МИКРОБИОЛОГИЯ, ВИРУСОЛОГИЯ И ИММУНОЛОГИЯ

РУКОВОДСТВО К ЛАБОРАТОРНЫМ ЗАНЯТИЯМ

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

Под редакцией
профессора В.Б. Сбойчакова, доцента М.М. Карапаца

Министерство образования и науки РФ

Рекомендовано ГОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» в качестве учебного пособия для студентов учреждений высшего профессионального образования, обучающихся по специальностям 060101.65 «Лечебное дело» и 060103.65 «Педиатрия» по дисциплинам «Микробиология, вирусология», «Иммунология»; по специальности 060105.65 «Медико-профилактическое дело» по дисциплине «Микробиология. Вирусология. Иммунология»; по специальности 060201.65 «Стоматология» по дисциплинам «Микробиология. Вирусология», «Иммунология»

Регистрационный номер рецензии 143 от 11 мая 2011 года
ФГУ «Федеральный институт развития образования»

Москва
ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА
«ГЭОТАР-Медиа»
2015

Занятие № 3

ФИЗИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ БАКТЕРИЙ. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ. ЭТАПЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР АЭРОБНЫХ И АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ

Знание физиологии и методов идентификации чистых культур бактерий является основой микробиологической диагностики инфекционных болезней. Питательные среды необходимы для выделения и идентификации микробов.

Цель занятия

Изучение физиологии и биохимии микробных клеток, освоение методов выделения чистых культур аэробных и анаэробных микроорганизмов, методов идентификации чистых культур.

Студент должен знать

1. Особенности питания и дыхания бактерий.
2. Фазы роста и размножения бактерий в жидкой питательной среде.
3. Основные питательные среды.
4. Технику приготовления основных питательных сред.
5. Получение чистых культур аэробных и анаэробных бактерий.
6. Методы идентификации бактерий.

Студент должен уметь

1. Владеть техникой посевов и пересевов бактериальной петлей, иглой, пипеткой и шпателем.
2. Приготовить питательные среды и определить pH.
3. Выделить различными методами чистую культуру аэробных и анаэробных бактерий.
4. Идентифицировать выделенную бактериальную культуру по культуральным и биохимическим признакам.

Культивирование микроорганизмов в лабораторных условиях

В природе микроорганизмы существуют в смешанной популяции. Для изучения свойств микроорганизмов и определения их системати-

ческого положения необходимо прежде всего изолировать отдельные виды микробов и вырастить их в виде так называемых «чистых культур», а затем идентифицировать, то есть установить соответствие выделенных микроорганизмов видам, описанным в специальных определителях.

Под понятием *«чистая культура»* подразумевается масса клеток, состоящая из микроорганизмов, принадлежащих одному виду и полученных как потомство одной клетки (см. схему 1).

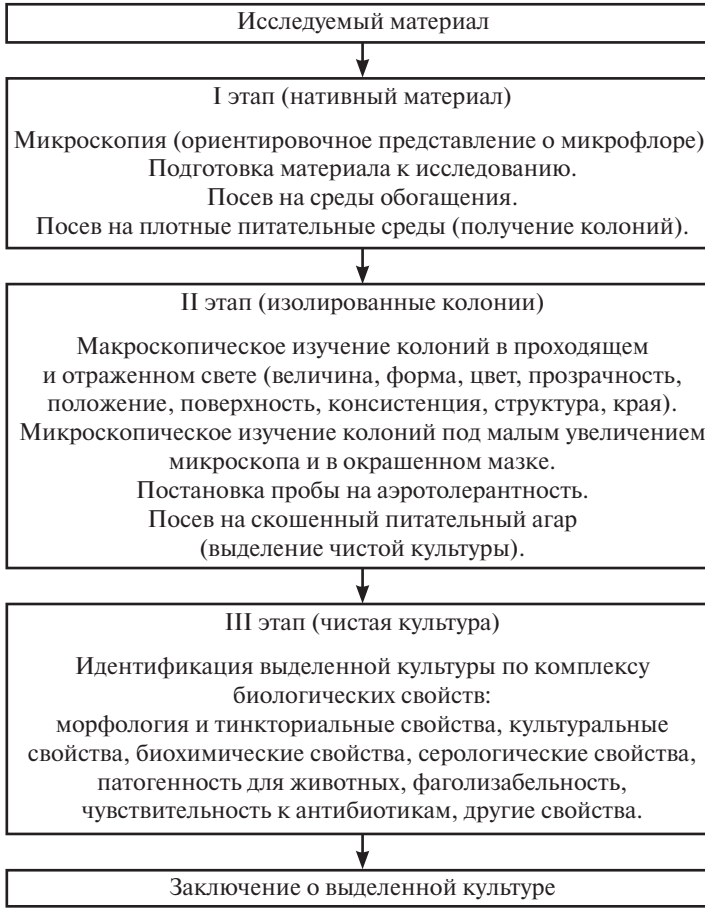

Схема 1. Выделение и идентификация чистых культур аэробных и анаэробных бактерий

Штамм — культура бактерий одного вида, выделенная из разных источников в разное время.

Вид — совокупность микроорганизмов, имеющих единое происхождение и генотип, сходных по морфологическим и биологическим свойствам.

Культивировать микроорганизмы можно лишь при создании определенных условий для их жизнедеятельности. Искусственные условия, которые исключили бы загрязнение культуры другими видами, можно создать в пробирке, колбе или чашке Петри.

Вся посуда и питательные среды должны быть простерилизованы и после посева инокулята (микробного материала, используемого для посева) защищены от загрязнения извне, что достигается с помощью пробок или металлических колпачков и крышек.

Посев инокулята

Посев инокулята является первым этапом исследования. В практической работе для получения чистых культур микроорганизмов используют одну из модификаций метода высева на чашки со средой. Эти методы основаны на том, что отдельные микроорганизмы иммобилизуются на поверхности или в глубине питательной среды, в которую добавлен агар или какое-нибудь другое гелеобразующее вещество.

Посев петлей. Посевной материал втирают петлей в поверхность среды у края чашки, избыток снимают, проколов петлей агар, а оставшийся материал рассеивают параллельными штрихами по стерильной поверхности среды (рис. 8).

Посев шпателем. Материал наносят на поверхность среды петлей или пипеткой, а затем стеклянным или металлическим шпателем тщательно втирают его по всей поверхности агара. При этом левой рукой придерживают слегка приоткрытую крышку и одновременно вращают чашку. После посева металлический шпатель прокаливают в пламени горелки, а стеклянный помещают в дезинфицирующий раствор.

Посев тампоном. Тампон с исследуемым материалом вносят в чашку и круговыми движениями втирают его содержимое в поверхность среды, одновременно вращая тампон и чашку.

Посев на секторы. Дно чашки расчерчивают на секторы, посев производят зигзагообразными движениями от края чашки к центру так, чтобы штрихи с одного сектора не переходили на другой.

Посев газоном. 1 мл исследуемого материала (жидкая бульонная культура или взвесь микробов в физиологическом растворе) наносят пипеткой на поверхность среды и тщательно распределяют жидкость по всей

Рис. 8. Посев материала петлей на плотную питательную среду

ее поверхности. Избыток материала отсасывают пипеткой и вместе с ней помещают в дезинфицирующий раствор.

После посева чашки закрывают и переворачивают их вверх дном. Надписи на чашках делают со стороны дна, а на пробирках — в верхней части.

При посеве инокулята из пробирки в пробирку обе пробирки (с посевным материалом и со средой) держат слегка наклонно в левой руке между большим и указательным пальцами так, чтобы края пробирок были на одном уровне. Бактериальную петлю держат как авторучку. Петлю вертикально прокаливают в пламени горелки. Пробки из пробирок вынимают правой рукой, зажимая их между мизинцем и ладонью. Вынув пробки, края пробирок обжигают в пламени горелок. Прокаленную петлю вводят через пламя горелки в пробирку с посевным материалом, охлаждают и, набрав небольшое количество посевного материала, осторожно переносят его в пробирку со средой.

При посеве на жидкую среду петлю слегка погружают в жидкость и растирают посевной материал на стенке пробирки, после чего смывают его средой.

Для посева жидкого материала можно использовать стерильные пипетки (пастеровские или градуированные).

При посеве на скошенный агар материал наносят штрихообразными движениями снизу вверх, начиная с конденсационной воды, а если агар или желатин разлит в пробирки столбиком, то посев производят уколом, прокалывая петлей с посевным материалом столбик до дна.

После посева петлю извлекают из пробирки, пробирку закрывают, предварительно проведя ее края через пламя горелки. Петлю прокаливают.

При выделении чистых культур аэробов можно использовать не только методы, основанные на механическом разобщении бактерий, но и методы, основанные на различиях бактерий по биологическим свойствам. Так, например, некоторые подвижные бактерии могут быстро распространяться по слегка влажной поверхности питательной среды, благодаря этому можно очистить их от неподвижных видов микробов.

Иногда при выделении микроорганизмов из природных популяций полезно включить в среду вещества, избирательно подавляющие рост тех или иных микробов. Например, добавление полиеновых антибиотиков (нистатина) в среду используется для очистки бактериальных культур, сильно загрязненных грибами.

Посевы инкубируются в термостате 18–24 ч. В течение этого времени из отдельных микробных клеток формируются изолированные колонии.

Колония — это популяция микробных клеток одного вида, сформировавшаяся в результате деления одной микробной клетки в условиях культивирования на плотной питательной среде при оптимальной температуре.

Изучение изолированных колоний и отвивка чистых культур

Изучение изолированных колоний составляет второй этап исследования. Строение колоний является важным культуральным признаком при определении вида микроорганизмов, так как каждому виду микробов при росте на определенной плотной питательной среде присуща типичная форма колонии.

Колонии изучают невооруженным глазом в проходящем и отраженном свете и с помощью лупы или под микроскопом при малом увеличении.

В проходящем свете колонии рассматривают со стороны дна чашки. Отмечают величину колоний (крупные — от 4–5 мм в диаметре и более; средние — 2–4 мм; мелкие — 1–2 мм; карликовые — меньше 1 мм), их форму (правильная, круглая, неправильная, плоская, сферическая) и прозрачность.

В отраженном свете, рассматривая колонии со стороны крышки, определяют цвет (бесцветная, окрашенная), характер поверхности (гладкая, бугристая, блестящая, матовая), расположение колоний на поверхности среды (выпуклое, плоское, вдавленное).