

Лабораторне заняття 10

Тема: Методи обліку кількісного і якісного складу мікрофлори води

1. Мета заняття: вивчити склад мікрофлори води, ознайомитися з методами обліку кількісного і якісного складу мікрофлори води; оволодіти методами визначення загального числа мікроорганізмів і кишкової палички у воді.

Обладнання, матеріали, реактиви: мікроскоп, чашки Петрі зі стерильними середовищами МПА, Ендо, Сіммонса; піпетки стерильні, шпатель Дригальського, пробірки стерильні, бактеріологічна петля, спиртівка, сірники, предметні скельця, покривні скельця, прилад для фарбування і промивання мазків, смужки фільтрувального паперу, реактиви для забарвлення мікробіологічних препаратів, олівець по склу, імерсійне масло.

Питання для актуалізації знань

1. Які мікробіологічні показники якості води Вам відомі?
2. Який видовий склад мікрофлори води?
3. Які морфологічні, культуральні та біохімічні властивості бактерії *E. coli* ви знаєте?

Теоретичні відомості

Кількісний та якісний склад мікрофлори води залежить від виду джерела і від ступеня його забруднення. Вода відкритих водойм багатша сапрофітними мікробами, ніж підземні води. Концентрація патогенних мікроорганізмів у воді досить незначна і перебування їх у водоймах може бути короточасним. Безпека води в епідемічному відношенні визначається непрямими показниками: ступенем загального бактеріального забруднення і змістом бактерій групи кишкової палички як показника фекального забруднення води.

Бактерії групи кишкової палички (БГКП, також називаються коліформними і коліформними бактеріями) – група бактерій родини ентеробактерій, які використовуються в санітарній мікробіології як маркер фекальної контамінації, відносяться до групи так званих **санітарно-показових мікроорганізмів**. До бактерій групи кишкових паличок відносять представників родів *Escherichia* (в тому числі і *E. coli*), *Citrobacter* (типовий представник *Citr. coli citrovorum*), *Enterobacter* (типовий представник *Ent. aerogenes*), які об'єднані в одну родину *Enterobacteriaceae* завдяки спільності морфологічних і культуральних властивостей.

Безпека питної води обумовлена не тільки фекальним забрудненням. Деякі організми розмножуються у водогінних системах розподілу води (наприклад, *Legionella*), інші зустрічаються у вододжерелах, проте багато з них можуть викликати спалахи захворювань.

Безпека питної води в епідемічному відношенні визначається відсутністю в ній хвороботворних бактерій, вірусів і найпростіших мікроорганізмів, її відповідністю нормативам за мікробіологічними і паразитологічними показниками (додатки).

Методи обліку кількісного і якісного складу мікрофлори води

1. Визначення наявності кишкової палички у воді

Індикатором свіжого фекального забруднення води є кишкова паличка, яка має велику стійкість у зовнішньому середовищі. Результати виявлення кишкової палички у воді реєструються у вигляді *колі-титру* або *колі-індексу*.

Колі-титр визначається тією кількістю води, у якому міститься одна кишкова

паличка.

Колі-індекс – кількість особин кишкової палички, що міститься в 1 л води.

$$\text{Колі-титр} = 1000/\text{Колі-індекс}$$

Методика дослідження заснована на застосуванні диференційно-діагностичних середовищ, до яких відноситься середовище Ендо. Фуксин знебарвлюється сульфідом натрію (утворюється безбарвна фуксинсерчана кислота – реактив Шиффа). Ентеробактерії зброджують лактозу, виділяючи в процесі бродіння мурашину кислоту, яка дає кольорову реакцію з фуксинсерчаною кислотою з утворенням вільного фуксину, у результаті чого їх колонії забарвлюються в малиново-червоний колір з металевим блиском або без нього. Колонії бактерій, що не зброджують лактозу, мають білий або блідо-рожевий колір.

2. Визначення загального мікробного числа річкової води

Пробу річкової води відбирають з дотриманням правил асептики. Готують розведення води, щоб при її посіві на МПА отримати ріст мікроорганізмів у вигляді окремих колоній.

Для цього беруть 2 пробірки, що містять по 9 мл стерильної водогінної води. Стерильною градуйованою піпеткою набирають 1 мл досліджуваної води і вносять у пробірку, ретельно перемішуючи її вміст. Виходить розведення 1:10. Для наступного розведення з пробірки № 1 переносять 1 мл рідини в пробірку № 2 (розведення 1: 100). З розведень беруть піпеткою по 1 мл води, і дотримуючись правил асептики, вносять кожне розведення в окрему чашку Петрі, потім вливають в чашки розплавлений і охолоджений до 45°C МПА в кількості 15–20 мл. Чашки негайно ж починають обертати по горизонтальній поверхні столу, рівномірно розподіляючи МПА. Після того, як агар застигне, чашки перевертають, підписують і залишають до наступного заняття.

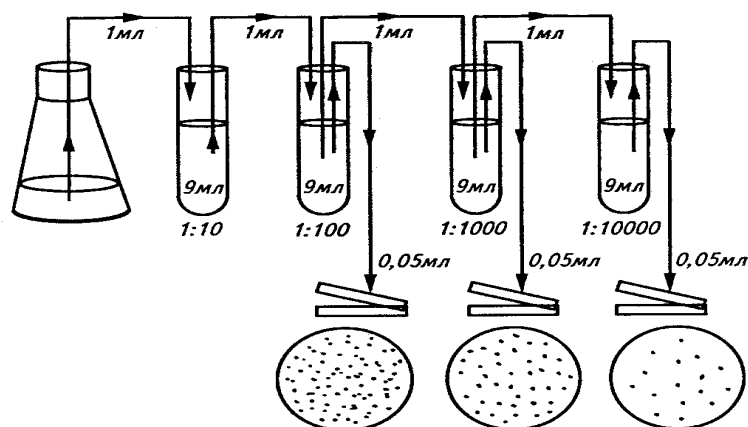


Рисунок 1 - Схема децимальних розведень води

ІНСТРУКЦІЯ

Завдання 1. Освоїти методи визначення загального мікробного числа водогінної води

Загальна мікробна забрудненість визначається кількістю мікроорганізмів, що містяться в 1 мл води. Роботу виконують у 2 етапи.

1. Досліджувану воду в залежності від ступеня забруднення розводять стерильною водопровідною водою 1:10, 1:100 тощо.
2. Потім стерильною градуйованою піпеткою вносять по 1 мл води з кожного

- розведення в стерильні чашки Петрі, починаючи з більшого.
- У кожену чашку Петрі виливають по 15 мл розплавленого і охолодженого до 45°C м'ясо-пептонного агару (МПА), рівномірно розподіляючи вміст по дну чашки.
 - Після того, як чашки остигнуть, їх перевертають догори дном і поміщають в термостат на 24 години.
 - На наступному занятті** проводять підрахунок колоній і розрахунок загального мікробного числа води.
 - При малій кількості колоній рахунок ведуть, помітивши на дні чашки чорнилом кожену порахувати колонію. Число вирослих колоній відповідає кількості мікроорганізмів в засіяному об'ємі води.
 - Для отримання середнього арифметичного слід порахувати число колоній, що виросли в кожній чашці, потім помножити на відповідне розведення.
 - Результати, пораховані за окремими чашкам, потрібно скласти, а потім розділити на кількість засіяних чашок.

Отримане число буде показником загальної мікробної забрудненості води. Водогінна вода повинна мати мікробне число, яке не перевищує 100 клітин у 1 мл води.

Завдання 2. Визначити присутність кишкової палички в пробах водогінної води

Наявність кишкової палички і ентеробактерій у пробах водогінної води можна визначити, скориставшись відповідно середовищами Ендо і Сіммонса.

- З розведень 1:10 і 1:100 стерильною градуйованою піпеткою внести в чашки із середовищем Ендо і Сіммонса по 1 мл води.
- Стерильним шпателем Дригальського рівномірно розподілити рідину по поверхні середовища (посів газом).
- Чашки підписати і поставити до термостату для культивування.

На наступному занятті провести розрахунок загального мікробного числа і вивчити культуральні та морфологічні (форма бактерій, забарвлення по Граму) властивості мікроорганізмів, які виросли на чашках із середовищем Ендо. Наявність неспорових грамнегативних паличок, що мають колонії червоного кольору на середовищі Ендо, підтверджує їх належність до групи коліморфних бактерій (додатки).

Результати занести до таблиці 1.

Таблиця 2

Мікробіологічні показники якості води

| Проби води (ділянка) | Загальне мікробне число КУО/1 мл води (на МПА), | Кількість коліформних бактерій у 1 л води (на середовищі Ендо) | Кількість бактерій ентеробактерій (на середовищі Сіммонса) |
|---------------------------------|--|---|---|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

Завдання 3. Вивчити морфолого-культуральні властивості мікрофлори води

На наступному занятті вивчити культуральні та морфологічні (розміри і форма колоній, забарвлення, характер краю і поверхні колоній, прозорість, забарвлення по Граму) властивості мікроорганізмів, які вирости на чашках із середовищем МПА. Результати занести до таблиці 2.

Таблиця 2

Морфолого-культуральні типи бактерій, що вирости на МПА

| № МКТ | Морфологія колоній | Морфологія клітин |
|--------------|---------------------------|--------------------------|
| № 1 | | |
| № 2 | | |
| № 3 | | |
| | | |

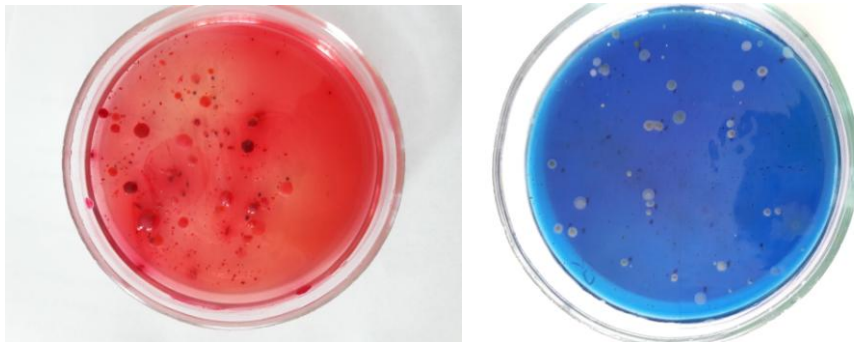
? питання для самоконтролю

1. Що таке колі-індекс?
2. Що таке колі-титр? Як він розраховується?
3. З якими методами визначення якості води Ви ознайомились?
4. Які морфологічні і культуральні властивості мікрофлори води?
5. Що таке загальне мікробне число?
6. Які нормативні показники ЗМЧ для водогінної і річкової води?

ДОДАТКИ



Рисунок 1 – Загальний вигляд мікрофлори, що виросла на на середовищі МПА



1

2

Рисунок 2 – Загальний вигляд мікробних колоній, що виросли на диференційно-діагностичних середовищах: середовищі Ендо (1) і середовищі Сіммонса (2)

Таблиця 1

Нормативні мікробіологічні показники якості води

| Назва показника | Одиниці виміру | Норматив |
|--------------------------------------|--|---------------|
| Термотолерантні колі-формні бактерії | Кількість бактерій у 1 см ³ | відсутність |
| Загальні коліформні бактерії | Кількість бактерій у 1 см ³ | відсутність |
| Загальне мікробне число | Кількість КУО в 1 см ³ | Не більше 100 |