3.03.23.

05 група

Методи мікробіологічних досліджень

Тема:.Чисті культури мікроорганізмів. Методи виділення чистих культур .

Чистої культурою називається популяція бактерій одного виду або одного різновиду, вирощена на живильному середовищі. Багато видів бактерій підрозділяють за однією ознакою на біологічні варіанти - біовари. Біовари, що розрізняються за біохімічними властивостями, називають хемоварамі, за антигенними властивостями - сероварами, по чутливості до фагу - фаговаров. Культури мікроорганізмів одного і того ж виду, або биовара, виділені з різних джерел або в різний час з одного і того ж джерела, називають штамами, які зазвичай позначаються номерами або будь-якими символами. Чисті культури бактерій в діагностичних бактеріологічних лабораторіях отримують з ізольованих колоній, пересіваючи їх петлею в пробірки з твердими або, рідше, рідкими живильними середовищами.

Колонія являє собою видиме ізольоване скупчення особин одного виду мікроорганізмів, що утворюється в результаті розмноження однієї бактеріальної клітини на щільному живильному середовищі (на поверхні або в глибині її). Колонії бактерій різних видів відрізняються один від одного по своїй морфології, кольором та іншими ознаками.

Чисту культуру бактерій отримують для проведення діагностичних досліджень - ідентифікації, яка досягається шляхом визначення морфологічних, культуральних, біохімічних та інших ознак мікроорганізму.

Морфологічні та тинкторіальних ознаки бактерій вивчають при мікроскопічному дослідженні мазків, забарвлених різними методами, і нативних препаратів.

Культуральні властивості характеризуються поживними потребами, умовами і типом росту бактерій на щільних і рідких поживних середовищах. Вони встановлюються по морфології колоній і особливостям зростання культури.

Біохімічні ознаки бактерій визначаються набором конститутивних і індуцибельних ферментів, властивих певного роду, виду, варіанту. В бактеріологічній практиці таксономическое значення мають найчастіше сахаролитические і протеолітичні ферменти бактерій, які визначають на диференційно-діагностичних середовищах.

При ідентифікації бактерій до роду та виду звертають увагу на пігменти, що забарвлюють колонії і культуральне середовище в різноманітні кольори. Наприклад, червоний пігмент утворюють Serratia marcescens, золотистий пігмент - Staphylococcus aureus (золотистий стафілокок), синьо-зелений пігмент - Pseu-domonas aeruginosa.

Для встановлення биовара (хемовара, серовар, фаготип) проводять додаткові дослідження по виялвеніб відповідного маркера - визначення ферменту, антигену, чутливості до Фанам.

Методи виділення чистих культур бакте¬рій.

Універсальним інструментом для виробництва посівів є бактеріальна петля. Крім неї, для посіву уколом застосовують спеціальну бактеріальну голку, а для посівів на чашках Петрі - металеві або скляні шпателі. Для посівів рідких матеріалів поряд з петлею використовують пастерівські і градуйовані піпетки. Перші попередньо виготовляють з стерильних легкоплавких скляних трубочок, які витягають на полум'я у вигляді капілярів. Кінець капіляра відразу ж запаюють для збереження стерильності. У пастерівських і градуювальних піпеток широкий кінець закривають ватою, після чого їх поміщають в спеціальні пенали або обгортають папером і стерилізують.

При пересеве бактеріальної культури беруть пробірку в ліву руку, а правою, обхопивши ватяну пробку IV і V пальцями, виймають її, проносячи над полум'ям пальника. Утримуючи іншими пальцями тієї ж руки петлю, набирають нею посівний матеріал, після чого закривають пробірку пробкою. Потім в пробірку зі скошеним агаром вносять петлю з посівним матеріалом, опускаючи її до конденсату в нижній частині середовища, і зигзагоподібним рухом розподіляють мате ріал по скошеної поверхні агару. Вийнявши петлю, обпалюють край пробірки і закривають її корком. Петлю стерилізують в полум'ї пальника і ставлять в штатив. Пробірки з посівами надг підписується, вказуючи дату посіву і характер посівного матеріалу (номер дослідження або назва культури).

+Посіви «газоном» виробляють шпателем на поживний агар в чашці Петрі. Для цього, відкривши лівою рукою кришку, петлею або піпеткою наносять посівний матеріал на поверхню поживного агару. Потім проводять шпатель через полум'я пальника, остуджують його про внутрішню сторону кришки і розтирають матеріал по всій поверхні середовища. Після інкубації посіву з'являється рівномірний суцільний ріст бактерій.

Виділення чистих культур мікроорганізмів є необхідним для правильного уявлення про їх морфологічні, культуральні і фізіолого-біохімічні властивості для визначення видової належності.

Виділення чистої культури включає три етапи:

1. Одержання накопичувальної культури.
2. Виділення чистої культури.
3. Визначення чистоти виділеної культури.

Для одержання накопичувальної культури певного виду бактерій використовують елективні поживні середовища і здійснюють посів досліджуваного субстрату.

Метод Коха. Чисту культуру із накопичувальної одержують з окремої колонії. Для цього із накопичувальної культури після її розведення здійснюють посів на тверде середовище за методом Коха. Кожну колонію, що виросла, вважають потомством однієї клітини. Біомасу з окремих, добре ізольованих колоній відсівають петлею в пробірки на поверхню

зкошеного твердого поживного середовища. Чистоту культури перевіряють одночасно декількома способами: візуально, мікроскопуванням і висівом на поживних середовищах.

При візуальному контролі визначають характер росту культури на поверхні штриха на зкошеному агарі : якщо він однорідний, то культура вважається чистою, якщо неоднорідною - забрудненою.

Мікроскопічний контроль: якщо в препараті всі клітини морфологічно однорідні, культура чиста.

Чистоту культури перевіряють також посівом на поживні середовища. Однорідність характеру росту колоній свідчить про чистоту виділеної культури. Набір середовищ визначається особливостями виділених мікроорганізмів і їх можливих супутників.

Етапи виділення чистих культур

Перший день (I етап дослідження)у стерильний посуд (пробірка, колба, флакон) забирають патологічний матеріал, вивчають за зовнішнім виглядом, консистенцією, кольором, запахом, готують мазок, фарбують і досліджують під мікроскопом. Посів проводять бактеріологічною петлею, за допомогою шпателя за методом Дригальського, ватно-марлевим тампоном. Чашки закривають, перевертають догори дном, підписують спеціальним олівцем, ставлять у термостат при оптимальній т (37 °С) на 18-48 год. Мета — одержати ізольовані колонії мікроорганізмів.

Другий день (II етап дослідження)на поверхні щільного живильного середовища мікроорганізми утворюють суцільний, густий ріст/ізольовані колоніїЧашки ретельно розглядають, вивчають ізольовані колонії, що виросли на поверхні агару Характеристика колоній – важлива складова частина роботи, мікроорганізмам кожного виду притаманні свої особливі колонії.. З підозрілих колоній готують мазки, забарвлюють за методом Грама для вивчення морфологічних та тинкторіальних властивостей збудників, досліджують рухомість бактерій у "висячій" чи "надавленій" краплі. Рештки досліджуваних колоній знімають із поверхні середовища, засівають на скошений агар/на сектори чашки Петрі із живильним середовищем для одержання чистої культури. Пробірки/ чашки з посівами – у термостат при оптимальній температурі на 18-24 год.

Виготовляється мазок, забарвлюється, досліджується, а мікроорганізми засіваються петлею на поверхню щільного живильного середовища для одержання ізольованих колоній. **Третій день (III етап дослідження)**вивчають характер росту чистої культури мікроорганізмів, ідентифікують.

На підставі вивчення морфологічних, культуральних, біохімічних, антигенних, біологічних та інших властивостей мікробів роблять остаточний висновок про ідентифікацію**.**

Д/З Опрацювати тему.