16.09.24.

25 група

Методи мікробіологічних досліджень.

Лабораторна робота

Тема :"Техніка посіву мікроорганізмів"

Мета: Ознайомитись з технікою посіву мікроорганізмів.

Внесення клітин мікроорганізмів або будь-якого досліджуваного матеріа- лу (зразка грунту, проби води) до стерильного поживного середовища для отримання чистої або накопичувальної культури називають ***посівом.***

Перенесення вже вирощених клітин з одного середовища на інше (стериль- не) називають **пересіванням,** або ***пасивуванням*** (від лат. *passus* – чергування).

Зазвичай мікроорганізми вирощують при певній постійній температурі в термостатах або кімнатах термостатів. Культивування при певній температу- рі називається ***інкубацією*** (від лат. *incubatio* – вирощування, висиджування пташенят). Вирощують мікроорганізми в скляному посуді: пробірках, колбах або чашках Петрі.

У пробірках мікроорганізми культивують як в рідких, так і на твердих се- редовищах. Рідким середовищем для аеробних культур заповнюють 1/3 про- бірки, для анаеробних – 2/3. Якщо тверде середовище в пробірках призначене для подальшого вирощування мікроорганізмів, при підготовці до стерилізації його наливають на 1/3–1/4 об'єму пробірок. Після стерилізації пробірки із ще не застиглим середовищем розкладають на рівній поверхні столу з нахилом (під невеликим кутом) для отримання скошеної поверхні агару. Це так звані

«косяки» – скошене середовище.

Тверде середовище, застигле при вертикальному положенні пробірки, на- зивається ***стовпчиком***. Стовпчики поживного середовища, що займає

1/3 – 1/4 об'єму пробірки, використовують для посіву культури уколом. Стовпчики поживного середовища, що займають 2/3 об'єму пробірки, після стерилізації застосовують для заливки стерильних чашок Петрі, призначених для мікро- біологічних посівів.

При культивуванні мікроорганізмів у колбах використовують тільки рідке живильне середовище. Для аеробних мікроорганізмів середовище наливають тонким шаром (наприклад, 30 мл в колби Ерленмейєра на 100 мл), для анае- робних мікроорганізмів колбу заповнюють на 2/3 об'єму. У чашках Петрі мікроорганізми культивують лише на твердому середовищі.

Для роботи з мікроорганізмами використовують спеціальні бактеріологічні голки, петлі і шпателі. При посівах і пересіваннях культур мікроорганізмів з ко- лоній, що виросли на твердому середовищі або вросли в субстрат, застосовують голки або шпатель. Суспензії мікроорганізмів беруть петлею.

Техніка посіву

- Посів (або пересів) завжди проводять поблизу пальника.
- При пересіві мікроорганізмів пробірки в пробірку (рис. 10) обидві пробірки (одну – з культурою, іншу – із стерильним поживним середовищем) беруть в ліву руку. Одну пробірку затискають між вказівним і середнім пальцями (перша пробірка). Нижній кінець її вільно лежить на ве- ликому. Другу пробірку затискають між середнім і безіменним пальцями. Вона повинна лежати паралельно першій. Її нижній кінець розташовується з правого боку великого пальця. Великий палець, який знаходиться між пробірками, має бути в природному, ненапруженому стані і злегка утри- мувати пробірки в паралельному по відношенню один до одного поло- женні.

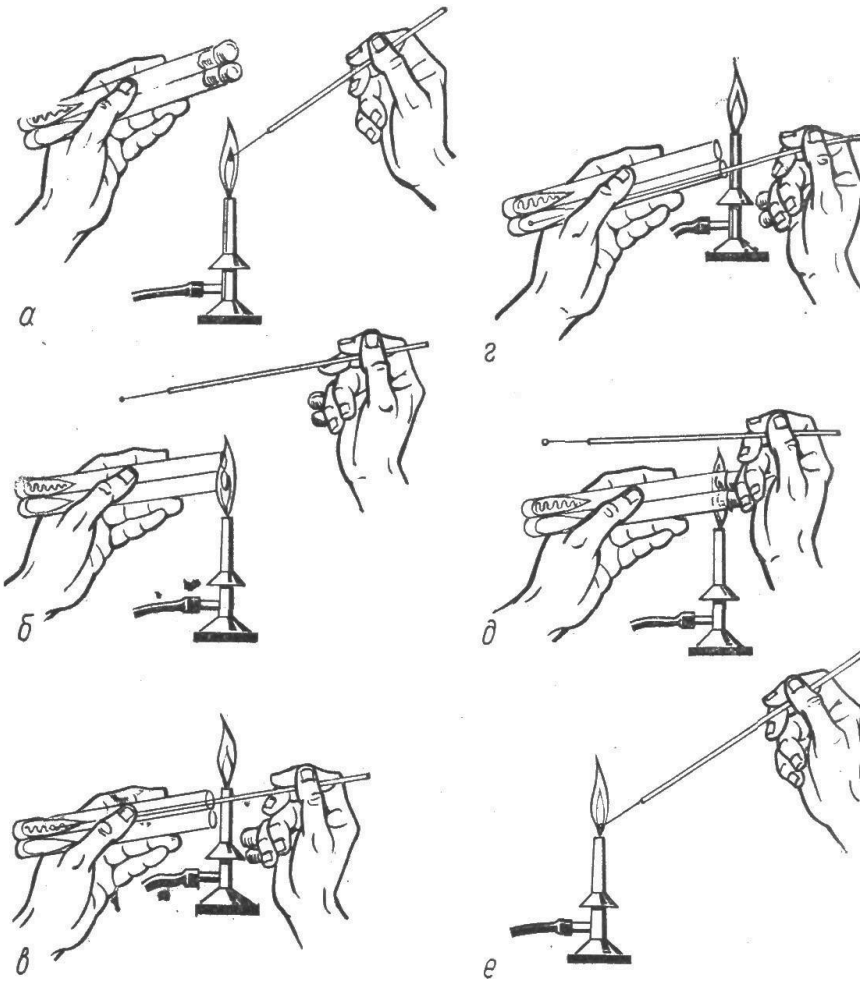


Рисунок 10. Схема пересівання мікроорганізмів з однієї пробірки в іншу: *а*- про- жарювання петлі в полум'ї пальника до посіву; *б*- прожарювання країв пробірок; *в*- взяття мікробних клітин петлею; г - посів мікробних клітин на скошене середо- вище; *д*- одночасне закривання двох пробірок в полум'ї пальника; *е*- прожарюван- ня петлі після посіву.

- При взятті мазка пробірки повинні бути нахиленими, що гарантує сте- рильність культури. При вертикальному розташуванні пробірок можливе попадання із повітря сторонніх клітин мікроорганізмів.
- Бактеріологічну голку (петлю) тримають у правій руці та ретельно об- палюють у полум'ї пальника.
- Мізинцем правої руки виймають з другої пробірки ватяну пробку і за- тискають її між мізинцем і долонею. Пробку першої пробірки затискають між безіменним і середнім пальцями правої руки.
- Знову злегка обпалюють голку і вводять її в пробірку з культурою. Легким дотиком голки до колонії мікроорганізмів беруть невелику кіль-

кість мікробної маси і переносять в іншу пробірку.

При висіві на тверде скошене середовище петлю з матеріалом, що знаходиться на ній, вводять в пробірку, опускають на поверхню поживного середовища і наносять штрих від низу до верху, від однієї стінки пробірки до іншої (не ушкоджуючи середовища).

При посіві в стовпчик поживного середовища голку вводять в товщу її центральної частини – *посів уколом*.

При посіві в рідке середовище (або з рідкого середовища) лише злегка на- хиляють пробірки, щоб запобігти змочуванню пробок і країв пробірок.

Пробки, перед тим як закрити пробірки, обпалюють у полум'ї. Зручніше спочатку закрити першу пробірку, а потім – другу.

При посіві на поверхню поживного агару в чашки Петрі (рис.11) кришку відкривають настільки, щоб в щілину, що утворилася, вільно проходили петля або шпатель. Невелику кількість взятої культури втирають бакте- ріологічною петлею в поверхню поживного середовища біля краю чашки. Потім петлю прожарюють, щоб знищити надлишок матеріалу, що залишився на ній. Лінію посіву починають з того місця, в якому знаходиться матеріал. Бактеріологічною петлею проводять штрихи на поживному середовищі, не пошкоджуючи його поверхні.

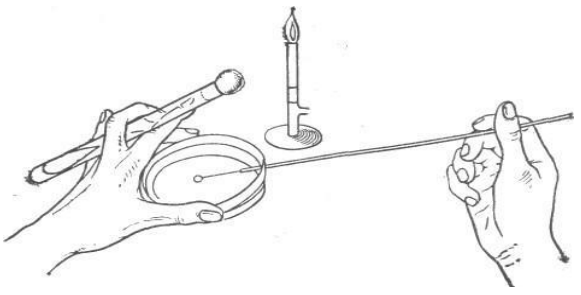


Рисунок 11. Посів на тверде поживне середовище в чашку Петрі.

Для рівномірного розподілу матеріалу, що засівається, по поверхні твердого поживного середовища можна користуватися замість петлі скляним шпателем.

Для посіву клітин з рідкої культури використовується *метод посіву залив-кою* Набирають 0,5 мл культури, що засівається, в стерильну піпетку і вилива- ють в порожню стерильну чашку Петрі. Вслід за цим чашку заливають 15 – 20 мл поживного агару, розплавленого і остудженого до температури 40 – 45 °С. Для рівномірного розподілу досліджуваного матеріалу в поживному середови- щі закриту чашку з вмістом злегка обертають по поверхні столу.

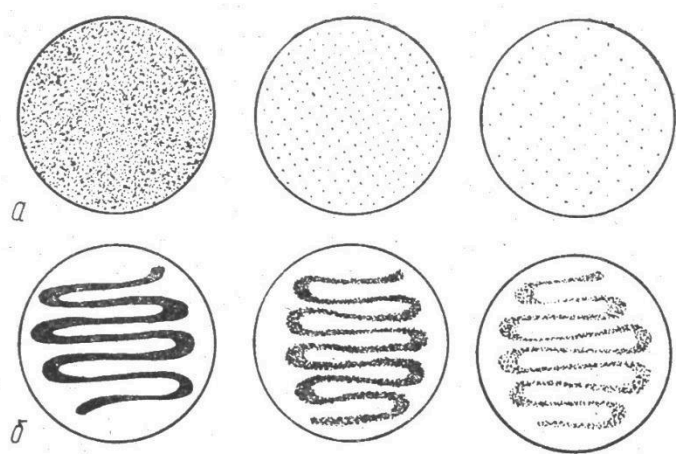


Рисунок 12. Зростання мікроорганізмів на поверхні твердого поживного середовища:

а - після посіву шпателем або посіву заливкою; *б* - після посіву бактеріологічною петлею.

Зберігання мікроорганізмів

При тривалому зберіганні в лабораторних умовах можуть змінитися окремі фізіолого-біохіімічні або морфологічні особливості мікроорганізмів. Щоб уникнути цього, необхідно зберігати культуру чистою і в життєздатному стані. Традиційний метод зберігання – *інокулювання (субкультивування)*, тобто періодичне пересівання на свіже поживне середовище. Одні види мікроорганізмів вимагають частих пересівань, інші можна не пересівати більше місяця. В процесі такого зберігання не можна допускати пересихання середо- вища. Для цього пробірки з культурами рекомендують обгорнути папером або плівкою і зберігати в умовах, коли процеси життєдіяльності загальмовані, на- приклад у холодильнику при 5 – 8 ºС. Існує багато інших способів зберігання культур: під шаром стерильного

вазелінового масла; в ампулах з рідким азотом; у ліофілізованому стані, тобто висушеними із замороженого стану. Бактерії, що

утворюють спори, можуть зберігатися роками в стерильному сухому грунті або відповідному середовищі.

► ХІД РОБОТИ: ◄

1. Залити поживне середовище в чашку Петрі. Для цього поживне сере- довище (у пробірці, заповненій поживним агаром на 2/3) розплавляють на водяній бані. При розливі середовища в чашки Петрі лівою рукою відкрива- ють кришку чашки у бік полум'я пальника. Акуратно виливають до чашки поживне середовище і рівномірно розподіляють його по всій поверхні дна чашки (злегка рухаючи чашкою).

Оскільки при застиганні агару на внутрішній стороні кришки осідає конденсаційна вода, яка, стікаючи на поверхню середовища, заважає отриманню ізольованих колоній мікроорганізмів, то чашки з середовищами підсушують в термостаті.

2. Висіяти культуру мікроорганізмів у скошене поживне середовище(використовувати мікробіологічну петлю). Пробірку підписати.
3. Висіяти культуру мікроорганізмів у стовпчик поживного середовища(використовувати мікробіологічну голку). Пробірку підписати.
4. Засіяти культуру мікроорганізмів у чашку Петрі. Підписати денце чашки.
5. Засіяні пробірки і чашки Петрі поміщють до термостату для інкубації. Щоб утворювана конденсаційна вода не заливала посіву, чашки Петрі перевертають догори дном і ставлять в термостат в такому положенні.

► КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ: ◄

1. Дайте визначення таким поняттям: культивування мікроорганізмів, пасивування, інкубація, інокуляція.

2. Чим відрізняються чисті і накопичувальні культури мікроор- ганізмів?

3. Техніка посіву мікроорганізмів у чашки Петрі.
4. Особливості посіву рідких культур мікроорганізмів.
5. Методи зберігання мікроорганізмів.
6. Дотримання заходів асептики при культивуванні мікроорганізмів.