26.09.24

25 група

Методи мікробіологічних досліджень

Лабораторна робота Методи виділення чистих культур мікроорганізмів

1. Теоретична частина

Чиста культура - популяція клітин одного виду м/о, що виросла на стерильному поживному середовищі. Чисту культуру виділяють шляхом одержання нащадків однієї батьківської клітини. Культура може зростати у виді окремих колоній на МПА.

Виділення чистих культур, або мікробіологічний метод, є основним методом мікробіологічної діагностики. Для оцінювання санітарного стану об'єктів, зокрема в аптеках чи на фармацевтичних виробництвах, визначають наявність санітарно-показових мікроорганізмів, для чого потрібно виділити чисті культури таких бактерій.

Методи виділення чистих культур з мікробних сумішей засновані на принципах механічного поділу м/о чи на їхніх біологічних властивостях.

Виділення чистих культур проводять в кілька етапів, основним з яких є одержання ізольованих колоній, з яких вирощується чиста культура. Досліджуючи властивості чистої культури встановлюють її вид (ідентифікація чистої культури). Основні критерії, за якими ідентифікують культуру бактерій: морфотінкторіальні, культуральні і біохімічні властивості.

Методи, засновані на принципах механічного поділу м/о

Метод виснаженого штриху

Чашку Петрі поділяють на 4 сектори. Досліджуваний матеріал беруть бактеріальною петлею, роблять ряд штрихів на поверхні першого сектора, а потім клітинами, що залишилися на петлі, засівають всі інші сектори. При кожнім наступному штриху кількість клітин, що засіваються, зменшується.

Таким чином, у перших секторах виходить суцільний ріст, а уздовж наступних штрихів виростають відособлені колонії, що представляють собою потомство однієї клітки.

Метод прогрівання

Досліджуваний матеріал прогрівають на водяній лазні при 80˚С 10-15 хв. При цьому вегетативні форми гинуть, а спори зберігаються. Спори при посіві на відповідне живильне середовище проростають. Метод дозволяє відокремити спорообразуючі бацили від неспороносних форм.

Метод збагачення

Досліджуваний матеріал засівають на елективні живильні середовища, які сприяють зростанню визначеного виду м/о.

Методи, засновані на біологічних властивостях м/о

На першому етапі виділення чистої культури м/о проводиться взяття досліджує-мого матеріалу та посів його на поживне середовище. Основні завдання – зберегти збудника, запобігти забрудненню проби сторонньою мікрофлорою, вберегти довкілля від зараження.

Перед посівом проводять мікроскопічне досліджування з фарбуванням мазка-препарата по Граму та Цилю-Нільсену. В результаті посіву потрібно одержати ізольовані колонії м/о.

2. Експериментальна частина

Матеріал і обладнання: спиртівки, бактеріологічні петлі, стерильні пробірки зі скошеним агаром, термостат сухоповітряний, культура м/о, етиловий спирт, світловий мікроскоп, предметні стекла, набір барвників для фарбування по Граму та Цилю-Нільсену, імерсійне масло

+Провести забір досліджуваного матеріалу. Зробити мазки-препарати, пофарбувати по Граму. Мікроскопіювати у імерсійній системі. Провести посів суміші м/о на чашку Петри. Розділити чашку на 4 сектори. Чашку Петри тримають у лівій руці, кришку відкривають настільки, щоб у щілину вільно проходила петля. Невелика кількість матеріалу втерти петлею в поверхню МПА в краю чашки. Петлю пропалити, щоб знищити надлишок матеріалу, що знаходиться на ній. Петлю кладуть на МПА в місці нанесення матеріалу і проводять по секторах ряд штрихів, рівномірно розподіляючи бактерії на МПА. Такий посів дає можливість одержати ізольовані колонії м/о. не зачіпаючи інших колоній. Чашку Петрі з посівом закрити кришкою загорнути в папір, підписати і помістити в термостат на 24 години при 37ºС.

Другий етап виділення чистої культури включає облік посівів, макро- та мікроскопічне дослідження колоній. На цьому етапі вивчаються властивості колоній та перевіряється їх чистота. Чашку Петрі з колоніями розглядують у прохідному світлі, визначають культуральні властивості колоній: форму, величину, характер країв, прозорість. У відбитому світлі, оглядаючи чашку дещо збоку, досліджують колір, наявність пігменту (білий, жовтий, золотистий та ін.), структуру і характер поверхні. Консистенцію визначають, доторкаючись до колонії стерильною бактеріологічною петлею.

Проводять мікроскопічне дослідження колоній. Мазки-препарати фарбують за Грамом, під мікроскопом перевіряють чистоту колоній (у мазку мають бути бактерії одного морфологічного типу, однакового розміру та забарвлення). Якщо в препараті виявлені інші бактерії, така колонія у подальшому не досліджується.

Наприкінці другого етапу досліджені ізольовані колонії пересіваються на похилий агар для отримання чистої культури.

Чашку Петрі тримають на рівні очей на відстані приблизно 30 см, повернувши агаром до себе і розглянути колонії в прохідному світлі (визначають форму, величину, характер країв та прозорість колоній). У відбитому світлі, оглядаючи чашку дещо збоку, досліджують колір, наявність пігменту, структуру і характер поверхні.

Консистенцію визначають, доторкаючись до колонії стерильною бактеріологічною петлею. При необхідності можна використовувати лупу.

Виділити колонії різних видів м/о, пронумерувати їх , описати і замалювати.

Третій етап виділення чистої культури

+

- Візуально (за допомогою лупи) вивчити культуральні і тінкториальні властивості культури, що виросла на похилому агарі. Відзначити характер росту виділеної чистої культури. Для чистої культури характерний однорідний ріст.
- Вивчити чисту культуру методом імерсійної мікроскопії. Приготувати мазок-препарат, офарбити по Граму і мікроскопувати. У мазку з чистої культури виявляються морфологічно і тінкторіально однорідні клітки.

Заповнити таблицю

№ колонії	Вид колонії мікроорганізмів	Величина	Обрис	Край	Поверхня	Профіль	Однорідність	Консистенція	Колір	Прозорість	Морфологія фарбування по Граму

Контрольні запитання:

1. Визначення чистої культури.
2. Методи механічного виділення чистої культури.
3. Методи, засновані на біологічних властивостях мікроорганізмів.
4. Перший етап виділення чистої культури.