

9.10.24.

25 група

Методи мікробіологічних досліджень

(Консультація)

Тема: ТЕХНІКА ПРОВЕДЕННЯ ПОСІВІВ на тверде середовище.

Посів на щільні середовища в чашки проводять декількома способами.

Поверхневий спосіб посіву зручний для посіву мікроорганізмів з рідкої суспензії на тверду середу. Метод застосовується для визначення числа життєздатних клітин в пробі після серійних розведень. Його можна використовувати також для отримання суцільного «газону» мікроорганізмів на поверхні агару після густого посіву. Це зручно при аналізі активності інгібіторів, таких як антибіотики або дезинфікуючі речовини, які додають в зроблені в агарі поглиблення або наносять на диски з фільтрувального паперу, розміщені на поверхні агару. Інгібітор дифундує через агар, утворюючи зону пригнічення росту навколо отворів або дисків фільтрувального паперу, яку видно після інкубації. Діаметр зони може служити мірою ступеня пригнічення.

Для перенесення проби з рідкого середовища, наприклад води, молока або бульйону, в пробірку з живильним середовищем використовують дротяну петлю. Петлю занурюють в середу і м'яко збовтують її, не забуваючи кожного разу прожарювати шийку флакона.

Послідовність дій:

Готують в чашках Петрі тверді пластинки з живильного середовища. Стерильну тверду живильне середовище розплавляють на водяній бані в пробірці або колбі і охолоджують до температури 50 ° С.

Виймають чашки Петрі з паперу, в якій вони стерилізувалися, і ставлять їх на рівну горизонтальну поверхню.

Беруть пробірку або колбу з охолодженої до 50 ° С живильним середовищем, виймають ватяну пробку, обпалюють на полум'ї пальника краю пробірки і тримають її в похилому положенні. Відкривають кришку чашки Петрі лівою рукою, а правою рукою наливають середу на дно чашки Петрі, заповнюючи всю її поверхню.

Залишають чашку Петрі на столі до повного застигання середовища, потім ставлять у термостат на 15-20 хв для підсушування.

На тверду середу посівний матеріал наносять петлею або піпеткою. Потім краплю посівного матеріалу рівномірно розподіляють по поверхні, користуючись стерильним шпателем (зігнутої скляною паличкою). Для цього, шпатель виймають з паперу та беруть в праву руку.

Відкривають кришку чашки Петрі лівою рукою і вносять в неї шпатель.

Розмазують краплю посівного матеріалу шпателем обертальними рухами по поверхні агарового платівки (натискати шпателем на тверду середу не слід, так як можна її пошкодити).

Переносять шпатель в посудину з дезінфікуючим розчином.

посів заливкою - Метод, альтернативний методу посіву на поверхню агару, використовується для інокуляції клітин з рідкої культури, а також для підрахунку життєздатних клітин. Оскільки клітини розподілені по всій середовищі, а не тільки по поверхні агару, можна підрахувати набагато більша їх кількість - до 1000 колоній на чашку. Однак розміри колоній, що вирости значно менше.

Для цього, певний обсяг (до 0,5 см³) Клітинної суспензії вносять в простерилізувати флакон, відповідного обсягу (близько 15- 20 см³) З розплавленим в ньому живильним агаром, який попередньо був охолоджений до 45-50 ° С на водяній бані. Знімають кришку і перед додаванням клітинної суспензії пропалюють шийку флакона. Суспензію клітин ретельно перемішують з поживним агаром, повертаючи (НЕ струшуючи) назад і вперед затиснутий в долонях флакон. Потім виливають суміш в стерильну чашку Петрі. Підписують денце чашки і інкубують її.

Використовується і інший варіант посіву в рідку середу, т.зв. глибинний спосіб посіву:

Відкривають стерильну чашку Петрі і поміщають петлею або піпеткою краплю посівного матеріалу на дно чашки.

Розплавляють щільний живильне середовище в пробірці або колбі і охолоджують її до 45-48 ° С.

Обпалюють краю пробірки або колби в полум'ї пальника і виливають середу в чашку Петрі з внесеним посівним матеріалом, дотримуючись правил стерильної роботи.

Розподіляють рівномірно посівний матеріал в живильному середовищі, для чого обережно круговими рухами переміщують чашку Петрі по поверхні столу.

Залишають чашку Петрі на столі до повного застигання середовища.

Роблять на чашці Петрі напис (число, назва мікроорганізму).

посів уколом використовують для культивування анаеробних організмів або організмів, що ростуть при низькій концентрації кисню (мікроаерофілов). Зазвичай використовують пробірку з живильним агаризованому середовищем. Завдяки невеликій поверхні і досить великій глибині агару в пробірці в порівнянні з чашкою доступ кисню всередину агару обмежується. Посів роблять прямий дротиком (без петлі), або бактеріологічної голкою. Невелика кількість культури (твердої або рідкої) беруть кінчиком голки і потім вертикально проколюють нею агар. Культура росте в агарі на всі боки від лінії проколу.

Всі посіви, виконані описаними способами, поміщають в термостат для вирощування мікроорганізмів при температурі, сприятливій для їхнього росту.

Далі проводять пересів культури.

Пересівши мікроорганізмів, вирощених на твердому середовищі в пробірках, в інші пробірки з середовищем виконується в певній послідовності:

На пробірці зі свіжою живильним середовищем розбірливо підписують назву мікроорганізму, ставлять дату посіву. Написи роблять чорнилом по склу або склаграфом.

Запалюють пальник. Посіви проводять над полум'ям пальника, щоб тепле повітря перешкоджав осадження мікроорганізмів з навколишнього повітря і частково їх знищував.

Беруть і праву руку бактеріологічну петлю, за допомогою якої здійснюють посів (петлю тримають як олівець).

Стерилізують бактеріологічну петлю в полум'ї пальника, прожарюючи дріт до червоного, і одночасно обпалюють примикає до петлі частина держателя, який буде вводиться в пробірку з культурою мікроорганізмів. При прожаренні петлю тримають в полум'я майже вертикально, щоб вся дріт була розпечена.

Беруть в ліву руку дві пробірки: одну зі стерильною середовищем (далі від себе), іншу - з культурою мікроорганізмів (ближче до себе).

Не випускаючи бактеріологічної петлі в правій руці, мізинцем і безіменним пальцем правої руки притискають зовнішні кінці ватних пробок до долоні і виймають пробки з пробірок. Класти пробки на стіл не можна.

Злегка обпалюють у полум'ї пальника краю відкритих пробірок.

Вводять в пробірку з культурою мікроорганізмів петлю. Щоб не пошкодити клітини мікроорганізмів, петлю спочатку охолоджують, торкаючись до внутрішньої поверхні пробірки або до живильному середовищі, вільної від клітин мікроорганізмів, і тільки після цього відбирають невелику кількість мікробної маси.

Виймають петлю і вводять її в пробірку зі стерильною живильним середовищем, уникаючи дотику зі стінками пробірки.

Проводять петлею від дна вгору зигзагоподібну або пряму лінію-штрих, злегка торкаючись поверхні агару.

Обпалюють ватяні пробки і краю пробірок одночасно в полум'я і закривають обидві пробірки.

Обпалюють петлю в полум'я.

Пересівши культур мікроорганізмів, вирощених в рідкому середовищі, Виконується з урахуванням особливостей характеристик середовища:

З стерильною папери виймають градуированную стерильну піпетку за верхній кінець. Беруть піпетку середнім і великим пальцями правої руки, не торкаючись поверхні тієї частини піпетки, яка буде вводиться в посудину з рідким середовищем.

Беруть в ліву руку пробірку (або колбу) з культурою мікроорганізмів, вирощеної в рідкому середовищі, і тримають її в вертикальному положенні, щоб не замочити пробку.

Відкривають пробку, дотримуючись усіх правил стерильності, описані вище, і вводять піпетку в пробірку.

Набирають в піпетку суспензію мікроорганізмів, закривають пробкою пробірку (або колбу), вносять певну кількість суспензії в свіжу стерильну живильне середовище, дотримуючись описані правила обережності.

Піпетку поміщають в посудину з дезінфікуючим розчином (0,5-3% -м водним розчином хлораміну або 3-5% -м водним розчином фенолу), не торкаючись нею навколишніх предметів.

При використанні цих методів іноді виходять не чисті, а змішані культури. Це є результатом того, що колонії можуть утворитися не з однієї, а з двох або декількох клітин, що потрапили в одну точку. Тому метод виділення чистих культур вимагає двох-або триразового повторення виділення культур з однієї колонії. Для виділення

чистих колоній бактерій з суміші бактерій застосовують посів на тверду середу штрихом, або посів розведенням. Для виділення чистих культур багатьох бактерій використовують **МПА**, Для дріжджів - сусло-агар.