2\]](#)

Предметы в квартире не являются исключением. Особенно богатой микрофлорой отличаются:

1. ручки входной и межкомнатных дверей;
2. клавиатура и компьютерная мышка;
3. блоки дистанционного управления различными устройствами;
4. места общего пользования и т.д. [\[3\]](#)

Цель проекта: изучить видовое разнообразие и численность бактерий на различных поверхностях.

Объектом исследования являются бактерии.

Предметом исследования являются видовое и численное разнообразие бактерий.

Актуальность проектной работы:

Очень часто мы не задумываемся о том большом количестве микроорганизмов, которое окружает нас. Бактерии повсюду: на руках, телефоне, одежде, в местах общественного пользования и т.д. Стоит серьезно подойти к изучению многообразия и численности бактерий, чтобы избежать

заражения различными инфекциями и выяснить каким поверхностям нужно уделить особое внимание и регулярнее проводить их дезинфекцию.

Задачи проекта:

- 1) Собрать информацию о том, на каких поверхностях скапливается больше всего бактерий;
- 2) Сделать смывы с различных поверхностей и провести исследование;
- 3) Сделать окрашивание методом Грама;
- 4) Проанализировать полученные результаты, нулевую гипотезу, поставленную в начале исследования, и сделать вывод;
- 5) Создать продукт.

Гипотеза: количественное и видовое разнообразие бактерий на изучаемых поверхностях одинаково.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Условия и места обитания бактерий.

Бактерии приспособились к разным условиям существования. Они могут развиваться в диапазоне температур от -5 (и ниже) до 113 °С. Споры отдельных видов бактерий выдерживают кратковременное нагревание до 160 – 180 °С и длительное охлаждение до -196 °С и ниже. Некоторые бактерии чрезвычайно устойчивы к ионизирующему излучению и живут даже в воде охлаждающих контуров атомных реакторов (*Deinococcus radiodurans*). Ряд бактерий (барофилы, или пьезофилы) хорошо переносят гидростатическое давление до 101 тыс. кПа. В то же время есть бактерии, не выдерживающие даже незначительного увеличения атмосферного давления. Большинство видов бактерий не развиваются, если концентрация солей NaCl в среде превышает $0,5$ моль/л. Как правило, бактерии предпочитают нейтральные условия среды обитания (рН около $7,0$), хотя встречаются как экстремальные ацидофилы, способные к росту при рН $0,1$ – $0,5$, так и алкалофилы, развивающиеся при рН до $13,0$.

подавляющее большинство изученных бактерий – аэробы. Некоторые из них могут расти только при незначительной концентрации O_2 – до $1,0$ – $5,0$ % (микроаэрофилы).[\[4\]](#)

Медицинское исследование, заключавшееся в сборе проб с различных поверхностей в бытовых помещениях, выяснило, что основными местами скопления микробов были следующие (в порядке убывания плотности бактерий на единицу площади):

- пол и ковер,
- внешний воздух,
- домашние питомцы,
- вход в помещение,
- кожа,
- кухонный стол,
- ванная,
- холодильник,
- слюна,
- туалет.

Микроорганизмы, обитающие на поверхности рук.

1. Сальмонеллы – некоторые виды вызывают острые кишечные заболевания (сальмонеллёзы), например, брюшной тиф.
2. Кишечная палочка – отдельные штаммы приводят к тяжёлым пищевым отравлениям, могут вырабатывать токсины, смертельные для детей, людей пожилого возраста или с ослабленным иммунитетом.
3. Шигеллы – вызывают целый ряд инфекционных заболеваний, например, дизентерию.
4. Бруцеллы – приводят к множественному поражению внутренних органов, вызывают бруцеллёз.
5. Стафилококк золотистый – наиболее патогенный для человека вид стафилококка. Вызывает целую гамму заболеваний – от лёгких кожных (угри, фурункулы) до смертельно опасных (пневмония, менингит, сепсис). Существуют штаммы, устойчивые к антибиотикам, что ощутимо усложняет лечение. [\[6\]](#)

Бактерии на поверхности телефона.

На вашем телефоне могут присутствовать герпесвирусы, адено- и риновирусы, ротавирусы и, конечно, коронавирусы. Из опасных бактерий — золотистый стафилококк, стрептококки, кишечная палочка, сальмонелла. Правда, продолжительность их жизни на смартфоне определяется многими условиями.

Микробиология пока не позволяет понять, как много бактерий и прочих микробов обитает на смартфоне. Но можно предположить, делая смывы с гаджетов и анализируя всю ДНК, что оказалась в растворе. Каждый раз велик шанс обнаружить нового микроба, до сих пор неизвестного науке. Но и без «новичков» опасностей предостаточно: вы можете хранить на экране возбудителей респираторных кишечных инфекций, а также заболеваний кожи. [\[7\]](#)

2. Метод окраски по Граму, правила взятия смывов и создания посева.

Метод Грама — метод окраски микроорганизмов для исследования, позволяющий дифференцировать бактерии по биохимическим свойствам их клеточной стенки. Предложен в 1884 году датским врачом Гансом Кристиана Грамом.

Бактерии окрашивают анилиновыми красителями — генциановым или метиловым фиолетовым и др., затем краситель фиксируют раствором иода. При последующем промывании окрашенного препарата спиртом те виды бактерий, которые оказываются прочно окрашенными в синий цвет и имеющие толстую клеточную стенку, называют грамположительными бактериями, обозначаются Грам (+), — в отличие от грамотрицательных (тонкая клеточная стенка), Грам (–), которые при промывке обесцвечиваются.

После промывания растворителем при окрашивании по Граму добавляется контрастный красный краситель, который окрашивает все грамотрицательные бактерии в красный или розовый цвет. Это происходит из-за наличия внешней мембраны, препятствующей проникновению красителя внутрь клетки. Тест классифицирует бактерии, разделяя их на две группы относительно строения их клеточной стенки. [8]

Смывы с объектов и проведение посева. Рекомендации по взятию смыва:

- смывы с мелких объектов (поверхность которых менее 100 см) берут со всей поверхности; при необходимости - с нескольких единиц одноименных предметов (вилки, ножи и т.д.);
- при взятии смывов с рук протирают тампоном ладонные поверхности обеих рук, проводя не менее 5 раз по каждой ладони и пальцам, потом протирают межпальцевые пространства, ногти и под ногтевые пространства;

3. Методика посева на общую бактериальную обсемененность (общее микробное число).

Для определения общей бактериальной обсемененности (общего микробного числа) поверхностей 1,0 см смывной жидкости помещают в чашку Петри и заливают расплавленным питательным агаром. Чашки помещают в термостат при температуре $(30 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$. Предварительный подсчет выросших колоний производят через 48 часов, окончательный - через 72 часа. Количество колоний, выросших на чашке, умножают на 10 для определения общего количества бактерий, содержащихся на поверхности исследуемого предмета. [9]

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Взятие смывов. Взяли 5 мерных пробирок налили в них физраствор (стерильный изотонический раствор) натрия хлорида по 1 мл в каждую. Увлажнили марлевые тряпки одинаковых размеров, площадью 40 см кв., поместив с помощью пинцета в физраствор. Затем взяли смывы с поверхности и задней крышки телефона, с рук, с ручки двери, с обуви и с поверхности выключателя увлажненными стерильными марлевыми тряпками. Марли со смывом вновь поместили в пробирки, налив в каждую 2 мл натрия хлорида.

Создание плотной питательной среды с агар-агаром и посев.

3г сухого ГРМ агара залили в колбе 100 мл дистиллированной воды. Перемешивая, довели до кипения. Разлили в чашки Петри, минимизируя время контакта с воздухом. После застывания агара подсушили чашки в термостате при открытом состоянии в течение 20 мин. Затем нанесли посевной материал на питательную среду агара, равномерно распределяя его по всей поверхности чашки Петри шпателем. После посева чашки поместили в термостат при температуре 25- 28 градусов С. Развитие колоний наблюдали на 2-3 день.

Подсчет колоний. С помощью сетки Вальфлюгеля производится подсчет колоний. Колонии считаются в трех клетках по диагонали. 72.5 см²- площадь чашки Петри, КОЕ-колониобразующая единица жизнеспособных клеток, ОМЧ-общее микробное число на поверхности смыва. По методике СанПиНа.

Изготовление мазка. На предметное стекло нанесли каплю физраствора. В эту каплю поместили обожжённой в пламени горелки петлей изучаемые колонии бактерий. Затем предметное стекло сушится высоко над пламенем горелки так, чтобы все бактерии погибли и прочно закрепились на стекле (фламбирование).

Окраска бактерий по Граму. Далее мазок подвергается окраске генцианвиолетом. Окраска длится 1 минуту, после чего остатки красителя слили, и залили стекло раствором Люголя. Он соединяется с генцианвиолетом и образует прочное соединение сине-фиолетового цвета. Окраска Люголем длится 1 минуту. После окраски стекло промыли проточной водой. Чтобы дифференцировать грамположительные и грамотрицательные бактерии мазки помещают в 96% этиловый спирт до тех пор, пока стекающие капли не сравняются по цвету со спиртом в стакане. Сине-фиолетовый комплекс вымывается из стенок грамотрицательных бактерий, оставаясь только в стенках грамположительных. Чтобы можно было увидеть в микроскоп грамотрицательные бактерии, после промывки

мазка водой на него наносится фуксин, который не попадет в стенки грамположительных бактерий. После это препарат промывается водой и высушивается. Препарат готов к микрокопированию.

Результаты исследования

В ходе исследования я получила следующие результаты подсчета колоний:

Чашка Петри 1. Первая клетка: 27 колоний

Вторая клетка: 23 колонии

Третья клетка: 21 колония

Среднее значение в трех клетках = $(27+23+21):3=23,6$

Общее количество бактерий: $23,6 \cdot 2,5= 1716$ КОЕ/мл

$1716 \cdot 10 = 17160$ КОЕ или ОМЧ= $17,2 \cdot 10^3$ КОЕ.

Чашка Петри 2. Первая клетка: 37 колоний

Вторая клетка: 48 колонии

Третья клетка: 34 колония

Среднее значение в трех клетках = $(37+48+34):3=39,7$

Общее количество бактерий: $39,7 \cdot 72,5= 2876$

$2876 \cdot 10 = 28760$ КОЕ или ОМЧ= $28,8 \cdot 10^3$ КОЕ

Чашка Петри 3. Первая клетка: 46 колоний

Вторая клетка: 36 колонии

Третья клетка: 38 колония

Среднее значение в трех клетках = $(46+36+38):3=40$

Общее количество бактерий: $40 \cdot 72,5= 2900$ КОЕ/мл

$2900 \cdot 10 = 29000$ КОЕ или ОМЧ= $29 \cdot 10^3$ КОЕ

Чашка Петри 4. Первая клетка: 52 колоний

Вторая клетка: 70 колонии

Третья клетка: 71 колония

Среднее значение в трех клетках = $(52+70+71):3=64,3$

Общее количество бактерий: $64,3 \cdot 72,5= 4664$ КОЕ/мл

$$4664 \cdot 10 = 46640 \text{ КОЕ или ОМЧ} = 47 \cdot 10^3 \text{ КОЕ}$$

Чашка Петри 5. Первая клетка: 38 колоний

Вторая клетка: 21 колонии

Третья клетка: 28 колония

Среднее значение в трех клетках = $(38+21+28):3=29$

Общее количество бактерий: $29 \cdot 72,5 = 2103 \text{ КОЕ/мл}$

$$2103 \cdot 10 = 21030 \text{ КОЕ или ОМЧ} = 29 \cdot 10^3 \text{ КОЕ}$$



- **Результаты окрашивания колоний бактерий по Граму:**

В мазке, взятого из чашки Петри 3, наблюдали прозрачные колонии, в которых обнаружили ассоциированную колонию из положительных стафилококков, актиномицетов и положительных палочек;

В мазке, взятого из чашки Петри 5, были обнаружены коричневые колонии, которые состоят из положительных стафилококков;

В мазке, взятого из чашки Петри 1, обнаружили большие белые колонии, которые включают в себя положительные стафилококки, растущие гроздьями;

Из мазка, взятого из чашки Петри 2, удалось рассмотреть типичные колонии, (характерные для всех мазков) образованные из отдельно лежащих отрицательных аэрококков;

Выводы

1. По результатам подсчета и сравнения количества колоний бактерий в разных чашках можно расположить изучаемые поверхности в следующем порядке по возрастанию количества колоний:

1. Телефон
2. Руки
3. Выключатель
4. Обувь
5. Ручка двери

Таким образом, можно сделать закономерный вывод о том, что наиболее загрязненной поверхностью является ручка двери, так как предметы, которые принято считать постоянно грязными, телефон и руки, регулярно подвергаются чистке, а ручки двери и клавиши выключателей-далеко не всегда.

2. На поверхностях были выявлены различные бактерии, среди которых преобладают стафило- и аэрококки, а также актиномицетные формы, распадающиеся на кокки и палочки. Патогенной флоры не обнаружено.

3. На каждой поверхности присутствуют бактерии разных видов, количество микроорганизмов тоже оказалось разным, таким образом моя гипотеза не подтвердилась

Список литературы

- [1]-<https://www.itla.lv/ru/actual/bakterii-i-virusyi-vokrug-nas/> (дата обращения: 24.02.2024)
- [2]-<https://fbuz27.ru/en/mikroorganizmy-vokrug-nas/> (дата обращения: 24.02.2024)
- [3]-<https://gdp7.medgis.ru/materials/view/kakie-bakterii-zhivut-na-nashih-rukah-3262> (дата обращения: 24.02.2024)
- [4]- <https://bigenc.ru/c/atmosfernoe-davlenie-f624f2> (дата обращения: 03.02.2024)
- [5]-<https://iceoom.com.ua/blog/bacterial-contamination-of-indoor-air-the-sources-and-consequences/> (дата обращения: 21.02.2024)
- [6]- <https://gdp7.medgis.ru/materials/view/kakie-bakterii-zhivut-na-nashih-rukah-3262> (дата обращения: 24.02.2024)
- [7]- <https://www.sobaka.ru/health> (дата обращения: 24.02.2024)
- [8]- <https://ru.m.wikipedia.org/wiki/> (дата обращения: 31.01.2024)
- [9]- <https://docs.cntd.ru/document/> (дата обращения: 31.01.2024)

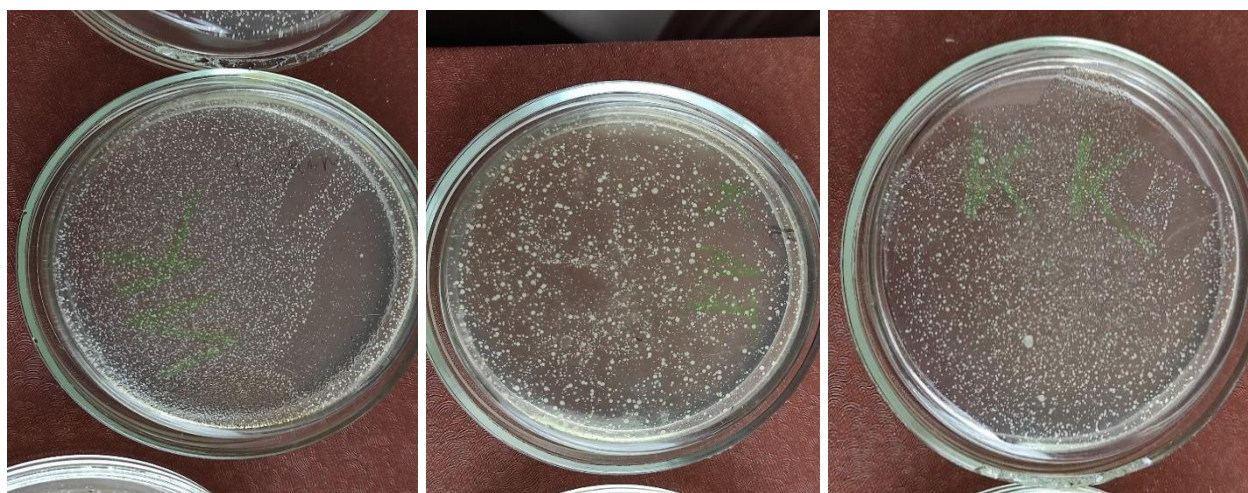
Приложение №1

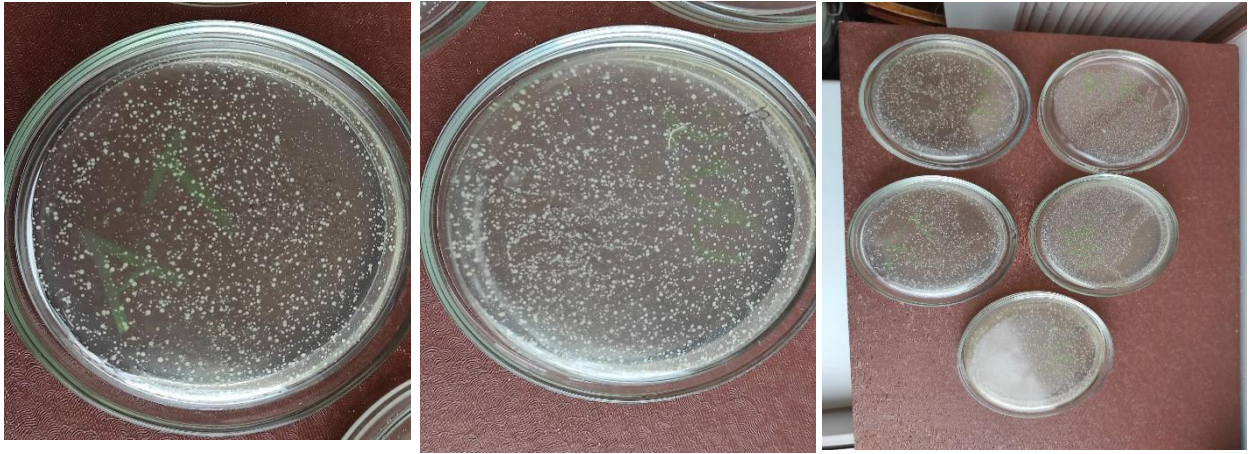


Марли со смывом в физрастворе



Колонии на питательной среде

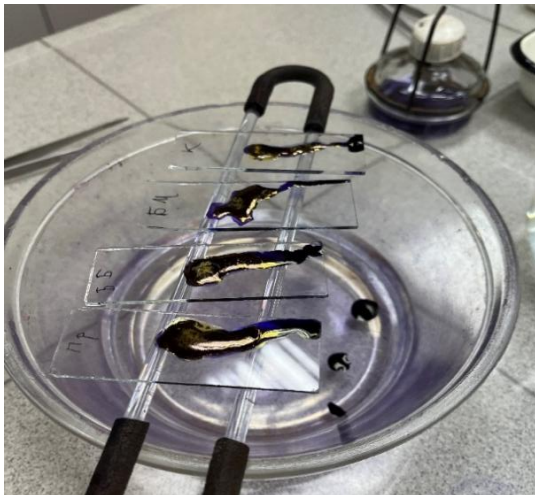




Приложение №2

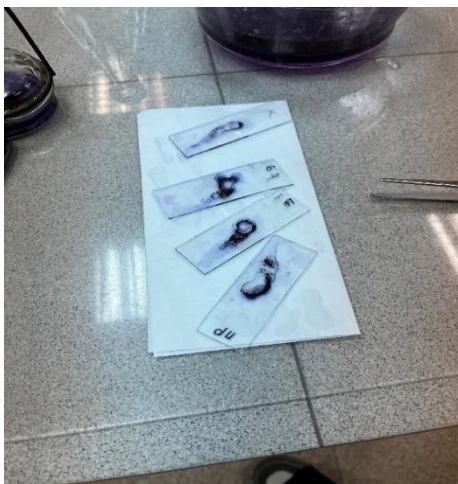


Рассматриваемые колонии в
физрастворе препарат в тенцианвиолете



Препарат в растворе Люголя
после заливки фуксином

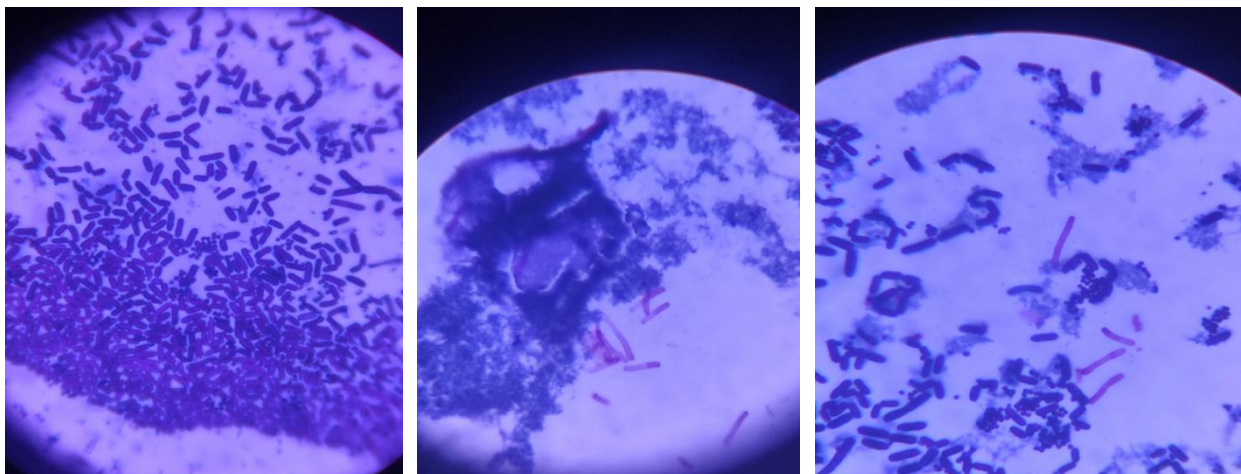
Мазок



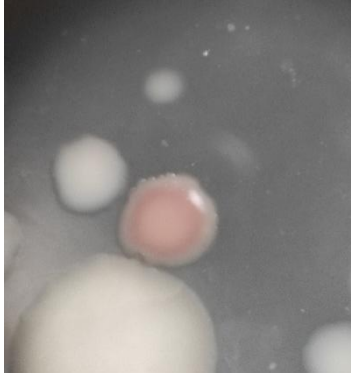
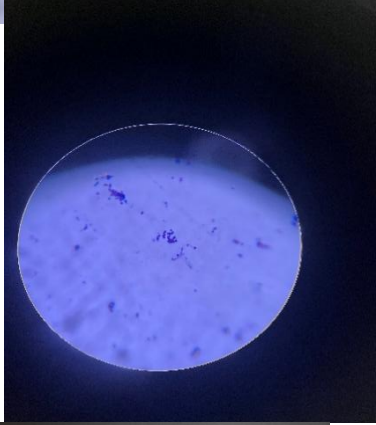
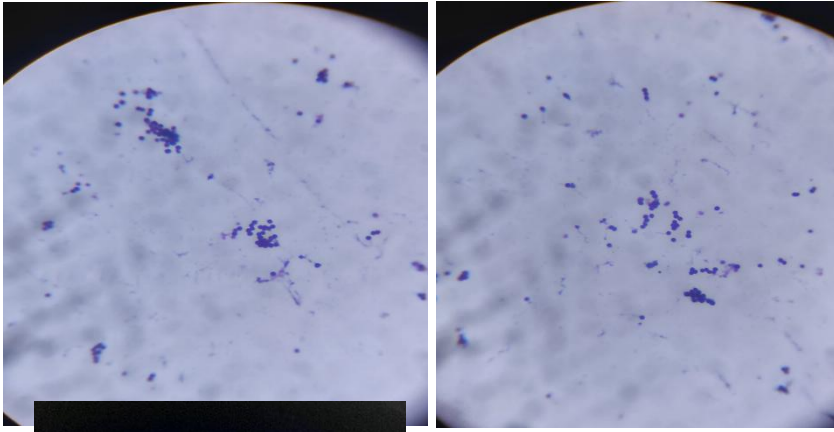
Препараты после промывки и просушки

Приложение №3

Прозрачные колонии

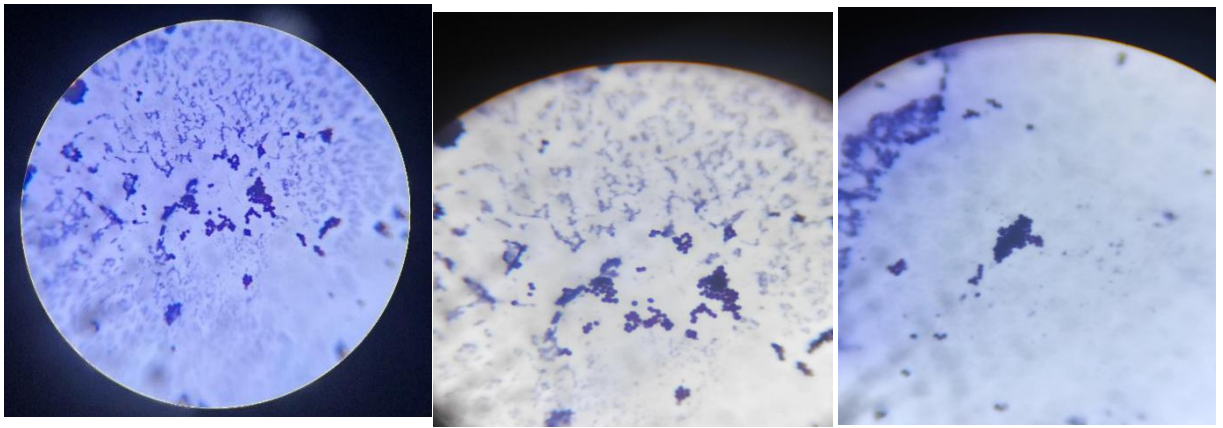


Коричневые колонии



Приложение №4

Большие белые колонии



Типичные колонии

