

Министерство образования и науки Российской Федерации  
Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова  
Кафедра ботаники и микробиологии

# **БИОИНДИКАЦИЯ. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭКОСИСТЕМ**

*Методические указания  
к лабораторным занятиям*

*Рекомендовано  
Научно-методическим советом университета для студентов,  
обучающихся по направлениям 020801.65 Экология,  
020800.62 Экология и природопользование,  
022000.62 Экология и природопользование*

Ярославль 2012

УДК 574:579(072)  
ББК Е081я73  
Б 63

*Рекомендовано  
Редакционно-издательским советом университета  
в качестве учебного издания. План 2012 года*

Рецензент кафедры ботаники и микробиологии  
Ярославского государственного университета им. П. Г. Демидова

Составитель Г. В. Кондакова

**Биоиндикация. Микробиологические методы исследования экосистем:** метод. указания к лабораторным занятиям / сост. Г. В. Кондакова; Яросл. гос. ун-т. – Ярославль : ЯрГУ, 2012. – 48 с.

В методических указаниях приведены описания лабораторных работ по курсам «Биоиндикация», «Биоиндикация и биотестирование», «Методы экологических исследований» (раздел «Микробиологические методы исследования экосистем»), направленных на формирование у студентов-экологов навыков применения микробиологических методов для диагностики и оценки состояния водных экосистем, почвы, различных объектов окружающей среды.

Предназначены для студентов, обучающихся по направлениям 022000.62 Экология и природопользование (дисциплина «Методы экологических исследований», цикл Б3); 020800.62 Экология и природопользование (дисциплина «Биоиндикация», блок СД); 020801.65 Экология (дисциплина «Биотестирование и биоиндикация», блок СД), очной, заочной форм обучения.

УДК 574:579(072)  
ББК Е081я73

© Ярославский государственный  
университет им. П. Г. Демидова, 2012

При проведении экологических исследований используют различные группы методов: биологические, физические и химические. К первой группе относится **метод биоиндикации**, который является способом решения задач биологического мониторинга.

**Биоиндикация** – оценка состояния различных объектов окружающей среды по наличию тех или иных индикаторных организмов с учетом их морфо-функциональных характеристик. Можно также дать следующее определение: **биоиндикация** – это определение биологически значимых нагрузок на основе реакций на них живых организмов и их сообществ [20].

**Индикаторные организмы** – биоиндикаторы (от греч. *bios* – жизнь и лат. *indicator* – указатель) – организмы или их сообщества, наличие и состояние которых служит показателем протекания в окружающей среде каких-либо процессов или наличия определенных загрязняющих веществ.

В настоящее время показано, что индикация загрязнения окружающей среды с использованием микроорганизмов в большинстве случаев превосходит по чувствительности многие химические и физические методы. Бактерии обладают чрезвычайно лабильной биохимической организацией клетки, благодаря чему они быстро адаптируются к изменениям условий среды обитания и появлению новых экологических факторов как природного, так и антропогенного происхождения [18]. Для микроорганизмов характерны прямые и специфические реакции, а также высокая чувствительность, поэтому при их использовании возможна ранняя индикация, что очень важно для решения проблем охраны окружающей среды.

Микробиологическими индикаторами антропогенного влияния на различные природные экосистемы могут выступать:

- изменение общей численности бактерий, численности различных эколого-трофических групп;
- смена морфологических форм;
- специфические функциональные (физиологические) группы микроорганизмов, по интенсивности развития которых можно судить о наличии определенных загрязняющих веществ и о процессах, происходящих в той или иной природной среде (микро-

организмы цикла азота, углеводородокисляющие бактерии, сульфатовосстанавливающие бактерии и др.);

- состав и структура микробных ценозов;
- группа санитарно-показательных микроорганизмов и др.

Цель настоящего лабораторного практикума заключается в освоении студентами-экологами микробиологических методов исследования, позволяющих дать оценку состояния водных экосистем, почвы, а также различных объектов окружающей среды.

### ***Требования к оформлению лабораторных занятий***

В лабораторном журнале по каждой лабораторной работе должны быть представлены следующие сведения:

1. Тема занятия.
2. Название лабораторной работы.
3. Теоретическая часть (кратко).
4. Цель и задачи работы.
5. Объект исследования и его характеристика.
6. Методы отбора проб.
7. Методика приготовления разведений и посева.
8. Полученные результаты (в виде расчетов и заполненных таблиц).
9. Выводы.

### **Тема 1. Оценка состояния водных экосистем**

При оценке состояния водоемов в зависимости от целей исследования можно изучать как бактериопланктон, так и бактериобентос. Критерии бактериопланктона, благодаря его высокой чувствительности и лабильности, позволяют в большей степени давать оценку качества толщи воды и наличия «острых» ситуаций на момент исследований в той части водотока, которая находится выше пункта взятия пробы. Бактериобентос дает информацию о хроническом влиянии на водоем бытового и промышленного загрязнения, так как именно в донных отложениях происходит концентрирование органических и неорганических загрязнителей, за счет чего в грунтах складывается особый ценоз микроорганизмов.

## 1.1. Лабораторная работа 1

### Оценка качества воды поверхностного водоема по показателям бактериопланктона

Поверхностные воды наиболее широко используются человеком, поэтому степень их загрязнения особенно высока. Важнейшим показателем качества воды является наличие или отсутствие в ней патогенных микроорганизмов. Однако определение патогенных бактерий представляет собой непростую и трудоемкую задачу, поэтому для определения степени загрязнения водоема при экологических исследованиях чаще используют некоторые косвенные показатели, например:

- численность копиотрофов;
- численность олиготрофов;
- анализ морфологических групп водных бактерий и др.

*Копиотрофы (евтрофы)*<sup>1</sup> – это микроорганизмы, которые нуждаются в относительно высоких концентрациях органического вещества. Для наименования этой группы также широко используется термин *сапротрофы*<sup>2</sup> (сапрофиты). В практике санитарно-микробиологических исследований данный показатель называется ОМЧ – общее микробное число [2].

Численность копиотрофных бактерий не нормируется в воде водоемов, поскольку уровень этой группы микроорганизмов в большей степени зависит от природных особенностей каждого объекта, времени года и т. п. Однако этот показатель позволяет получать информацию об источниках загрязнения, процессах самоочищения и косвенно характеризует санитарное состояние водоема. Численность данной группы служит надежным и высокочувствительным индикатором загрязнения воды легкоразлагаемыми органическими веществами, которые содержатся в хозяйственно-бытовых стоках, стоках предприятий пищевой промышленности и т. п. Обычно число копиотрофных микроорганизмов соответствует степени загрязненности воды органическими ве-

---

<sup>1</sup> *Копиотрофы* – от греч. *copiosus* – изобилие и *trophe* – пища, питание. *Евтрофы* – от греч. *eutrophia* – хорошее питание.

<sup>2</sup> *Сапротрофы* (от греч. *sapros* – гнилой и *trophe* – пища, питание) – гетеротрофные организмы, использующие для питания органические соединения мертвых тел или выделения (экскременты) других организмов.

ществами и используется при классификации качества воды, определении сапробности и категории трофности водоемов [1, 11].

Подсчет копиотрофов проводят путем высева проб воды на агаризованную питательную среду МПА (мясо-пептонный агар) или РПА (рыбо-пептонный агар). Среда РПА позволяет учесть особенности минерального состава природных вод [17].

Среды МПА и РПА содержат высокие концентрации органического вещества – более 4000 мг С/л. Однако содержание органического вещества в природных водах (1–15 мг С/л) намного ниже, чем в средах МПА и РПА. В связи с этим на таких питательных средах не вырастает большинство автохтонных водных микроорганизмов, которые являются *олиготрофами*<sup>3</sup>. Олиготрофы выигрывают конкуренцию при низком содержании органического вещества, поэтому для их учета используют обедненные органические среды МПА 1:10 (РПА 1:10), в которых концентрация углерода в 10 раз меньше, чем в стандартной среде МПА (РПА).

Копиотрофы и олиготрофы представляют собой две экологотрофические группы *гетеротрофных*<sup>4</sup> микроорганизмов и являются основными деструкторами органического вещества в водоемах. Их численность и соотношение позволяют оценить трофность водоема и могут служить индикаторами изменения его трофического состояния.

Дополнительную информацию о состоянии водоема дает анализ основных морфологических групп копиотрофов.

**Цель работы** – оценка качества воды поверхностного водоема по некоторым показателям бактериопланктона.

**Задачи:**

1. Определить численность копиотрофов в исследуемой пробе воды.
2. Определить численность олиготрофов в исследуемой пробе воды.
3. Провести анализ морфологических групп копиотрофов.

---

<sup>3</sup> *Олиготрофы* – от греч. *oligos* – малый и *trophe* – питание;

<sup>4</sup> *Гетеротрофные организмы* (от греч. *heteros* – другой и *trophe* – питание) – организмы, использующие в качестве источника углерода экзогенные органические соединения. Участвуют в минерализации органических соединений в биосфере.

4. Рассчитать индекс трофности воды в исследуемой точке.

5. На основании проведенных исследований оценить качество воды в исследуемой точке.

6. На основании результатов исследований, проведенных в разных точках, сделать обобщенный вывод о состоянии обследованного водоема.

Отбор проб воды для выполнения работы проводят в нескольких точках водоема, каждое звено студентов (3 – 4 человека) анализирует отдельную пробу. При обследовании реки точки отбора проб можно выбрать вдоль берега по течению на расстоянии не менее 500 м друг от друга или в местах наибольшего загрязнения. В последнем случае следует взять также контрольную точку в фоновом участке. Кроме того, можно изучать созданные специально в учебных целях модельные водоемы, которые заполнены водой и донными отложениями из природных водоемов, испытывающих ту или иную антропогенную нагрузку.

Для выполнения данной работы отводится два занятия. На первом занятии студенты делают все необходимые посевы (п. 1.1.1 и 1.1.2). На следующем обрабатывают результаты посевов: проводят подсчет численности копиотрофов и олиготрофов, рассчитывают индекс трофности, анализируют морфологические группы копиотрофов, делают вывод о состоянии обследованного водоема (п. 1.1.3–1.1.8).

## ***Порядок выполнения лабораторной работы***

### ***1.1.1. Приготовление разведений***

Численность гетеротрофных микроорганизмов в водоемах с неизвестной степенью загрязнения может быть достаточно велика, поэтому для получения на твердой питательной среде изолированных колоний необходимо перед посевом приготовить ряд последовательных десятикратных разведений проб воды. Серию разведений готовят в зависимости от предполагаемой степени загрязнения.

Разведения делают в стерильных пробирках, в которые заранее внесено по 9 мл стерильной дистиллированной воды. Стерильной пипеткой берут 1 мл исследуемой пробы воды и вносят в первую пробирку с 9 мл дистиллированной воды. Таким образом

получают первое разведение 1:10. Затем с помощью новой стерильной пипетки тщательно перемешивают содержимое пробирки, продувая воздух через пипетку, после чего этой же пипеткой берут 1 мл полученного разведения и переносят во вторую пробирку – это второе разведение 1:100 ( $1:10^2$ ). Аналогично получают третье разведение 1:1000 ( $1:10^3$ ) и т. д. (рис. 1).

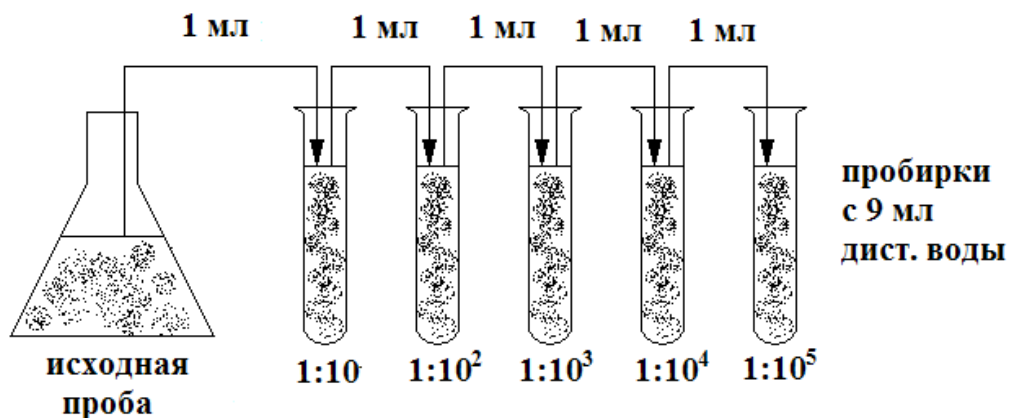


Рис. 1. Схема приготовления разведений проб воды

Для приготовления каждого разведения обязательно используют отдельную пипетку. Пренебрежение этим правилом может привести к получению ошибочного результата, иногда в 100 и более раз превышающего истинный. Часть клеток, оставшаяся на стенках пипетки, может попасть в одно из последующих разведений, что и станет причиной получения завышенного результата.

### 1.1.2. Посев на твердые питательные среды

Из исходной пробы воды, а также из каждого разведения производят посевы глубинным способом в чашки Петри на две среды: РПА и РПА 1:10. На каждой чашке заранее должно быть подписано название среды и номер разведения. Все посевы делают в двух повторностях. Для этого стерильной пипеткой отбирают 2–4 мл воды из исходной пробы и вносят по 0,5–1 мл (в зависимости от предполагаемой степени загрязнения) в четыре стерильные чашки Петри, слегка приоткрывая крышки. Затем заливают две чашки расплавленной и охлажденной до  $45^{\circ}\text{C}$  средой РПА и две чашки – средой РПА 1:10. Круговыми движениями по столу осторожно перемешивают посев со средой, равномерно распределяя по всему дну, избегая образования пузырьков воздуха и попадания агара на края и крышку чашки. Дают среде за-



стыть, переворачивают чашки вверх дном и инкубируют в термостате 5–7 суток при  $28^{\circ}\text{C}$ . Точно так же делают посеы из каждого разведения пробы.

Расход среды на одну чашку около 10–15 мл. Тонкий слой агара увеличивает эффективность учета копиотрофов за счет лучших условий для роста аэробных и факультативно анаэробных бактерий, преобладающих в водоемах. Колонии вырастают более крупные, легко подсчитываемые на фоне прозрачного тонкого слоя агара. Ограничен рост расплывчатых колоний.

### ***1.1.3. Подсчет колоний на чашках Петри***

По истечении времени инкубации достают чашки с посевами из термостата, группируют их по средам (РПА и РПА 1:10) и по разведениям (проба, 1:10, 1:100 и т. д.), рассматривают посеы.

Подсчитывают количество выросших колоний микроорганизмов на поверхности питательного агара на всех засеянных чашках Петри. В каждом разведении находят среднее значение числа колоний  $\bar{n}$  из двух повторностей  $n_1$  и  $n_2$ . Результаты подсчета колоний заносят в таблицу (табл. 1).

Таблица 1

### ***Подсчет числа колоний на чашках Петри***

Разведение ( r )	Среда			
	РПА		РПА 1:10	
исходная проба	$n_1$	$\bar{n}$	$n_1$	$\bar{n}$
	$n_2$		$n_2$	
в 10 раз (1:10)	$n_1$	$\bar{n}$	$n_1$	$\bar{n}$
	$n_2$		$n_2$	
в 100 раз (1:100)	$n_1$	$\bar{n}$	$n_1$	$\bar{n}$
	$n_2$		$n_2$	
и т. д.				

Если на чашках имеет место рост расплывчатых колоний, не распространившийся на всю поверхность, или выросло более 300 колоний, то поверхность чашки делят на секторы и подсчитывают колонии на одном секторе с последующим пересчетом на всю поверхность агаровой пластинки. В этих случаях в таблице отмечают «число колоний ориентировочно».

Если рост расплывчатых колоний распространился на всю поверхность чашки и подсчет невозможен, то в таблице отмечают «ползучий рост».

Если подсчет невозможен из-за слишком многочисленного роста, то в таблице записывают «сплошной рост».

#### ***1.1.4. Определение численности копиотрофов и олиготрофов***

Для определения численности копиотрофов в 1 мл воды используют среднее число колоний  $\bar{n}$ , выросших при посеве на среде РПА. Численность выражают в колониеобразующих единицах (КОЕ). При этом исходят из предположения, что отдельная микробная клетка является одной колониеобразующей единицей.

Оптимальным разведением считается то, при посеве из которого вырастает от 20 до 300 колоний на одной чашке. Если с увеличением разведения количество колоний закономерно уменьшается, то КОЕ действительно представлено одной клеткой и для расчета численности можно использовать то разведение, которое дает максимальное значение числа копиотрофов. Если эта закономерность нарушается, то нужно логическим путем установить причину (нестерильность посева, агрегированность бактериопланктона и т. п.) и взять то разведение, которое дает наиболее реальную картину.

Подсчет ведут по формуле:

$$N_{\text{РПА}} = (\bar{n} \pm m) \times r / V \text{ [КОЕ/мл]},$$

где  $N_{\text{РПА}}$  – численность копиотрофов, выросших на среде РПА;  $\bar{n}$  – среднее число колоний на чашках Петри, засеянных из одного разведения;  $r$  – разведение, из которого произведен посев;  $V$  – объем посевного материала, мл;  $m$  – стандартная ошибка (или ошибка средней арифметической) [8, 19].

Величину  $m$  рассчитывают по формуле:

$$m = \sqrt{\frac{\sigma^2}{x}},$$

где  $\sigma^2$  – стандартное или среднее квадратическое отклонение;  $x$  – число чашек Петри одного разведения, используемых в опыте.

Величину  $\sigma^2$  рассчитывают по формуле:

$$\sigma^2 = \frac{\sum (n - \bar{n})^2}{x - 1},$$

где  $n$  – число колоний, выросших на первой, второй и т. д. чашках, засеянных из одного разведения;  $\bar{n}$  – среднее их значение;  $x$  – число чашек Петри одного разведения, используемых в опыте.

Аналогично проводят подсчет численности олиготрофов  $N_{\text{РПА 1:10}}$ .

Для подсчета числа олиготрофов в 1 мл воды используют значения  $\bar{n}$ , полученные при посеве на среду РПА 1:10, результат также выражают в колониеобразующих единицах (КОЕ/мл).

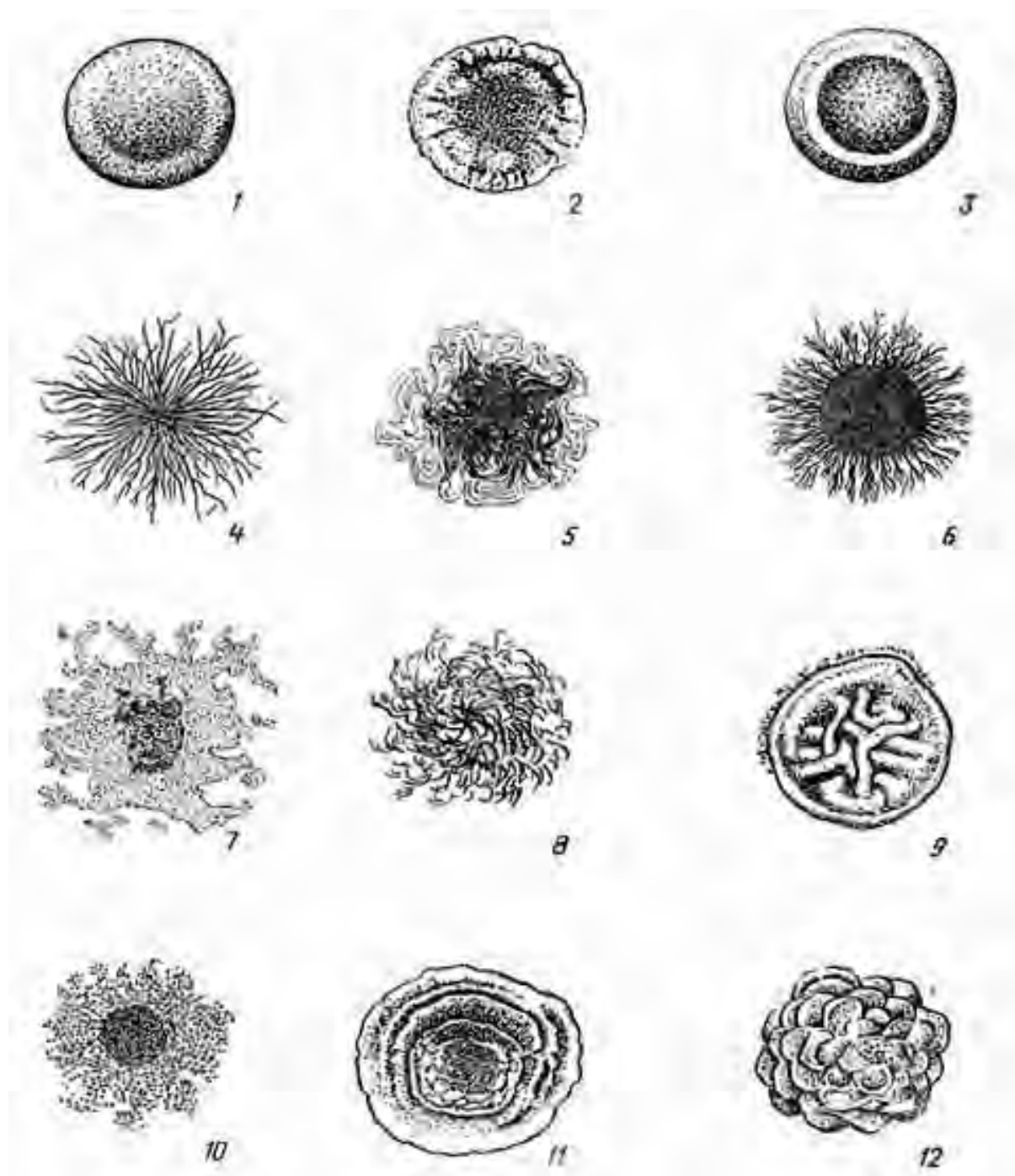
### ***1.1.5. Морфологическое описание колоний***

На поверхности питательной среды микроорганизмы могут расти в виде колоний, штриха или сплошного газона. Колонией называют изолированное скопление клеток одного вида, выросшее, в большинстве случаев, из одной клетки.

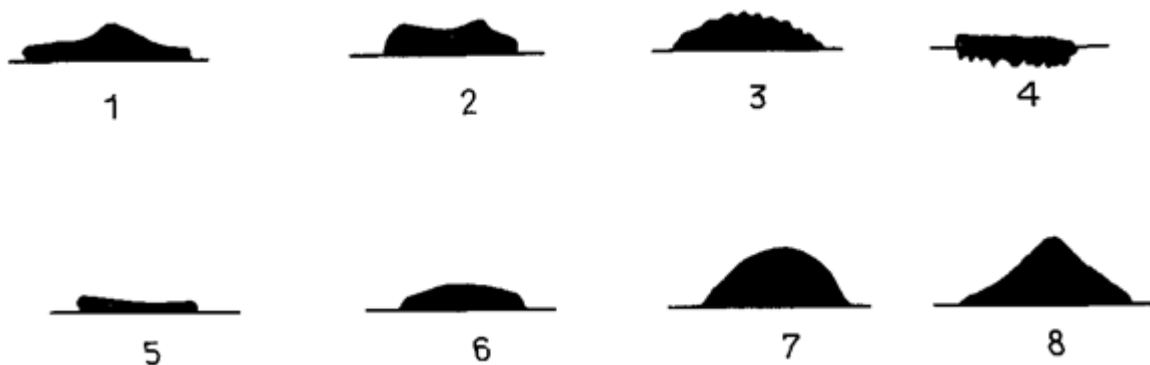
Колонии, выросшие на поверхности питательной среды, отличаются большим разнообразием. Словесное их описание проводят по следующей схеме:

- 1) *форма* – округлая, неправильная, ризоидная и т. д. (рис. 2);
- 2) *диаметр* – в мм. Если размеры колонии не превышают 1 мм, то их называют точечными;
- 3) *поверхность* – гладкая, шероховатая, бороздчатая, складчатая, морщинистая с концентрическими кругами;
- 4) *профиль* – плоский, выпуклый, кратерообразный, конусовидный и т. д. (рис. 3);
- 5) *блеск и прозрачность* – блестящая, матовая, тусклая, мучнистая, прозрачная;
- 6) *цвет* – бесцветная (грязно-белые колонии относят к бесцветным) или пигментированная – белая, желтая, золотистая, оранжевая, сиреневая, красная, черная. Особо отмечают выделение пигмента в субстрат;
- 7) *край колонии* – ровный (гладкий), волнистый, зубчатый, бахромчатый (лопастной, неправильный, реснитчатый, ворсинчатый), ветвистый и т. д. (рис. 4);
- 8) *консистенция* – плотная, мягкая, врастающая в агар, слизистая (прилипает к петле), тягучая, пленчатая (снимается цели-

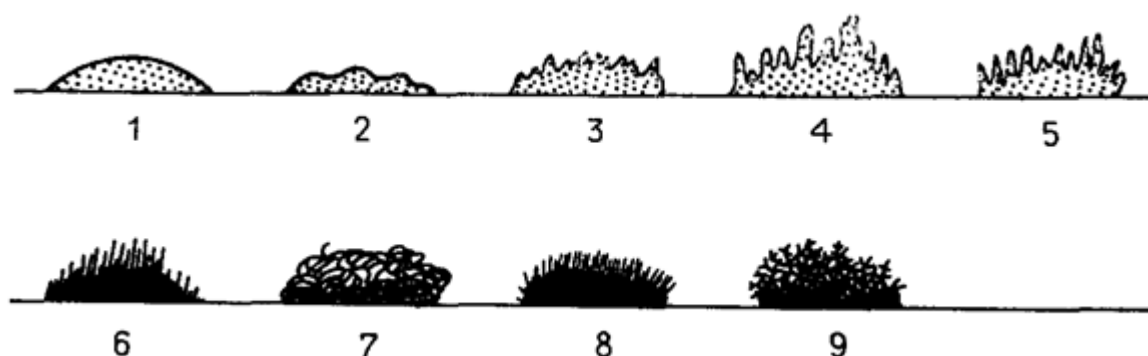
ком), хрупкая (легко ломается при прикосновении петлей). Консистенцию колонии определяют, прикасаясь к ее поверхности петлей.



*Рис. 2. Форма колоний: 1 – круглая; 2 – круглая с фестончатым краем; 3 – круглая с валиком по краю; 4, 5 – ризоидные; 6 – с ризоидным краем; 7 – амёбовидная; 8 – нитевидная; 9 – складчатая; 10 – неправильная; 11 – концентрическая; 12 – сложная*



*Рис. 3. Профиль колонии: 1 – изогнутый; 2 – кратерообразный; 3 – бугристый; 4 – врастающий в субстрат; 5 – плоский; 6 – выпуклый; 7 – каплевидный; 8 – конусовидный*



*Рис. 4. Край колонии: 1 – гладкий; 2 – волнистый; 3 – зубчатый; 4 – лопастной; 5 – неправильный; 6 – реснитчатый; 7 – нитчатый; 8 – ворсинчатый; 9 – ветвистый*

#### **1.1.6. Анализ основных морфологических групп копиотрофов**

Для анализа морфологических групп копиотрофных бактерий лучше всего использовать чашки с оптимальным числом колоний. Сначала на основании внешних различий выделяют основные морфологические типы колоний (см. п. 1.1.5), а затем проводят их микроскопирование. При микроскопировании определяют основные диагностические отличия микробных клеток: морфологию (кокки, палочки, вибрионы и т. п.), отношение к окраске по Граму (прил. 3), подвижность (прил. 4), наличие спор.

Результаты анализа основных морфотипов заносят в таблицу (табл. 2).

Обобщая полученные данные, подразделяют все морфологические типы на 4 основные группы и определяют долю каждого морфотипа: 1) кокки; 2) грамотрицательные неспорообразующие

палочки; 3) грамположительные неспорообразующие палочки; 4) грамположительные спорообразующие палочки.

Таблица 2

### ***Основные морфотипы копидотрофов***

<i>№ п/п</i>	<i>Внешний вид коло- нии</i>	<i>Морфоло- гическое описание колонии</i>	<i>Микро- скопиче- ская картина</i>	<i>Свойства бактериальных клеток</i>	<i>Чис- ло коло- ний</i>	<i>Доля морфо- типа, %</i>
1	рисунок колонии сверху и в профиль	по схеме п. 1.1.5	рисунок поля зрения микро- скопа	1) морфология 2) окраска по Граму 3) наличие спор 4) подвижность	$m_1$	$m_1 \times 100/M$
...					...	
i					$m_i$	
Итого					M	100

При интерпретации результатов можно ориентироваться на следующие показатели:

- в относительно чистых водах преобладают кокки (до 80% от общего количества гетеротрофных бактерий);
- при загрязнении возрастает доля спорообразующих и других палочковидных форм (до 80%), появляются в значительном количестве вибрионы (10% и более), удельный вес кокков резко падает (10% и менее);
- преобладание неспорообразующих палочковидных форм над спорообразующими говорит об усиленных процессах эвтрофикации<sup>5</sup> [5].

#### ***1.1.7. Определение индекса трофности***

Как уже было сказано, автохтонные микроорганизмы природных вод адаптированы к невысокому содержанию органического вещества и выделяются из воды преимущественно на средах с низкой его концентрацией. Поэтому изменение величины соотношения численности бактерий, растущих на обедненных

---

<sup>5</sup> *Эвтрофикация (евтрофикация)* – повышение интенсивности продуцирования органического вещества вследствие увеличения содержания в водоемах азота, фосфора и других биогенных элементов.

средах и стандартном МПА или РПА, может служить индикатором изменения трофического состояния водоема. Величину этого соотношения используют в качестве индекса трофности ( $I_T$ ):

$$I_T = N_{\text{РПА:10}} / N_{\text{РПА}},$$

где  $N_{\text{РПА}}$  – численность копиотрофных бактерий, выросших на РПА;  $N_{\text{РПА:10}}$  – численность олиготрофных бактерий, выросших на РПА:10.

Используя полученные значения по численности копиотрофных и олиготрофных бактерий, рассчитывают  $I_T$  для исследуемого участка водоема.

При оценке состояния водоема принимают во внимание, что в относительно бедных органическим веществом водах (мезотрофные и олиготрофные) наиболее благоприятные условия складываются для олиготрофных бактерий, поэтому  $I_T$  может достигать значений от 10 до нескольких сотен. В загрязненных и высокотрофных водах преобладают бактерии, использующие высокие концентрации органического вещества, в связи с чем  $I_T$  в таких водоемах составляет 2–3 и даже может снижаться до 1 [6].

#### **1.1.8. Обобщение полученных результатов**

Результаты, полученные всеми рабочими звеньями, заносят в итоговую таблицу (табл. 3).

Таблица 3

#### **Итоговая таблица по обследованному объекту**

№ точки, описание	Число копиотрофов, КОЕ/мл	Число олиготрофов, КОЕ/мл	$I_T$	Преобладающий морфотип, %	Класс (разряд качества) воды	Зона сапробности	Категория трофности
1							
...							

Пользуясь справочным материалом (прил. 6), определяют класс качества воды, категорию трофности и зону сапробности<sup>6</sup>

<sup>6</sup> *Сапробность* (от греч. *sapros* – гнилой) – степень загрязнения водоема. *Трофность* – характеристика водоёма по его биологической продуктивности, обусловленной содержанием биогенных элементов.

обследованного участка водоема. Полученные данные сопоставляют с результатами анализа основных морфологических групп сапротрофов, а также со значением индекса трофности и делают общий вывод о качестве воды обследованного участка.

На основании комплекса исследований, проведенных всеми рабочими звеньями, делают обобщенный вывод о состоянии водоема и протекании процессов самоочищения.

## ***1.2. Лабораторная работа 2***

### ***Оценка качества донных отложений водоема по показателям бактериобентоса***

Донные отложения (ДО) играют важную роль в круговороте вещества и энергии в водных экосистемах. Значительная доля органического вещества, образовавшегося в водоеме, и основная часть привнесенного с водосборной площади или поступившая со стоками не успевает разложиться в водной толще и осаждается на поверхности грунтов. Здесь в результате деятельности сообщества бентосных организмов происходит его деструкция. Ведущая роль в этом процессе принадлежит сложным бактериальным комплексам, состав которых зависит от типа водоема и ряда экологических условий [7]. При наличии кислорода в ДО преобладает аэробная минерализация органического вещества с образованием нейтральных биогенных веществ и поглощением свободного  $O_2$ . В бескислородных условиях происходит анаэробный распад с выделением восстановленных соединений: метана, сероводорода, аммиака и др. Изучение структуры и функционирования бактериобентоса и изменений, происходящих в нем под влиянием различного рода загрязнений, позволяет не только охарактеризовать процессы, происходящие в водоемах, но и оценить экологическое состояние водоема в целом.

К микробиологическим показателям, которые могут быть использованы для контроля качества ДО, относятся: общая численность бактериобентоса, численность аэробных сапротрофных бактерий, анаэробных бродильщиков, сульфатредукторов, соотношение аэробы/анаэробы и некоторые другие. Среди них наиболее значимыми при оценке качества ДО считаются общая численность бактериобентоса и численность аэробных сапротрофных бактерий [9]. Абсолютные показатели продукции и деструк-



ции ОВ не могут служить критериями загрязнения грунтов, они характеризуют состав, физиологическое состояние бактериобентоса и направленность микробиологических процессов [14].

**Цель работы** – оценка качества ДО водоема по некоторым показателям бактериобентоса.

**Задачи:**

1. Определить общую численность бактериобентоса в исследуемой пробе ДО.
2. Определить численность сапротрофов в исследуемой пробе ДО.
3. На основании проведенных исследований оценить качество ДО в исследуемой точке.
4. На основании результатов исследований, проведенных в разных точках, сделать обобщенный вывод о качестве ДО обследованного водоема.

Отбор проб ДО для выполнения работы можно провести в тех же точках водоема, где отбирались пробы воды (см. лаб. работу 1). Можно также изучать модельные водоемы. Каждое звено студентов (3–4 человека) анализирует отдельную пробу.

Для выполнения данной работы отводится два занятия. На первом занятии студенты делают все необходимые посеvy и готовят препараты для подсчета общей численности бактерий (п. 1.2.1–1.2.3). На следующем – проводят подсчет общей численности бактериобентоса, численности сапротрофов и оценивают качество ДО (п. 1.2.4–1.2.6).

Результаты необходимо сопоставить с результатами, полученными при исследовании проб воды.

### ***Порядок выполнения лабораторной работы***

#### ***1.2.1. Подготовка проб донных отложений для анализа***

Прежде чем приступить к анализу ДО, дают краткую их характеристику: указывают глубину взятия пробы, цвет, запах, тип ДО (песок, илистый песок, песчанистый ил, ил, глинистый ил и т. п.). Данные заносят в таблицу (табл. 5).

После этого приступают к подготовке пробы ДО для анализа. Важным этапом при подготовке к анализу образцов ДО является десорбция клеток бактериобентоса и их отделение от минераль-

ных частиц. Для этих целей используют микроизмельчитель тканей РТ-2 (гомогенизатор). Перед началом работы проводят стерилизацию тех частей прибора, которые будут соприкасаться с пробой ДО. Для этого на пинцет наматывают небольшой кусок ваты, полученный ватный тампон смачивают спиртом и протирают им роторный нож и металлический стакан прибора. Затем эти части гомогенизатора стерилизуют фламбированием<sup>7</sup> с помощью подожженного ватного тампона. Металлический стакан прибора при этом следует держать дном вверх, чтобы по мере исчерпания кислорода горение само прекратилось.

Стерильной пипеткой на 10 мл (с отбитым носом) отбирают некоторое количество ДО. Если необходимо отделить ДО от избытка воды, то их фильтруют через стерильный складчатый бумажный фильтр. Далее взвешивают 10 г ДО на технических весах, с использованием стерильного часового стекла. Взвешенный образец ДО заливают 100 мл стерильной водопроводной воды и обрабатывают на РТ-2 в течение 5 мин при 5000 об/мин. Обработанный образец фильтруют через стерильный складчатый бумажный фильтр, вставленный в стеклянную воронку и смоченный дистиллированной водой. Фильтрат собирают в стерильную пустую колбу. Фильтрацию проводят для окончательного отделения клеток от минеральных частиц. Подготовленная таким образом проба ДО представляет собой разведенный в 10 раз (1:10) исходный образец ДО. Ее используют для дальнейшего микробиологического анализа.

При отсутствии прибора можно применять растирание образца ДО в стерильной ступке в течение 5 мин пальцем в резиновой перчатке, соблюдая все правила работы в стерильных условиях.

### ***1.2.2. Приготовление препаратов для определения общей численности бактерий методом прямого счета (метод Виноградского – Брида)***

Метод сводится к тому, что в определенном объеме исследуемого образца непосредственно под микроскопом подсчиты-

---

<sup>7</sup> Фламбирование (франц. *flamber* – опаливать, прокаливать) – обработка поверхности пламенем; применяется для стерилизации различных предметов.

вают количество клеток микроорганизмов [16]. Для этого готовят фиксированные препараты.

*Приготовление препарата.* Хорошо обезжиривают предметное стекло и парафиновым карандашом по стеклу рисуют на нем квадрат размером 20×20 мм. Затем стерильной пипеткой на 0,1 мл наносят внутрь квадрата точно измеренный объем подготовленной пробы ДО (обычно от 0,02 до 0,05 мл) и каплю 0,03 – 0,1% водного раствора агара. Микробиологической петлей распределяют каплю по всей площади квадрата. Мазок высушивают на воздухе. После высыхания препарат фиксируют 20–30 мин в 96%-м спирте или в пламени спиртовки и окрашивают фуксином в течение 1–3 мин (прил. 2). Окрашенные препараты сохраняют до следующего занятия.

Поскольку в процессе приготовления препарата могут произойти ошибки различного характера (слишком мало или много клеток на препарате, плохая фиксация, слабая окраска и др.), рекомендуется приготовить сразу несколько препаратов (минимум два), используя разные объемы пробы.

### ***1.2.3. Посев на среду РПА для количественного учета аэробных сапротрофных бактерий***

Перед посевом из подготовленной пробы ДО готовят серию десятикратных разведений до получения конечного разведения  $1:10^4$  (четвертое) или  $1:10^5$  (пятое). Разведения готовят по методике, описанной в п. 1.1.1.

Производят посев из каждого разведения глубинным способом на среду РПА в двух повторностях (см. п. 1.1.2). Чашки с посевами инкубируют в термостате 5 – 7 суток при  $28^{\circ}\text{C}$ .

### ***1.2.4. Подсчет колоний на чашках Петри и определение численности сапротрофных бактерий***

Подсчет колоний на чашках Петри и определение численности сапротрофных бактерий ( $N_c$ , КОЕ/г ДО) проводят точно так же, как и при анализе проб воды (см. п. 1.1.3 и 1.1.4).

### ***1.2.5. Определение общей численности бактериобентоса***

Для определения общей численности бактериобентоса используют окрашенные препараты, подготовленные на предыдущем занятии (см. п. 1.2.2).

Подсчет количества клеток проводят при максимальном увеличении микроскопа, используя масляную иммерсию. Для облегчения процесса подсчета в окуляр микроскопа вставляют окулярную сетку и проводят подсчет клеток в квадратах окулярной сетки. При отсутствии сетки проводят подсчет клеток непосредственно в полях зрения микроскопа. Просчитывают 50 – 100 квадратов сетки (не менее 10 полей зрения). В процессе подсчета клеток препарат передвигают по диагонали. Если подсчет ведут в квадратах сетки, то учитывают также клетки, пересекающие верхнюю и правую стороны квадрата. Для получения достоверного результата общее число подсчитанных клеток должно быть не менее 600. Результаты подсчета заносят в табл. 4.

Пересчет среднего количества клеток в квадрате сетки (поле зрения) на содержание бактерий в 1 г ДО ( $N_{б.общ.}$ ) проводят по формуле:

$$N_{б.общ.} = \frac{(\bar{n} \pm m) \cdot S \cdot r}{s \cdot V} \text{ [кл / г ДО]},$$

где  $S$  – площадь окрашенного на стекле препарата,  $\text{мкм}^2$  ( $4 \cdot 10^8$ );  $r$  – разведение, из которого был сделан препарат (10);  $s$  – площадь квадрата окулярной сетки (поля зрения),  $\text{мкм}^2$ ;  $V$  – объем пробы, затраченный на приготовление окрашенного препарата, мл;  $m$  – стандартная ошибка.

Таблица 4

### ***Результаты прямого счета клеток бактерий***

№ квадрата сетки (поля зрения)	Количество микробных клеток ( $n_i$ )
1	$n_1$
2	$n_2$
...	...
$i$	$n_i$
Итого:	$\sum n_i$
Среднее количество клеток ( $\bar{n}$ )	$\sum n_i / i$

Площадь квадрата окулярной сетки или поля зрения определяют с помощью объект-микрометра. Его помещают вместо препарата на предметный столик и при том же увеличении, при котором проводили подсчет клеток, определяют размер стороны

квадрата окулярной сетки или диаметр поля зрения (прил. 5). Зная сторону квадрата сетки, вычисляют площадь поля зрения  $s$  по формуле  $s = \pi r^2$ .

Стандартную ошибку определяют точно так же, как указано в п. 1.1.4.

### ***1.2.6. Анализ и обобщение полученных результатов***

На основании полученных результатов по определению общей численности бактериобентоса и численности сапротрофных бактерий определяют класс качества исследуемых ДО, пользуясь справочным материалом (прил. 7). Результаты, полученные всеми рабочими звеньями, заносят в итоговую таблицу (табл. 5).

Таблица 5

#### ***Итоговая таблица по обследованному объекту***

№ точки	Описание ДО	N <sub>б.общ</sub> , кл/г	N <sub>с</sub> , КОЕ/г	Класс качества ДО
1				
...				
...				

Полученные данные сопоставляют с результатами анализа проб воды. На основании комплекса проведенных исследований делают обобщенный вывод о состоянии водоема и процессах самоочищения.

## **Тема 2. Оценка состояния почв**

Практически все виды человеческой деятельности сопровождаются нарушением состояния окружающей среды, в том числе и почв. Основные нарушения почвенного покрова связаны с физическим, химическим и биологическим видами антропогенного воздействия. При процессах трансформации загрязняющих веществ в ходе самоочищения в почве могут образовываться не только безвредные вещества, но и еще более токсичные соединения, нежели попавшие в нее. Существенным может оказаться и комбинированное действие токсикантов, причем вещества могут вести себя и как синергисты, и как антагонисты. Изменения, происходящие в почве под влиянием различного рода загрязнений, могут повлечь за собой потерю почвенного плодородия и приобретение токсических для живых организмов свойств.

Все виды воздействий в первую очередь сказываются на микронаселении почв как наиболее чувствительном и быстро реагирующем компоненте любой экосистемы. Большинство загрязнителей влияют на численность, видовой состав и жизнедеятельность почвенной микробиоты. Они ингибируют процессы минерализации и синтеза различных веществ в почве, подавляют дыхание почвенных микроорганизмов, вызывают микробостатический эффект. Наиболее изученной к настоящему времени является реакция на загрязнение бактерий и микроскопических грибов, поэтому их чаще всего используют в качестве биоиндикаторов при мониторинге почв.

### **2.1. Лабораторная работа 3** **Оценка качества почв с помощью бактерий** **рода *Azotobacter***

Одним из индикаторов состояния почв является присутствие в них азотфиксирующих бактерий, уровень жизнедеятельности которых служит объективным показателем плодородия почвы. Свободноживущие азотфиксаторы рода *Azotobacter* предпочитают гумусированные почвы с нейтральной реакцией среды, богатые доступными соединениями фосфора и достаточным количеством органического вещества и влаги. Химическое загрязнение

ведет к снижению плодородия почв и, следовательно, к снижению численности и даже полному исчезновению бактерий этого рода. В связи с этим бактерии рода *Azotobacter* традиционно применяются как индикаторы химического загрязнения почвы.

В данной работе используется метод оценки биологической токсичности почвы по некоторым параметрам роста бактерий рода *Azotobacter*: их численности, среднему диаметру колоний и коэффициенту влияния ( $K_B$ ) [10, 15]. К достоинствам метода относятся простота и доступность, кроме того, он позволяет быстро дать ориентировочную оценку биологической токсичности исследуемых субстратов.

**Цель работы** – оценка биологической токсичности почв по некоторым показателям роста бактерий р. *Azotobacter*.

**Задачи:**

1. Определить численность бактерий р. *Azotobacter* в исследуемых образцах почв.
2. Определить средний диаметр колоний бактерий р. *Azotobacter*, выросших в посевах из разных образцов почв.
3. Рассчитать коэффициент влияния для исследуемых образцов почв.
4. На основании проведенных исследований оценить качество исследуемых почв и распределить их по мере возрастания токсичности.

Каждое звено студентов (3–4 человека) анализирует отдельный образец почвы, среди которых один образец – контрольный. Для выполнения данной работы отводится два занятия. На первом занятии студенты делают все необходимые посева (п. 2.1.1 и 2.1.2). На следующем – обрабатывают результаты посевов: проводят подсчет численности бактерий р. *Azotobacter*, определяют средний диаметр колоний, рассчитывают коэффициент влияния, делают вывод о качестве исследованных почв (п. 2.1.3–2.1.5).

### **Порядок выполнения лабораторной работы**

#### **2.1.1. Приготовление почвенной суспензии и разведений**

Для количественного учета бактерий р. *Azotobacter* применяют посев на твердую питательную среду из предварительно приготовленной почвенной суспензии. Поступают следующим образом.

Исследуемую почву помещают на часовое стекло, предварительно стерилизованное горящим спиртом. Стерильным пинцетом удаляют камни и растительные остатки. После этого взвешивают на технических весах 10 г почвы и переносят ее в стерильную ступку.

Для диспергирования почвенных агрегатов и десорбции клеток микроорганизмов с поверхности почвенных частиц почву подвергают специальной обработке. Берут две стерильные колбы емкостью 250 мл: одну со 100 мл водопроводной воды, другую – пустую. Подготовленную навеску почвы увлажняют до пастообразного состояния небольшим количеством стерильной воды из первой колбы и растирают 5 мин стерильным резиновым пестиком или пальцем в резиновой перчатке, соблюдая все правила работы в стерильных условиях.

Полученную кашицеобразную почвенную массу количественно переносят в пустую стерильную колбу, многократно смывая остатки почвы со стенок ступки стерильной водой из первой колбы. Затем колбу с почвенной суспензией ставят на качалку и встряхивают в течение 10 мин. После этого суспензии дают отстояться 15 мин, чтобы осели крупные частицы, и сразу же используют для приготовления разведений (рис. 5).

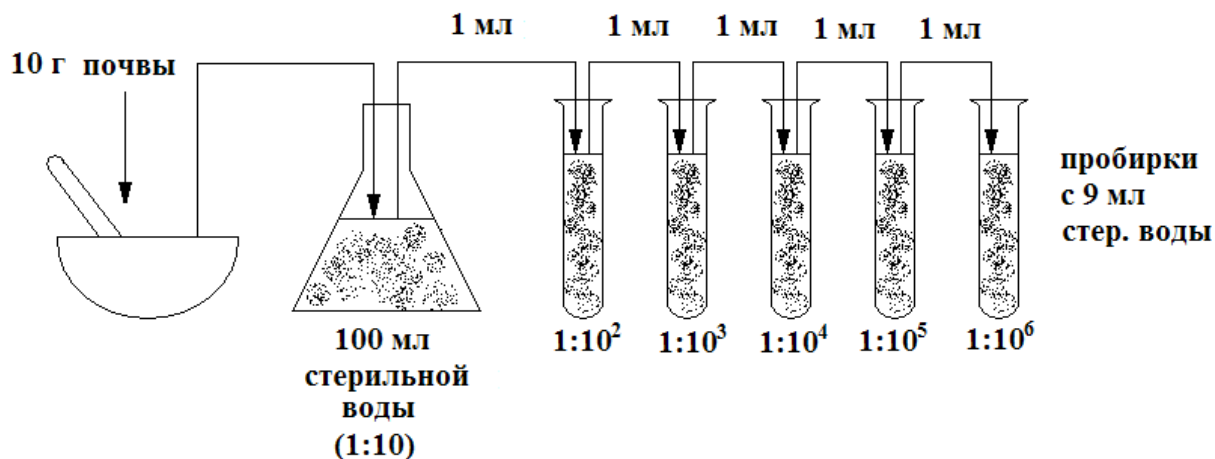


Рис. 5. Приготовление разведений почвенного образца

При этом учитывают, что в полученной суспензии почва разведена в 10 раз (10:100 или 1:10). Последующие разведения готовят так же, как описано в п. 1.1.1.



### **2.1.2. Посев на питательную среду**

#### **для количественного учета бактерий рода *Azotobacter***

Для определения численности бактерий рода *Azotobacter* производят посев в чашки Петри на среду Эшби. Стерильные чашки заливают расплавленной и охлажденной до 45° С средой, слегка приоткрывая крышки. Расход среды на каждую чашку около 10–15 мл. Дают среде застыть, после чего стерильной пипеткой вносят 0,1–0,2 мл жидкости на поверхность твердой среды в середину чашки и растирают каплю стерильным шпателем Дригальского. Следует работать очень аккуратно, чтобы не повредить поверхность среды. Посевы делают из каждого разведения в двух повторностях. Чашки с посевами инкубируют в термостате 5–7 суток при 28° С.

### **2.1.3. Анализ выросших колоний**

На среде Эшби бактерии рода *Azotobacter* растут в виде плоских слизистых колоний пастообразной консистенции. Характерно также пигментирование, колонии представителей рода могут быть окрашены в тёмно-коричневый, зелёный и другие цвета или же могут быть бесцветными в зависимости от видовой принадлежности.

Проводят микроскопирование нескольких таких колоний, для чего готовят препараты-мазки (прил. 2, 3).

Клетки бактерий рода *Azotobacter* относительно крупные (1–2 мкм в диаметре), обычно овальные, но обладают плеоморфизмом, то есть могут иметь разную форму – от палочковидной до сферической. На микроскопических препаратах клетки могут располагаться одиночно, парами, неправильными скоплениями или, изредка, цепочками различной длины. Грамотрицательные. Формируют особые покоящиеся формы – цисты, не образуют спор. В свежих культурах клетки подвижны за счёт многочисленных жгутиков. В более поздних культурах клетки теряют подвижность, приобретают почти кокковидную форму и продуцируют толстый слой слизи, формирующий капсулу клетки.

Подсчет типичных колоний и определение численности бактерий рода *Azotobacter* проводят точно так же, как определение численности копиотрофов при анализе проб воды. Результаты подсчета колоний заносят в таблицу, аналогичную табл. 1 (см.

п. 1.1.3). Для определения числа клеток в 1 г почвы ( $N_{Az}$ , КОЕ/г почвы) проводят расчеты в соответствии с п. 1.1.4.

После подсчета колоний измеряют их диаметр. Для этого берут чашки с оптимальным числом колоний, которые использовали для определения численности бактерий рода *Azotobacter*. Если какая-либо колония имеет неправильную форму, то рассчитывают среднее значение ее диаметра из нескольких измерений. Результаты измерений заносят в таблицу (табл. 6).

Таблица 6

**Результаты измерений диаметра колоний  
бактерий р. *Azotobacter***

№ колонии	диаметр ( $d_i$ )
1	$d_1$
2	$d_2$
...	...
i	$d_i$
Итого:	$\sum d_i$

После измерения диаметров всех колоний находят среднее значение диаметров ( $D_{cp}$ ) по формуле:

$$D_{cp} = ( \sum d_i / i ) \pm m \text{ [мм]},$$

где  $\sum d_i$  – сумма диаметров всех колоний,  $i$  – количество колоний,  $m$  – стандартная ошибка.

Стандартную ошибку определяют точно так же, как указано в п. 1.1.4.

**2.1.4. Определение коэффициента влияния**

Степень влияния изучаемого образца почвы на скорость роста колоний бактерий рода *Azotobacter* оценивают по отношению среднего значения диаметров колоний в опытных вариантах к среднему значению диаметров колоний в контроле:

$$K_B = D_{оп} / D_{контр} ,$$

где  $K_B$  – коэффициент влияния;  $D_{оп}$  – среднее значение диаметров колоний в опытном образце почвы;  $D_{контр}$  – среднее значение диаметров колоний в контрольном образце.

Если  $K=1$ , то изучаемый опытный образец почвы не оказывает влияния на скорость роста колоний тест-организма по сравнению с контрольным образцом. Если  $K < 1$  – действие ингибирующее, при  $K > 1$  наблюдается стимуляция. Сопоставляя коэффициенты влияния различных почвенных образцов, можно получить данные об их сравнительной токсичности.

### 2.1.5. Обобщение полученных результатов

Все результаты заносят в таблицу (табл. 7).

Таблица 7

#### **Некоторые показатели роста и развития бактерий *p. Azotobacter* в анализируемых почвенных образцах**

№ почвенного образца	$D_{cp}$ колоний, мм	$N_{Az}$ , КОЕ/г почвы	$K_B$
1			
...			
i			

На основании полученных результатов по изучению популяции *Azotobacter* определить, какой из почвенных образцов обладает наибольшей биологической токсичностью. Установить, имеются ли среди изученных почв такие, которые снижают показатели роста и развития на 50% ( $LD_{50}$ )<sup>8</sup> и которые обладают биоцидными<sup>9</sup> свойствами ( $LD_{100}$ ).

## **Тема 3. Оценка состояния окружающей среды с помощью санитарно-показательных микроорганизмов**

К санитарно-показательным микроорганизмам относят представителей облигатной микробиоты человека и животных, обитающих в кишечнике или респираторном тракте. С экскретами

<sup>8</sup> *Летальная доза* (от лат. *letal* – смертельный) – доза какого-либо химического или физического агента, воздействие которой на живой организм приводит к смертельному исходу.  $LD_{50}$  – полумлетальная (средняя летальная) доза. Один из наиболее широко применяемых показателей опасности токсичных веществ.

<sup>9</sup> *Биоцидный* (от греч. *bios* – жизнь и лат. *caedo* – убиваю) – уничтожающий все живое.

организма они попадают во внешнюю среду, где определенное время сохраняют жизнеспособность. Обнаружение санитарно-показательных микроорганизмов в окружающей среде косвенно указывает на возможное присутствие патогенных микробов, выделяющихся из организма теми же путями. Таким образом, санитарно-показательные микроорганизмы являются не только индикаторами загрязнения окружающей среды выделениями человека и животных, но и показателем ее эпидемической опасности (безопасности).

Определение санитарно-показательных микроорганизмов может проводиться *качественно* и *количественно*. *Качественная* оценка подразумевает определение наличия или отсутствия санитарно-показательных микроорганизмов. Подобные исследования проводят, когда объекты вообще не должны содержать данные микроорганизмы и когда необходим ориентировочный анализ. При *количественной* оценке выявляют степень обсеменения санитарно-показательными микроорганизмами, сравнивают ее с установленными нормативами и на основании этого дают заключение об эпидемической опасности (безопасности) исследуемого объекта [12, 13].

### *3.1. Лабораторная работа 4*

#### ***Оценка санитарно-гигиенического состояния объектов рабочей зоны***

Объекты рабочей зоны подвергают санитарно-микробиологическому обследованию, поскольку

1) их микробное обсеменение четко отражает гигиеническое состояние среды, непосредственно окружающей человека в течение рабочего дня;

2) такие объекты могут служить посредниками при передаче возбудителей многих инфекционных заболеваний.

Важнейшим источником микробного обсеменения таких объектов является человек. Большое количество разнообразных микроорганизмов попадает на них также из воздуха, возможно загрязнение насекомыми и т. п.

При санитарно-микробиологическом обследовании объектов рабочей зоны обычно устанавливают присутствие и количество санитарно-показательных микроорганизмов – индикаторов того

или иного вида загрязнения, тогда как их общее микробное обсеменение может представлять интерес лишь в немногих случаях.

**Цель работы** – оценка санитарно-гигиенического состояния различных объектов в учебных лабораториях и вспомогательных помещениях с помощью санитарно-показательных микроорганизмов.

**Задачи:**

1. Определить присутствие в исследуемом объекте санитарно-показательных микроорганизмов – индикаторов воздушно-капельного загрязнения окружающей среды.

2. Определить присутствие в исследуемом объекте санитарно-показательных микроорганизмов – индикаторов фекального загрязнения окружающей среды.

3. Определить присутствие в исследуемом объекте санитарно-показательных микроорганизмов – индикаторов загрязнения окружающей среды разлагающимися органическими веществами.

4. На основании проведенных исследований дать предварительную санитарно-гигиеническую оценку исследуемого объекта.

Для выполнения данной работы отводится два занятия. На первом занятии студенты проводят отбор проб и делают все необходимые посевы (п. 3.1.1–3.1.2). На следующем – проводят анализ посевов и оценивают санитарно-гигиеническое состояние исследуемых объектов (п. 3.1.3–3.1.4).

## ***Порядок выполнения лабораторной работы***

### ***3.1.1. Методы отбора проб***

Наиболее простыми и удобными методами отбора проб с поверхностей являются метод смывов и метод отпечатков.

#### ***Метод смывов***

Смывы производят с различных поверхностей увлажненными стерильными ватными тампонами, которые закреплены на стеклянных или металлических палочках и вмонтированы в пробирки с ватно-марлевыми пробками.

В пробирки наливают 5 мл стерильной воды (9%-го раствора NaCl или 1%-й пептонной воды) и закрывают пробками таким образом, чтобы тампоны не касались жидкости. Непосредственно перед взятием смыва тампон опускают в жидкость для увлажне-

ния. В процессе отбора смывов рекомендуется неоднократное смачивание тампонов.

С крупных предметов смывы берут по возможности в нескольких местах с общей площади не менее  $100\text{ см}^2$ , тщательно протирая поверхность. Небольшие объекты протирают со всех сторон. При обследовании столовых приборов смывы берут со всей поверхности трех однотипных предметов. У тарелок протирают всю внутреннюю поверхность; у вилок, ложек, ножей протирают всю рабочую поверхность и наружный край высотой 2 см. При взятии смывов с рук увлажненным тампоном проводят по 5 штрихов по ладонным поверхностям обеих рук, включая пальцы. Затем этим же тампоном протирают межпальцевые промежутки, ногти и подногтевые пространства. После отбора проб тампон помещают в ту же пробирку, тщательно встряхивают и доставляют в лабораторию. В лаборатории проводят посевы на различные дифференциально-диагностические среды для обнаружения санитарно-показательных микроорганизмов.

#### ***Метод отпечатков***

Применяется для определения биологической контаминации ровной гладкой поверхности (как горизонтальной, так и вертикальной). Наиболее удобными для этих целей являются бакпечатки промышленного производства. При проведении исследования бакпечатку с требуемой плотной диагностической средой извлекают из контейнера, прикладывают поверхностью среды к исследуемому объекту и вновь вставляют в контейнер. При отборе проб с помощью этого метода никаких дополнительных посевов проводить не требуется. Использованные бакпечатки помещают в термостат. Время и температура инкубации зависит от того, присутствие какого санитарно-показательного микроорганизма требуется установить.

#### ***3.1.2. Посевы на дифференциально-диагностические среды для обнаружения санитарно-показательных микроорганизмов***

Посевы выполняют для обнаружения трех групп санитарно-показательных микроорганизмов: индикаторов воздушно-капельного, фекального загрязнения и загрязнения разлагающимися органическими веществами.

Индикатором воздушно-капельного загрязнения объектов окружающей среды является золотистый стафилококк – *Staphylococcus aureus*, который относится к факультативным, но очень часто обнаруживаемым обитателям организма человека и некоторых теплокровных животных. Основным местом его локализации в организме человека служат слизистые оболочки верхних дыхательных путей. Для его обнаружения проводят посев отобранной пробы на дифференциально-диагностическую среду ЖСА – желточно-солевой агар.

Индикатором фекального загрязнения являются бактерии группы кишечных палочек (БГКП) или, в соответствии с международной номенклатурой, колиформные бактерии (*Coliformes* – ФАО/ВОЗ и СЭВ). Среди колиформных бактерий различают *общие колиформные бактерии* (ОКБ) и *термотолерантные колиформные бактерии* (ТКБ) [3]. ТКБ иначе еще называют фекальными кишечными палочками (ФКП). К этой группе относится *Escherichia coli* – типичный обитатель кишечника человека и теплокровных животных. Именно ее присутствие в объектах окружающей среды служит показателем свежего фекального загрязнения. Дифференциально-диагностической средой для обнаружения *E. coli* является среда КОДА с лактозой. Среда ингибирует рост стафилококка и протей.

Индикатором загрязнения объектов окружающей среды разлагающимися органическими веществами является *Proteus vulgaris*. Обнаружение большого количества бактерий вида *P. vulgaris* в объектах внешней среды свидетельствует о развитии в них гнилостных процессов. Для обнаружения протей используют среду МПА, при этом видовое определение не проводят.

### ***Посев на среду ЖСА***

Посев проводят в чашки Петри, которые заранее заливают средой ЖСА. Палочку с влажным ватным тампоном извлекают из пробирки со смывом и проводят посев штрихом, совершая зигзагообразные движения тампоном по поверхности среды ЖСА. Чашки с посевами выдерживают в термостате при 37°С в течение двух суток.

### ***Посев на среду КОДА***

Посев проводят в пробирки с 10 мл среды КОДА. Для этого ватный тампон, с помощью которого производили смыв, сбрасывают с палочки, на которой он крепился, в пробирку со средой КОДА так, чтобы тампон оказался полностью погруженным в среду. Пробирку закрывают ватно-марлевой пробкой и выдерживают в термостате при 43°C в течение суток.

### ***Посев на среду МПА***

Присутствие протей определяют по методу Шукевича, посев проводят в пробирки со скошенной средой МПА. Для этого 0,1 мл жидкости смыва вносят в конденсационную воду скошенного МПА. Конденсационной водой называется вода, которая скапливается в пробирке в нижней части скошенной питательной среды. Следует работать очень аккуратно, чтобы посевной материал не попал на поверхность среды. Пробирки инкубируют в термостате при 37°C в течение суток.

#### ***3.1.3. Анализ посевов***

При анализе посевов все особенности роста обнаруженных санитарно-показательных микроорганизмов фиксируют в рабочем журнале, заполняя таблицу 8.

Таблица 8

#### ***Характеристика санитарно-показательных микроорганизмов***

<i>Объект исследования</i>	<i>Санитарно-показательные микроорганизмы</i>	<i>Дифференциально-диагностическая среда</i>	<i>Наличие роста</i>	<i>Макроскопическая картина</i>	<i>Микроскопическая картина</i>
	1.		«+» или «-»	Рисунок картины роста и описание характера роста на дифференциально-диагностической среде	Рисунок поля зрения микроскопа и описание свойств бактериальных клеток: 1) морфология; 2) окраска по Граму; 3) наличие спор; 4) подвижность.
	2.				
	3.				



### **Обнаружение золотистого стафилококка – *Staphylococcus aureus***

Проводят просмотр чашек, засеянных на предыдущем занятии. На ЖСА золотистый стафилококк, выделенный от человека, растет в виде круглых блестящих колоний золотистого цвета, вокруг которых в 60–70% случаев образуется радужный венчик и зона помутнения среды. Одну из таких колоний микроскопируют. Для этого готовят мазок, который окрашивают по Граму (прил. 3). Под микроскопом клетки *S. aureus* имеют вид грамположительных кокков, располагающихся неправильными гроздьями и не образующих спор и капсул (рис. 6, А).

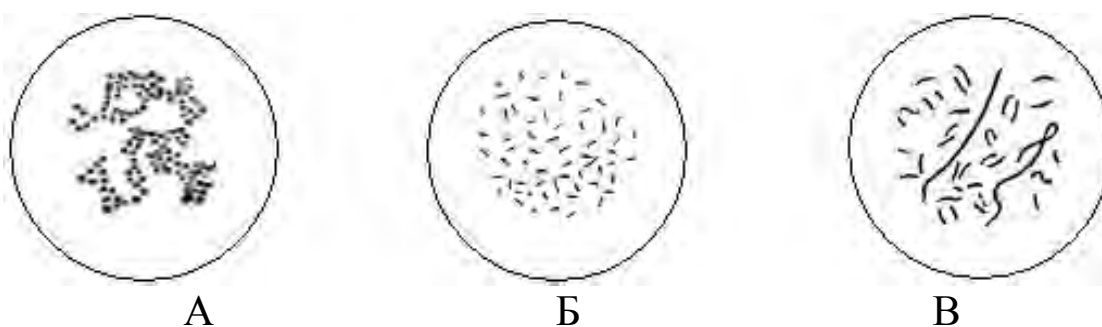


Рис. 6. Вид клеток под микроскопом:

А – *Staphylococcus aureus*; Б – *Escherichia coli*; В – *Proteus vulgaris*

Остальные колонии, которые по морфологическим признакам отличаются от типичных для *S. aureus*, подлежат дальнейшему изучению по схеме (рис. 7).

### **Обнаружение кишечной палочки – *Escherichia coli***

Просматривают пробирки с посевами на среде КОДА. Отсутствие изменений в посевах позволяет уже на этом этапе закончить исследование и дать отрицательный ответ о присутствии *E. coli*. При изменении цвета среды КОДА с первоначального темно-зеленого на ярко-желтый, сопровождающемся газообразованием и помутнением, делают вывод о присутствии *E. coli*. Микроскопический анализ при этом, как правило, не проводят. Помутнение среды без изменения цвета указывает на рост сальмонелл, шигелл, некоторых энтеропатогенных эшерихий, не разлагающих лактозу. Такие пробы должны быть подвергнуты дальнейшему бактериологическому исследованию.

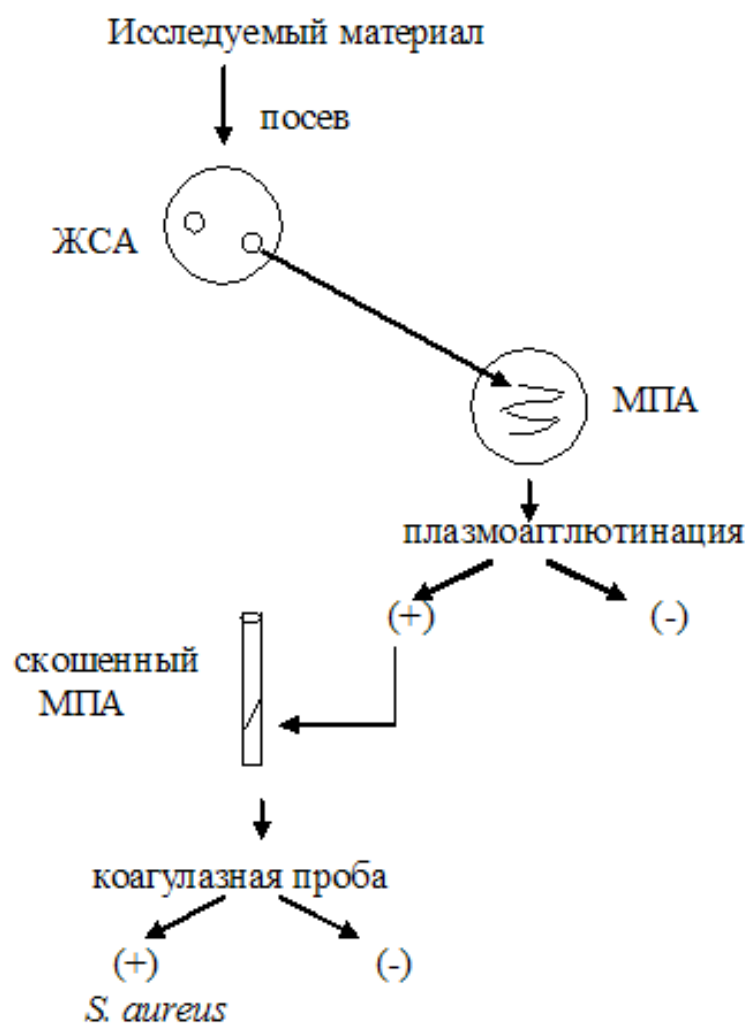


Рис. 7. Идентификация культуры  
на принадлежность к *Staphylococcus aureus*:  
(-) культуры отбрасываются

### **Обнаружение бактерий группы протей – р. *Proteus***

Характерной культуральной особенностью бактерий этого рода является способность к роению, обусловленная их подвижностью: на твердых питательных средах они образуют вуалеобразный рост, постепенно закрывая всю поверхность среды. В связи с этим при наличии протей в исследуемом объекте в посевах наблюдается ползучий рост по поверхности скошенного МПА.

Просматривают пробирки с посевами, отмечая характер роста бактерий на среде МПА. Затем проводят микроскопический анализ посева. Для этого с верхнего края выросшей культуры 1) готовят мазок, который окрашивают по Граму (прил. 3); 2) готовят препарат «висячая капля» для определения подвижности бактерий (прил. 4). По морфологии бактерии р. *Proteus* – это грамотрицательные подвижные палочки с перитрихальными жгу-

тиками, с присущим проявлением полиморфизма<sup>10</sup> в зависимости от условий, спор и капсул не образуют (рис. 6, В).

### **3.1.4. Оценка санитарно-гигиенического состояния исследуемого объекта**

Проведенные исследования позволяют дать *качественную* характеристику обсемененности обследованных объектов санитарно-показательными микроорганизмами. Основываясь на полученных результатах, делают заключение о видах бактериального загрязнения обследованного объекта в зависимости от присутствия тех или иных групп санитарно-показательных микроорганизмов и дают предварительную оценку его санитарно-гигиенического состояния.

При оценке результатов микробиологического обследования некоторых объектов можно ориентироваться на следующие нормативы:

- на предприятиях общественного питания на оборудовании, не соприкасающемся с сырыми продуктами, и вымытой посуде рассматриваемые санитарно-показательные микроорганизмы должны отсутствовать;

- в лечебных учреждениях допускается присутствие *E. coli* в 5% проб; обнаружение золотистого стафилококка свидетельствует о санитарном неблагополучии [4].

Если требуется выявить степень бактериальной обсемененности объекта, то проводят *количественное* определение санитарно-показательных микроорганизмов. Для этого поступают следующим образом.

При использовании *метода смывов* сначала доводят общий объем жидкости в пробирке с ватным тампоном до 10 мл стерильной дистиллированной водой и получают таким образом условное исходное разведение 1:10. Из этого разведения готовят серию последовательных десятикратных разведений (рис. 1) с последующим высевом по 1 мл из каждого разведения на указанные выше среды. После инкубации отмечают то наибольшее разведе-

---

<sup>10</sup> Способность бактерий изменять свою форму и послужила основанием для названия рода. Мифический бог Протей – бог, способный менять свой облик.

ние, в котором еще наблюдается рост микроорганизмов, и устанавливают таким образом их титр<sup>11</sup>.

Для объектов с плоской поверхностью можно сделать расчет на единицу площади (см<sup>2</sup>) по формуле:

$$N = a \times 10^n / V \times S \text{ [КОЕ/см}^2\text{]},$$

где N – количество микроорганизмов; а – количество выросших колоний; n – порядковый номер разведения, из которого сделан посев; V – количество мл разведения, взятое для посева; S – площадь, с которой произведен смыв, см<sup>2</sup>.

При использовании *метода отпечатков* расчет числа микроорганизмов на единицу площади ведут по формуле:

$$N = a/S \text{ [КОЕ/см}^2\text{]},$$

где а – количество выросших колоний; S – площадь исследуемой поверхности (равна площади питательной среды бакпечатки), см<sup>2</sup>.

Полученные результаты сравнивают с установленными нормативами и на основании этого дают заключение об эпидемической опасности (безопасности) исследуемого объекта.

---

<sup>11</sup> *Титр* – это наименьшее количество исследуемого материала (в миллилитрах – для жидких субстратов или в граммах – для твердых), в котором обнаружена хотя бы одна жизнеспособная клетка искомого санитарно-показательного микроорганизма.

## ***Правила техники безопасности при работе в микробиологической лаборатории***

1. В лабораторию нельзя входить в верхней одежде, работать в лаборатории разрешается только в халате.

2. В лаборатории категорически запрещается употреблять еду, напитки и другие продукты.

3. Порядок работы со спиртовками.

3.1 Открыть крышку спиртовки и поправить пинцетом фитиль так, чтобы он был вытянут в вертикальном положении.

3.2. Зажечь спиртовку и не приподнимать держатель фитиля в течение всего времени ее горения.

3.3. Над горящей спиртовкой не наклоняться, не подносить к ней легковоспламеняющиеся предметы (бумагу, вату и т. п.).

3.4. После окончания работы прекратить горение спиртовки, накрыв пламя крышкой.

4. Работа с бактериальными культурами.

4.1. Клетки микроорганизмов для приготовления препаратов-мазков берут бактериологической петлей, открывая чашку в зоне пламени (в диаметре 2–7 см).

4.2. Оставшиеся на петле после приготовления препарата клетки микроорганизмов тщательно сжигают в пламени горелки. Прокаливание петли начинают с участка проволоки, примыкающего к кольцу, для того чтобы микробная масса, оставшаяся в петле, подсохла. Затем петлю переводят в вертикальное положение и прокаливают докрасна. Такой порядок стерилизации петли необходим потому, что при быстром нагревании влажной микробной массы происходит ее разбрызгивание и образуется аэрозоль, загрязняющий воздух. Только после прокаливания петлю можно положить на место.

4.3. Чашки Петри и пробирки с культурами нельзя оставлять открытыми, чтобы не допустить распыления микроорганизмов в лаборатории.

5. После окончания работы привести рабочее место в порядок, протереть иммерсионный объектив микроскопа бензином, тщательно вымыть руки.

### ***Приготовление бактериальных препаратов-мазков***

1. Для приготовления препарата-мазка используют предметное стекло, которое должно быть обезжиренным. Чтобы обезжирить стекло, одну из его поверхностей натирают кусочком сухого мыла, а затем удаляют его следы фильтровальной бумагой или сухой ватой.

2. На обезжиренную поверхность стекла наносят маленькую каплю дистиллированной воды.

3. Небольшое количество культуры, выросшей на поверхности твердой питательной среды, отбирают при помощи бактериологической петли с соблюдением правил стерильности и равномерно эмульгируют в капле воды. Приготовленные мазки высушивают на воздухе при комнатной температуре или в термостате.

4. После полного высыхания мазки фиксируют в пламени горелки с целью закрепления на стекле и лучшего окрашивания клеток. Для этого стекло берут пинцетом и проводят через верхнюю часть пламени два – три раза (около 2-х секунд).

5. При простом методе окраски на фиксированный препарат помещают несколько капель красящего раствора так, чтобы покрыть всю поверхность мазка. Красным красителем красят 1–3 минуты, а синим 3–5 минут. Затем краску смывают дистиллированной водой, а мазок просушивают между полосками фильтровальной бумаги или на воздухе и микроскопируют с помощью иммерсионной системы. При окраске бактерий по Граму используют технику окрашивания, изложенную в прил. 3.

### ***Окраска бактерий по Граму***

Если фиксированные клетки микроорганизмов обработать сначала кристаллическим фиолетовым, а затем йодом, на поверхности клеток образуется окрашенный комплекс. При последующей обработке спиртом в зависимости от строения клеточной стенки судьба комплекса будет различна: у так называемых грамположительных видов ( $G_r^+$ ) этот комплекс удерживается клеткой, и они остаются окрашенными, у грамотрицательных видов ( $G_r^-$ ) окрашенный комплекс вымывается из клеток, и они обесцвечиваются. При докрасивании фуксином  $G_r^+$  бактерии имеют сине-фиолетовый цвет,  $G_r^-$  – красный цвет фуксина.

#### ***Техника окрашивания***

1. Готовят бактериальный препарат-мазок, включая стадию фиксирования (прил. 2, п. 1–3).
2. Фиксированный препарат красят через полоску фильтровальной бумаги 2 мин карболовым генцианвиолетом.
3. Снимают бумагу и, не промывая водой, 1 мин протравливают мазок раствором Люголя.
4. Сливают раствор Люголя и на 30 с наносят на препарат спирт с йодом (2 мл 10%-го раствора йода на 100 мл этанола). Обработка спиртом производится до прекращения отхождения лиловых струек.
5. Быстро промывают мазок водой. Высушивают между полосками фильтровальной бумаги.
6. Докрашивают мазок фуксином 2 мин через фильтровальную бумагу.
7. Смывают краску водой, сушат между полосками фильтровальной бумаги и микроскопируют с помощью иммерсионной системы.

## ***Определение подвижности бактерий***

Подвижность бактерий можно определить в препарате «висячая капля». Следует отличать движение клеток от их пассивного перемещения в результате броуновского движения, которое особенно заметно в суспензиях с большой плотностью. Способность к движению у большинства микроорганизмов обусловлена наличием жгутиков. От их расположения и количества зависит характер движения бактерий. Если жгутики расположены на одном или на двух полюсах клетки, то движение обычно очень быстрое – «ввинчивающееся», без покачивания из стороны в сторону; при латеральном или перитрихальном расположении жгутиков клетки двигаются плавно, совершая колебательные отклонения от оси движения.

### *Приготовление препарата*

#### *«висячая капля»*

Каплю суспензии микроорганизмов петлей наносят на покровное стекло, поворачивают его каплей вниз и помещают на специальное предметное стекло с углублением (лункой) в центре. Капля должна свободно висеть, не касаясь краев и дна лунки (рис. 8). Края лунки предварительно смазывают вазелином. Капля оказывается герметизированной во влажной камере, что делает возможным многодневное наблюдение за объектом.

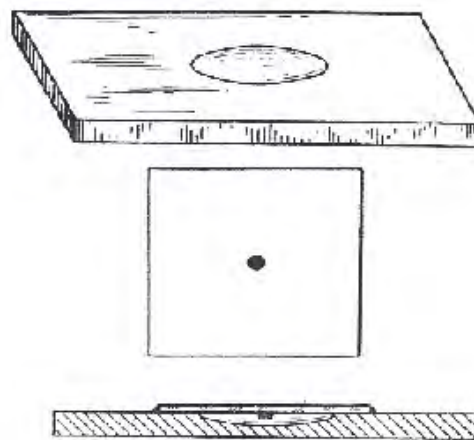


Рис. 8. Приготовление препарата «висячая капля»



### **Определение размеров с помощью объект-микрометра**

*Объект-микрометр* (объективный микрометр) – это металлическая пластинка с отверстием в центре. В отверстие вставлено стекло, на которое нанесена линейка длиной 1 мм (рис. 9). Обычно она разделена на 100 частей, т. е. минимальное деление линейки объект-микрометра соответствует 0,01 мм, или 10 мкм (цену деления следует уточнить по маркировке объект-микрометра). Для определения размера стороны квадрата окулярной сетки (или диаметра поля зрения) объект-микрометр помещают на столик микроскопа и фокусируют при малом увеличении. Изображение линейки перемещают в центр поля зрения и только после этого меняют объектив на тот, при котором проводили подсчет клеток. Перемещая столик микроскопа и поворачивая окуляр, добиваются такого положения, чтобы граница квадрата сетки и шкала линейки объект-микрометра были параллельны и одна перекрывала другую. Устанавливают, скольким делениям объект-микрометра соответствует сторона квадрата окулярной сетки (диаметр поля зрения) и умножают это число на цену деления объект-микрометра.

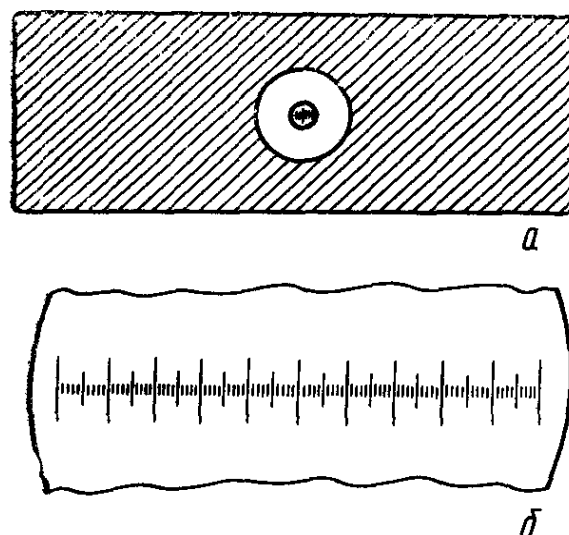


Рис. 9. Объективный микрометр:  
а – общий вид; б – вид по микроскопом

**Классы качества воды  
по микробиологическим показателям [11]**

Классы качества воды	Разряды качества вод	Численнос ть бактерио- планкто- на, $\times 10^6$ кл/мл	Численнос ть сапрофитн ых бакте- рий, $\times 10^3$ кл/мл	Зона сапроб- ности	Категория трофности
1 – пре- дельно чистая	1 – пре- дельно чистая	менее 0,3	<0,1	ксено- сапробная	олиготроф- ная
2 – чистая	2 а – очень чистая	0,3–0,5	0,1–0,5	олигоса- пробная	
	2 б – вполне чистая	0,6–1,5	0,6–1,0		
3 – удовле- творительн ой чистоты	3 а – достаточн о чистая	1,6–2,5	1,1–3,0	β-мезо- сапробная	евтрофная
	3 б – слабо загрязнен- ная	2,6–5,0	3,1–5,0		
4 – загряз- ненная	4 а – умеренно загрязнен-	5,1–7,0	5,1–7,0	α-мезо- сапробная	политроф- ная
	4 б – сильно загряз-	7,1–10,0	7,1–10,0		
5 – грязная	5 а – весь- ма грязная	10,1–20,0	10,1–100,0	поли- сапробная	гипертроф- ная
	5 б – пре- дельно грязная	более 20,0	>100,0		

**Классификация качества грунтов  
по показателям бактериобентоса [9]**

Ранг	Класс	$N_{б.общ}$ млрд кл/мл	$N_c$ тыс. кл/мл	ИП	ИШ
1	Предельно чистые	–	–	–	–
2	Чистые	>0,1	>10	0–0,3	>3,0
3	Достаточно чистые	>0,5	>50	0,31–0,4	2,7–3,0
4	Удовлетворительно чистые	>1,0	>100	0,41–0,49	2,5–2,7
5	Слабозагрязненные	>5,0	>200	0,5–0,54	2,0–2,5
6	Загрязненные	>10	>500	0,55–0,7	1,5–2,0
7	Грязные	>20	>1000	0,71–0,79	1,0–1,5
8	Очень грязные	>50	>10 000	0,8–0,95	0,5–1,0
9	Предельно грязные	>100	>100 000	0,95–1,0	0–0,5

**Состав питательных сред,  
используемых на занятиях**

Для работы с микроорганизмами можно использовать готовые питательные среды отечественного или импортного производства, а можно приготовить их самостоятельно.

**Мясо-пептонный или питательный агар (МПА)** для культивирования микроорганизмов, растущих на богатых питательных средах (г): пептон – 5,0; NaCl – 5,0; мясной экстракт – 1,5; дрожжевой экстракт – 1,5; агар – 15,0; дистиллированная вода – 1000 мл; pH 7,4 ± 0,2. Среду стерилизуют 20 мин при 1 атм.

**Среда Эшби** для культивирования аэробных азотфиксаторов (г): сахароза – 20,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,2; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,2; NaCl – 0,2; FeSO<sub>4</sub> – 0,1; CaCO<sub>3</sub> – 5,0; агар – 15,0; дистиллированная вода – 1000 мл; pH 7,2 ± 0,1. Среду стерилизуют 20 мин при 1 атм.

**Среда КОДА** для обнаружения *E. coli* (г): питательный бульон сухой – 8,0; пептон сухой ферментативный – 8,0; натрия додецилсульфат – 0,6; натрия хлорид – 5,0; лактоза – 10,0; бромтимоловый синий – 0,05; натрия карбонат безводный – 0,3; дистиллированная вода – 1000 мл; pH 7,3 ± 0,2. Среду обычно готовят из

препарата промышленного производства, который представляет собой мелкодисперсный порошок желтоватого цвета, гигроскопичный, светочувствительный.

*Приготовление.* Навеску препарата, указанную на этикетке, размешивают в 1 л дистиллированной воды, кипятят 1–2 мин, фильтруют, повторно доводят до кипения и разливают в стерильные пробирки по 5 мл. Готовая среда должна быть прозрачной, зеленого цвета. Готовую среду можно использовать в течение 7 суток при условии хранения ее при температуре 5 °С.

**Желточно-солевой агар (ЖСА)** для обнаружения *S. aureus*. Может быть приготовлен на основе сухого питательного агара (МПА) или мясо-пептонного бульона (МПБ). В случае использования МПА к последнему добавляют 6,5% хлористого натрия. При использовании МПБ к последнему добавляют 2% агар-агара и 6,5% хлористого натрия. Полученный солевой агар стерилизуют 30 мин при 1 атм. Готовят рабочий раствор желтка: на дно стерильной чашки помещают яйцо, которое тщательно протирают ватой, смоченной спиртом. Пинцетом пробивают с двух противоположных сторон яйца 2 отверстия. Через одно из этих отверстий из яйца полностью удаляют белок, а затем, несколько увеличив отверстие, выливают желток в стерильную банку с 5–6 бусинами. К желтку постепенно добавляют частями (по 20–30 мл) 180–200 мл стерильного изотонического раствора NaCl. Затем содержимое тщательно встряхивают. На 100 мл расплавленного и остуженного до 45 °С солевого агара добавляют 20 мл рабочего раствора желтка. После полного размешивания агар разливают в чашки Петри по 15–20 мл. Чашки можно хранить в холодильнике до 1,5–2 недель.

## Список литературы

1. ГОСТ 17.1.3.07-82. Правила контроля качества воды водоемов и водотоков. Стандарт. М.: Государственный комитет СССР по стандартам, 1983. 81 с.
2. СанПиН 2.1.5.980-00. Санитарные правила и нормы. Гигиенические требования к охране поверхностных вод. М.: Минздрав России, 2000. 24 с.
3. МУК 4.2.1884–04. Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов: методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2005. 75 с.
4. МУ 2657-82. Методические указания по санитарно-бактериологическому контролю на предприятиях общественного питания и торговли пищевыми продуктами № 2657 от 31.12.82. М., 1984. 25 с.
5. Вербина Н. М. Исследование микрофлоры озер СССР // Экологические аспекты водной микробиологии: сборник статей. Новосибирск, 1984. С. 45–49.
5. Гавришова Н. А. Распространение гетеротрофных и олигокарбофильных бактерий в водоемах и водотоках Украины // Структура и функционирование сообществ водных микроорганизмов. Новосибирск: Наука, 1986. С. 211–213.
6. Горленко В. М., Дубинина Г. А., Кузнецов С. И. Экология водных микроорганизмов. М.: Наука, 1977. 288 с.
7. Дворецкий М. Л. Пособие по вариационной статистике. М.: Лесная промышленность, 1971. 104 с.
8. Использование структурных показателей бактерио- и зообентоса для оценки качества донных отложений (на примере водоемов верхневолжского бассейна) / Г. А. Виноградов, Н. А. Березина, Н. А. Лаптева, Г. П. Жариков // Водные ресурсы. 2002. Т. 29, № 3. С. 329–336.
9. Кабиров Р. Р., Хазипова Р. Х. Альгологический метод оценки токсичности ПАВ // Биоиндикация и биомониторинг. М.: Наука, 1991. С. 282–285.
10. Комплексная экологическая классификация качества поверхностных вод суши / О. П. Оксий, В. Н. Жукинский,

Л. П. Брагинский и др. // Гидробиологический журнал. 1993. Т. 29, № 4. С. 62–77.

11. Кондакова Г. В. Биоиндикация. Микробиологические показатели: учебное пособие. Ярославль: ЯрГУ, 2007.

12. Кондакова Г. В. Санитарная микробиология: текст лекций. Ярославль.: ЯрГУ, 2005. 84 с.

13. Косолапов Д. Б., Намсараев Б. Б. Микробиологическое образование метана в донных отложениях Рыбинского водохранилища // Микробиология. 1995. Т. 64, № 3. С. 418–423.

14. Мынбаева Б. Н., Курманбаев А. А., Воронова Н. В. Микробная биоиндикация почв г. Алматы с помощью культуры *Azotobacter* // Фундаментальные исследования. 2011. № 6. С. 206–209.

15. Практикум по микробиологии: учебное пособие для студентов высших учебных заведений / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук и др.; под ред. А. И. Нетрусова. М.: Академия, 2005. 608 с.

16. Романенко В. И., Кузнецов С. И. Экология микроорганизмов пресных водоемов. Л.: Наука, 1972. 194 с.

17. Садчиков А., Куликов А., Максимов В. Структура бактериопланктона в двух разных по трофности водоемах // Биологические науки. 1990. № 3. С. 79–85.

18. Тихонов С. В. Практические занятия по математическим методам в биологии и экологии: учеб. пособие. Ярославль: ЯрГУ, 2003. 103 с.

19. Экологическое нормирование на примере радиоактивного и химического загрязнения экосистем / Д. А. Криволуцкий, А. М. Степанов, Ф. А. Тихомиров, Е. А. Федоров // Методы биоиндикации окружающей среды в районах АЭС. М.: Наука, 1988. С. 4–16.

## Оглавление

Требования к оформлению лабораторных занятий .....	4
<b>Тема 1. Оценка состояния водных экосистем .....</b>	<b>4</b>
1.1. Лабораторная работа 1. Оценка качества воды поверхностного водоема по показателям бактериопланктона .....	5
Порядок выполнения лабораторной работы .....	7
1.1.1. Приготовление разведений .....	7
1.1.2. Посев на твердые питательные среды .....	8
1.1.3. Подсчет колоний на чашках Петри .....	9
1.1.4. Определение численности копиотрофов и олиготрофов .....	10
1.1.5. Морфологическое описание колоний .....	11
1.1.6. Анализ основных морфологических групп копиотрофов .....	13
1.1.7. Определение индекса трофности .....	14
1.1.8. Обобщение полученных результатов .....	15
1.2. Лабораторная работа 2. Оценка качества донных отложений водоема по показателям бактериобентоса .....	16
Порядок выполнения лабораторной работы .....	17
1.2.1. Подготовка проб донных отложений для анализа .....	17
1.2.2. Приготовление препаратов для определения общей численности бактерий методом прямого счета (метод Виноградского – Брида) .....	18
1.2.3. Посев на среду РПА для количественного учета аэробных сапротрофных бактерий .....	19
1.2.4. Подсчет колоний на чашках Петри и определение численности сапротрофных бактерий .....	19
1.2.5. Определение общей численности бактериобентоса .....	19
1.2.6. Анализ и обобщение полученных результатов .....	21
<b>Тема 2. Оценка состояния почв .....</b>	<b>22</b>
2.1. Лабораторная работа 3. Оценка качества почв с помощью бактерий рода <i>Azotobacter</i> .....	22
Порядок выполнения лабораторной работы .....	23
2.1.1. Приготовление почвенной суспензии и разведений .....	23
2.1.2. Посев на питательную среду для количественного учета бактерий рода <i>Azotobacter</i> .....	25
2.1.3. Анализ выросших колоний .....	25
2.1.4. Определение коэффициента влияния .....	26
2.1.5. Обобщение полученных результатов .....	27
<b>Тема 3. Оценка состояния окружающей среды с помощью санитарно-показательных микроорганизмов .....</b>	<b>27</b>
3.1. Лабораторная работа 4. Оценка санитарно-гигиенического состояния объектов рабочей зоны .....	28
Порядок выполнения лабораторной работы .....	29
3.1.1. Методы отбора проб .....	29

3.1.2. Посевы на дифференциально-диагностические среды для обнаружения санитарно-показательных микроорганизмов.....	30
3.1.3. Анализ посевов.....	32
3.1.4. Оценка санитарно-гигиенического состояния исследуемого объекта .....	35
Приложение 1. Правила техники безопасности при работе в микробиологической лаборатории.....	37
Приложение 2. Приготовление бактериальных препаратов-мазков.....	38
Приложение 3. Окраска бактерий по Граму.....	39
Приложение 4. Определение подвижности бактерий .....	40
Приложение 5. Определение размеров с помощью объект-микрометра .....	41
Приложение 6. Классы качества воды по микробиологическим показателям ....	42
Приложение 7. Классификация качества грунтов по показателям бактериобентоса.....	43
Приложение 8. Состав питательных сред, используемых на занятиях .....	43
Список литературы .....	45

---

Учебное издание

## БИОИНДИКАЦИЯ. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭКОСИСТЕМ

*Методические указания  
к лабораторным занятиям*

Составитель **Кондакова** Галина Вячеславовна

Редактор, корректор М. Э. Левакова

Верстка И. Н. Иванова

Подписано в печать 27.03.12. Формат 60×84 1/16. Бум. офсетная.  
Гарнитура «Times New Roman». Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 2,09.

Тираж 20 экз. Заказ

Оригинал-макет подготовлен в редакционно-издательском отделе  
Ярославского государственного университета им. П. Г. Демидова.

Отпечатано на ризографе

Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова.  
150000, Ярославль, ул. Советская, 14.





**БИОИНДИКАЦИЯ.  
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ  
ИССЛЕДОВАНИЯ ЭКОСИСТЕМ**

