

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 штамми, 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 тинкторіальні 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 індукцибельних ферментів, властивих певного роду, виду, варіанту. В бактеріологічній практиці таксономічне значення мають найчастіше сахаролітичні 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 - *Pseudomonas aeruginosa*.

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

Методи виділення чистих культур бактерій.

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 шпатели. 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 градувальних 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 матеріал 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-марлевым 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 колонії Чашки ретельно розглядають, вивчають ізольовані колонії, що вирости 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.