

МИНИСТЕРСТВО ОБЩЕГО И ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
Кафедра биологической химии

ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ
ПО МИКРОБИОЛОГИИ

Часть 2



ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ БАКТЕРИЙ

для студентов биологического факультета дневного отделения

Издательство "Самарский университет"
1997

Практикум отражает круг вопросов, предусмотренных программой изучения дисциплины "Микробиология и вирусология" на биологическом факультете университета. Доступное изложение теоретического материала и детальные пояснения к выполнению лабораторных занятий позволяет студентам ознакомиться с методами изучения воздушной микрофлоры и выделения чистых культур микроорганизмов из окружающей среды, а также освоить седиментационный метод изучения микроорганизмов из воздуха, выделение чистых культур методом Коха, освоить технику посева и пересева микроорганизмов на плотные и жидкие среды, окраску клеток методом Грама.

Практикум предназначен для студентов биологических факультетов университетов и биологов, желающих освоить микробиологические приемы и методы исследования.

Составитель ст. преподаватель Н.А.Трещанина

Ответственный редактор канд. биол. наук, доц. Ю.П. Фролов.

Рецензент доктор биол. наук, профессор М.М. Серых

ПРЕДИСЛОВИЕ

Настоящее практикум включает в себя три раздела. Первый раздел посвящен описанию приемов работы с чистыми культурами микроорганизмов, технике микроскопирования препаратов, принципам составления питательных сред и способам стерилизации, который позволяет студентам освоить основные приемы работы с микроорганизмами и ознакомиться с морфологией эукариотических и прокариотических клеток.

Во втором разделе дается подробное описание метода выделения чистых культур микроорганизмов по методу Коха и другими способами, а также описание идентификации бактерий по методу Грама. Данный раздел позволит студентам освоить технику посева и пересева микроорганизмов на плотные и жидкие среды, изучить количественный и качественный состав воздушной микрофлоры, освоить метод выделения чистых культур бактерий путем разведений, научиться проводить визуальный и микроскопический контроль чистоты выделяемой культуры, освоить окраску клеток методом Грама.

В каждой лабораторной работе кратко сформулирована цель занятия, описанию практических работ предшествует теоретическое вступление, техника и методика работы, дан перечень оборудования, материалов и реактивов, необходимых для выполнения этих работ. Замечания по технике безопасности даются по ходу изложения конкретных работ. Предлагаемая форма изложения делает практикум более доступным для самостоятельной практической работы студентов.

Настоящий практикум предназначен в качестве дополнения к стандартным учебникам и студенческим конспектам лекций, используемым при изучении данного предмета. Он составлен в соответствии с программой курса "Микробиология и вирусология" для студентов университетов специальности "Биология" и отражает методику преподавания данной дисциплины в Самарском государственном университете.

ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

Чистой культурой микроорганизмов называют популяцию микроорганизмов одного вида, выращенную из клона. *Клоном* называется потомство одной клетки.

Выделение чистой культуры микроорганизмов является обязательным этапом всякого бактериологического исследования. Чистая культура необходима для изучения культуральных, морфологических, физиологических, биохимических, антигенных и других свойств, по совокупности которых определяется видовая принадлежность исследуемого микроорганизма.

Для выделения чистых культур из материалов, содержащих обильную смешанную микрофлору, предложено много различных методов. Наибольшее распространение получил метод механического разъединения микроорганизмов, находящихся в исследуемом материале, с целью получения изолированных колоний на поверхности или в глубине питательной среды. Именно этот метод и предстоит вам освоить на следующих занятиях.

Алгоритм выделения чистой культуры микроорганизмов представлен на Рис.1.

Занятие № 6

ПОСЕВ ВОЗДУШНОЙ МИКРОФЛОРЫ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ. Знакомство с методами посева воздушной микрофлоры. Освоение техники разлива питательных сред в чашки Петри в стерильных условиях.

Бактериологическое исследование воздуха

В *атмосферном воздухе* содержится большое количество – почвенных сапрофитов, попадающих в воздух с мельчайшими частицами почвы. Среди них находятся спорообразующие палочки, пигментные бактерии, плесневые грибы и дрожжи.

В *воздухе закрытых помещений* обнаруживаются микроорганизмы, постоянно выделяемые со слизистых оболочек верхних дыхательных путей человека. От больных, с локализацией патологического процесса в полости рта и верхних дыхательных путях, выделяются патогенные микроорганизмы – гемолитические стрептококки группы А, бактерии дифтерии, коклюша, туберкулеза и др. Если раньше, при исследовании воздуха помещений, большое внимание уделялось определению гемолитических стрептококков как

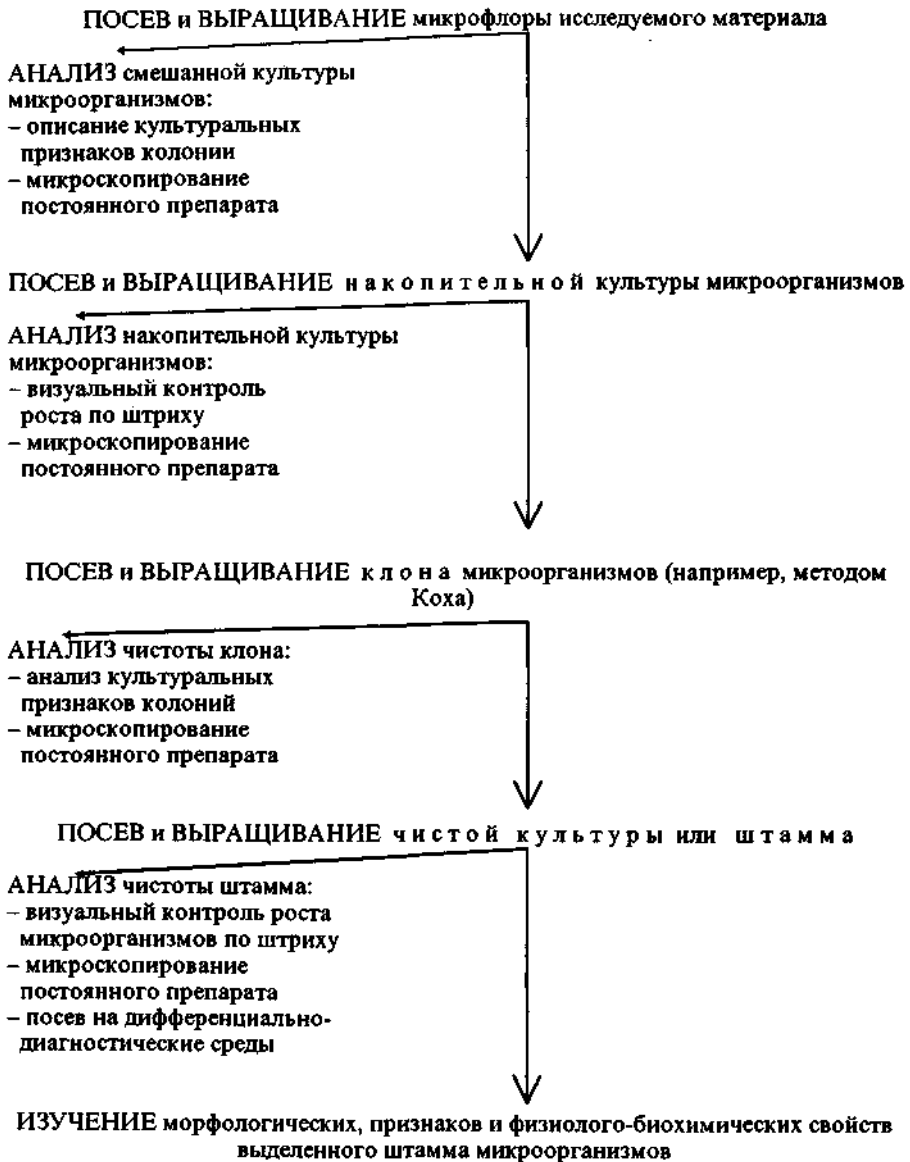


Рис.1 СХЕМА ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

биологического показателя загрязнения воздуха микрофлорой носоглотки человека, то в настоящее время все большее внимание уделяется непосредственному обнаружению патогенных и условно-патогенных микроорганизмов (бактерии, вирусы, плесневые и дрожжевые грибы).

Чаще всего пробы воздуха берутся для выявления возбудителей внутрибольничных инфекций в операционных блоках, послеоперационных палатах, отделениях реанимации, интенсивной терапии и других помещениях, требующих асептических условий. На предприятиях микробиологической промышленности изучается наличие и содержание в воздухе микроорганизмов-продуцентов (црожеподобные грибы рода *Candida* на гидролизно-дрожжевых заводах, плесневые грибы рода *Aspergillus* и споровые бактерии на ферментных заводах, *B. thuringiensis* и сальмонеллы - при производстве бактериальных средств защиты растений и борьбы с грызунами и т. д.). Воздух ясель, детских садов, школ, заводов, кинотеатров и т.д. подвергают бактериологическому исследованию по эпидемическим показаниям с целью проведения дезинфекции помещения.

При исследовании воздуха закрытых помещений большое значение имеет способ выделения микроорганизмов из воздушной среды. В зависимости от принципа улавливания бактерий, микробиологические методы исследования воздуха разделяют на фильтрационные, аспирационные и седиментационные (оседание).

Фильтрационным методом определяют качественный и количественный состав микрофлоры в объеме воздуха с использованием мембранных фильтров. При этом с помощью воздуходувки, через фильтры просасывают воздух, а затем их помещают на питательную среду и выращивают колонии микроорганизмов. Преимуществом метода мембранных фильтров является их портативность, возможность концентрировать на них микроорганизмы из относительно больших объемов воздуха и использовать в зимних условиях при изучении атмосферного воздуха.

Аспирационные методы также дают возможность определить качественное и количественное содержание бактерий в определенном объеме воздуха. Для этого используют прибор Дьякова, ПОВ-1 (прибор для отбора воздуха), ПАБ-2 (пробоотборник аэрозольный бактериологический), бактериоуловители Речменского и Киктенко, и др. Но наиболее широкое распространение находит аспирационный метод с применением аппарата Кротова.

Конструкция аппарата Кротова основана на принципе ударного действия струи воздуха, который при вращении вентилятора засасывается через шель аппарата и с большой скоростью ударяется о влажную поверхность питательной среды. В результате удара находящиеся в воздухе аэрозоли (микроорганизмы, содержащиеся в порции поступающего воздуха, пылевые частицы и капли) прибываются к поверхности среды. Клетки микроорганизмов, попав в питательную среду, начинают размножаться и образуют скопления, видимые невооруженным глазом, называемые колониями. Прибор Кротова эффективен для улавливания микрофлоры в пылевой фазе аэрозоля, дает

четкие сопоставимые результаты, прост в работе, за короткое время позволяет произвести отбор проб воздуха непосредственно на чашки со средами. Основной недостаток прибора состоит в том, что он нуждается для работы в электроэнергии и это ограничивает его применение для исследования атмосферного воздуха.

При отсутствии источника электроэнергии или приборов, можно использовать более простой, но менее точный *седиментационный метод Коха*. Метод основан на оседании бактериальных частиц и капель под влиянием силы тяжести на поверхности среды открытой чашки Петри. Чашки с мясо-пептонной (МПА) или рыбо-пептонной (РПА) средой экспонируют на воздухе от 5 до 15 мин, а с элективных средами - от 30 мин до 1-3-х часов в зависимости от предполагаемого бактериального загрязнения. Однако, на открытых чашках плохо улавливаются тонкодисперсные фракции бактериальных капель и пылевых частиц, а задерживаются, главным образом, крупные пылевые частицы. Кроме того, в атмосферном воздухе наряду с седиментацией большое значение приобретает прибивное действие ветра, при помощи которого крупные пылевые частицы прибиваются к поверхности среды. Все эти причины делают данный метод менее точным для количественного определения микрофлоры в воздухе. Однако, если чашки выдерживают в разных помещениях в одно и то же время, тогда относительно можно судить о чистоте воздуха каждого помещения.

В зависимости от поставленной задачи исследования и условий отбора проб, могут проводиться количественные определения общей бактериальной обсеменённости воздуха, а также определение содержания санитарно-показательных микроорганизмов, патогенных и условно-патогенных форм.

При отборе проб воздуха следует исходить из основных положений: а) *при высоком содержании микроорганизмов в воздухе исследуют небольшие объёмы*; б) *при низком содержании микроорганизмов или необходимости обнаружения патогенных бактерий и вирусов целесообразно использовать большие объёмы воздуха*; в) *пробы воздуха следует отбирать на уровне дыхания сидящего или стоящего человека*.

ОБОРУДОВАНИЕ: чистая стерильная чашка Петри, спиртовка, плитка для плавления среды, термостат, песочные часы.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ: 96°этиловый спирт, коробок спичек, спирт для спиртовки, стерильная рыбо-пептонная агаризованная среда (РПА).

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ: микрофлора воздуха.

ЗАДАНИЕ:

1. Разлить стерильную питательную среду в стерильную чашку Петри, соблюдая условия асептики.
2. Провести посев воздушной микрофлоры методом седиментации в течение 5-10 мин в любой точке зданий университета.
3. Завернуть чашку в бумагу, подписать и поместить в термостат при задан-

ной температуре (*вверх дном*) для выращивания колоний микроорганизмов.

4. Записать в тетради условия посева микрофлоры воздуха (состав среды, место и время посева, время экспозиции) и условия выращивания (температуру и продолжительность культивирования).
5. Отчитаться в выполнении задания перед преподавателем.
6. Убрать свое рабочее место и сдать лаборанту.

Методические указания

Первичный посев материала для исследования производят обычно на плотную питательную среду в чашках Петри так, чтобы вырастить изолированные колонии

Для того, чтобы разлить расплавленную стерильную среду в стерильную чашку Петри необходимо:

1. взять колбу со средой за дно *кончиками пальцев правой руки*;
2. за пламенем спиртовки, в стерильной зоне, вынуть пробку из колбы, прижимая её мизинцем и безымянным пальцами левой руки к ладони и обжечь горло сосуда в пламени;
3. не выпуская пробку из рук, большим, указательным и средним пальцами левой руки приоткрыть крышку чашки Петри и быстро налить в чашку расплавленную среду (около 20 мл) так, чтобы дно чашки было полностью покрыто средой;
4. чашку надо тотчас закрыть крышкой и оставить на горизонтальной поверхности до тех пор, пока не застынет среда;
5. пробку и горло сосуда обжечь в пламени и закрыть колбу за пламенем спиртовки в стерильной зоне;

ВНИМАНИЕ! Техника безопасности. Во избежание несчастных случаев (ожогов, возгорания подручного материала, одежды, водос, и т.п.) необходимо строго соблюдать технику безопасности.

Питательную среду необходимо разливать остывшей до 60-80°С. Горячую колбу со средой не следует брать всей ладонью, а только кончиками пальцев. Можно использовать тканевые перчатки с резиновым покрытием или какой-либо подручный материал. Если загорится пробка, её необходимо быстро вставить в колбу, если загорится край одежды или подручный материал - необходимо быстро прижать их к столу и накрыть асбестовым полотном. *Нельзя при этом кричать, делать резких движений, вскакивать с места, задувать вспыхнувший материал.*

Длинные волосы должны быть аккуратно заколоты и убраны с лица, запястья рук - свободны от одежды, особенно легко воспламеняющейся (синтетика, шерсть). Работать необходимо внимательно, спокойно, не отвлекаясь.

Для посева воздушной микрофлоры необходимо:

1. в исследуемом помещении поместить чашку на горизонтальную поверхность на расстоянии около 1,0-1,5 м от поверхности пола.
2. открыть чашку со стерильной питательной средой на 5-10 мин (точно фиксируя время экспозиции).
3. *следить за тем, чтобы вблизи чашки не ходили и не разговаривали, т. к. это может повлиять на получение достаточно объективных данных.*

Вопросы для самопроверки

1. Для чего изучают микрофлору воздуха? Какие группы микроорганизмов выявляют и в каких случаях?
2. Какие существуют способы отбора микрофлоры воздушной среды? Их достоинства и недостатки?
3. Каков принцип действия аппарата Кротова, его достоинства и недостатки?
4. Каковы недостатки седиментационного метода посева воздушной микрофлоры?
5. Существует ли разница в методических подходах изучения воздушной среды закрытых помещений и атмосферы. Ответ поясните.

Занятие №7

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ УЧЕТ БАКТЕРИЙ В ВОЗДУХЕ. ОПИСАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КОЛОНИИ. ПОСЕВ НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ БАКТЕРИЙ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ. Ознакомиться с методами количественного учета бактерий в воздухе. Изучить рост и культуральные признаки микроорганизмов на плотных питательных средах. Освоить технику посева бактерий.

Количественный учет бактерий в воздухе

Чашки, в которые произвели посев воздушной микрофлоры, инкубируют при заданной температуре и после 48-ми часов культивирования отмечают образующиеся колонии. Учитывая, что некоторые микроорганизмы развиваются медленно, окончательный подсчет выросших колоний проводят на 5-е сутки.

Согласно Омелянскому, на поверхность 100 см² питательной среды за 5 мин оседает такое количество клеток микроорганизмов, которое содержится в 10 л воздуха (0,01 м³).

Учитывая общее число выросших колоний из клеток, осевших из воздуха на чашке со средой за 5 мин, можно рассчитать общее количество клеток в 1 м³ воздуха по формуле:

$$X = A \cdot 100 \cdot 100 \cdot 5 / c \cdot T,$$

где X - количество клеток в 1 м³, A - количество выросших колоний на среде, c - площадь чашки, T - время экспозиции, мин, 5 - время экспозиции в мин для осаждения клеток, содержащихся в 10л воздуха, 100 - площадь 100 см², 100 - коэффициент перевода объема воздуха в м³.

Пример. В чашке Петри диаметром 10 см при экспозиции 10 мин выросло 45 колоний. Площадь чашки равна $3,14 \cdot 5^2 = 78,5 \text{ см}^2$. Чтобы подсчитать число клеток, осевших бы на 100 см^2 (равнозначных 10 л или $0,01 \text{ м}^3$ воздуха), составляют пропорцию: $X_1 = 100 \cdot 45 / 78,5 = 57,3$

Учитывая, что посев проводили в течение 10 мин, определяют сколько клеток осело бы на среду за 5 мин, согласно пропорции: $X_2 = 57,3 \cdot 5 / 10 = 28,7$

Таким образом, в $0,01 \text{ м}^3$ воздуха находится 28,7 клеток, а в 1 м^3 их будет в 100 раз больше, т.е. 2870 клеток.

Чем больше в воздухе пыли, тем больше в нем микроорганизмов. По данным А.Ф. Войкевича, в Арктике под 70° с. ш. в 1 м^3 воздуха обнаруживается от 1 до 10 клеток. Морской воздух в таком же объеме содержит 1-2 клетки, городской парк - 200, городская улица - 5000, жилое помещение - 20 тыс., скотный двор 1-2 млн.

2. Ф о р м а к о л о н и и – округлая, круглая с фестончатым краем, круглая с валиком по краю, круглая с ризоидным краем, неправильная, ризоидная, амёбовидная, нитевидная, стелющаяся, грибовидная, сложная и т. д.

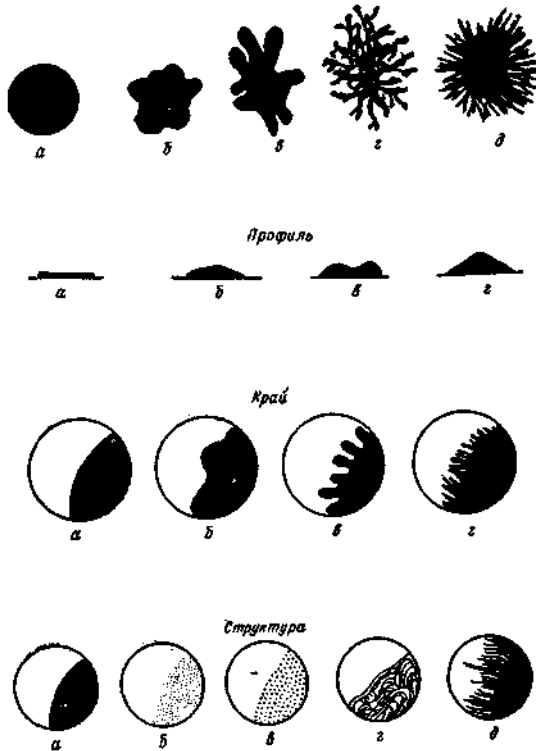


Рис. 57. Характеристика колоний:

Форма колоний: а - округлая, б - неправильной формы, в - амёбовидная, г - ризоидная, д - мицелиальная;

Профиль колоний: а - плоский, б - выпуклый, в - кратерообразный, г - конусовидный;

Край колоний: а - ровный, б - волнистый, в - лопастной, г - бахромчатый;

Структура колоний: а - однородная, б - мелкозернистый, в - крупнозернистая, г - струйчатая, д - волокнистая.

3. Поверхность колонии - гладкая, шероховатая, бороздчатая, складчатая, морщинистая, с концентрическими кругами или радиально исчерченная и т.п.

4. Профиль колонии - изогнутый, бугристый, плоский, выпуклый, кратерообразный (выпуклый с вдавленным центом), каплевидный, конусовидный и т. д.

5. Блеск и прозрачность - блестящая, матовая, тусклая, мучнистая, прозрачная.

6. Цвет колонии - бесцветная (грязно-белые колонии относятся к бесцветным) или пигментированная - белая, желтая, золотистая, оранжевая, сиреневая, красная, черная и т.д. Отмечают цвет колонии и выделяется или не выделяется пигмент в среду.

8. Край колонии - ровный, волнистый, зубчатый, бахромчатый, лопастной, неправильный, реснитчатый, нитчатый, ворсистый, ветвистый, резко очерченный и т. д. - этот признак определяют при малом увеличении микроскопа или с помощью лупы. Чашку помещают на столик микроскопа, как указано выше.

9. Структуру колонии - однородная, мелко- или крупнозернистая, струйчатая и т.д. Данную характеристику определяют также при малом увеличении микроскопа или с помощью лупы (как указано выше).

___10. Консистенцию колонии определяют, прикасаясь к ее поверхности петлей. Колония может легко сниматься с агара и быть: плотной, мягкой, врастающей в агар, слизистой (прилипает к петле), тягучей, волокнистой (снимается целиком), хрупкой (легко ломается от соприкосновения с петлей).

Кроме того, отмечают способность колонии эмульгироваться - одни колонии образуют в физиологическом растворе гомогенную взвесь, у других взвесь зернистая или в виде обрывков пленок.

Полученные из исследуемого материала изолированные колонии, после проведенного анализа, могут служить как для получения накопительной, так и чистой культуры изучаемых микроорганизмов.

ПОЛУЧЕНИЕ НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ БАКТЕРИЙ

Культуры называются *накопительными*, в которых преобладают преимущественно представители одной группы или даже одного вида микроорганизмов.

С целью получения накопительных культур создают *элективные условия*, обеспечивающие преимущественное развитие выделяемых микроорганизмов. При создании таких условий учитывается неодинаковое отношение различных микроорганизмов к условиям окружающей среды, например, составу и кислотности питательной среды, температуре, аэрации и т. д.

Если свойства выделяемой культуры неизвестны, используют натураль-

ные среды, если особенности обмена веществ, выделяемых штаммов известны, создают элективные условия, подбирая соответствующие среды или условия культивирования. Например, микроорганизмы, фиксирующие азот, выращивают на безазотистой среде. Если внести в такую среду почвенный образец, то громадное разнообразие имеющихся в ней микроорганизмов, не способных ассимилировать молекулярный азот, развиваться не смогут. Накопительные культуры автотрофных микроорганизмов получают на средах, где единственным источником углерода является углекислота. Экстремальные галофильные бактерии выращивают на средах, в которых содержится 4-5 М хлористый натрий, а снижение концентрации соли в среде приводит к гибели этих бактерий. Такие специфические *питательные среды, удовлетворяющие потребностям преимущественно одной группы микроорганизмов, называются элективными.*

Достаточно часто, для создания элективных условий, используют и физические факторы, влияющие на рост тех или иных микроорганизмов. Так, для аэробных форм, среду разливают тонким (1,5-2,0 см) слоем в колбы или их выращивают в колбах на качалках, увеличивая тем самым аэрацию среды. Культуры облигатных термофильных организмов выращивают при 45-65°C, в некоторых случаях - при 70-75°C, а экстремальные термофильные бактерии предпочитают температуру выше 100°C т. д.

О получении накопительной культуры судят визуально по помутнению жидкой среды, появлению пленки, осадка, пузырьков газа или налета клеток на плотной среде. Помимо визуальной оценки, культуры микроскопируют и выявляют присутствие выделяемых форм.

Техника посева

При пересеве клеток микроорганизмов с одной среды на другую все манипуляции всегда проводят вблизи пламени (но не в пламени!) по возможности быстро, чтобы не загрязнить культуру посторонними микроорганизмами. При взятии материала пробирки (колбы) необходимо удерживать в наклонном положении, чтобы гарантировать стерильность культуры. Если держать их вертикально, то возможно попадание посторонних клеток микроорганизмов.

Если организмы высевают на плотную скошенную питательную среду, то бактериологической петлей или иглой с культурой, по поверхности среды проводят прямую или волнообразную черту (легким движением, не разрезая среды). Такой способ называется посев ш т р и х о м . Зигзагообразный штрих проводят в тех случаях, когда надо получить больше посевного материала (для смывов и т.д.). Если культуру высевают в столбик питательной среды, то петлю или иглу вводят в центральную часть, в толщу среды до дна пробирки - посев у к о л о м .

Культуру помещают в термостат при соответствующей температуре. Наблюдения за её развитием ведут ежедневно до тех пор, пока она не перестанет

изменяться визуально и проводят описание роста микроорганизмов по штриху или по проколу.

Если посев делают в жидкую среду (или из жидкой среды), лучше пользоваться пипеткой или петлей. *Пробирки держат слегка наклонив, чтобы не замочить их края и пробки.* Петлю или пипетку с клетками микроорганизмов погружают непосредственно в среду. Перед тем как закрыть пробирки, пробки и края пробирок обжигают в пламени.

ВНИМАНИЕ! Техника безопасности. Все описанные выше манипуляции проводят около пламени горелки, соблюдая необходимые меры предосторожности случайного загрязнения культуры, как указано в занятии №6.

ОБОРУДОВАНИЕ: МИКРОСКОП С-11, осветитель ОИ-31, удлинитель с розетками, термостат, кристаллизатор со стеклянным мостиком, спиртовка, капельницы, колба, штатив, бактериологическая петля, песочные часы, масштабная линейка.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ: 96°этиловый спирт, спирт-эфирная смесь, иммерсионное масло, раствор водного фуксина, вода для приготовления препарата (в капельнице), вода для промывания препарата (в колбе), коробок спичек, хлопчатобумажная (х/б) ткань для микроскопа, набор для приготовления препаратов (предметные стекла, кусочек сухого мыла, х/б тряпочка для стекол, полоски фильтровальной бумаги), пробирка со скошенным РПА.

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ: выросшие колонии в чашке Петри.

- ЗАДАНИЕ:**
1. Проанализировать смешанную культуру микроорганизмов: провести подсчет выросших колоний по размеру и цвету, количество мицелиальных и бактериальных колоний. Рассчитать общее количество микроорганизмов в 1 м³ исследуемого воздуха и %-ное содержание бактериальных и мицелиальных форм в 1 м³ исследуемой воздушной среды.
 2. Подробно описать культуральные признаки одной бактериальной колонии, выбранной для дальнейшей работы.
 3. Приготовить, промикроскопировать и зарисовать постоянный препарат бактерий из описанной колонии (окраска водным фуксином в течение 3-5 мин, объектив 90х) Просмотреть не менее 10-ти полей зрения, отметить все формы, типы скоплений клеток и их особенности.
 4. Пересеять часть клеток, выбранной колонии, в пробирку на стерильный скошенный РПА и поместить в термостат при заданной температуре. В тетради отметить условия посева (состав среды, способ посева) и условия выращивания (температуру и продолжительность культивирования) накопительной культуры.
 5. Отчитаться в выполнении задания перед преподавателем.
 6. Завернутые и подписанные чашки со смешанной культурой оставить при комнатной температуре до получения накопительной.
 7. Промикроскопированные препараты поместить в кристаллизатор с дезинфицирующим раствором.
 8. Убрать свое рабочее место и сдать его лаборанту.

Методические указания

1. Если количество выросших точечных и мелких колоний на чашке достаточно велико, то их подсчет можно провести с помощью автоматического прибора для подсчета колоний.

2. При изучении культуральных признаков колонии описать сначала первые девять признаков, а затем, в асептических условиях, часть клеток пересеять на стерильную среду и приготовить мазок для постоянного препарата. Во время этих процедур выяснить консистенцию колонии.

3. Если не смогли определить край и структуру колонии, то после посева клеток, чашку поместите на столик микроскопа с открытой крышкой и рассмотрите оставшуюся часть колонии при малом увеличении.

Для *пересева клеток* на скошенный РПА необходимо:

1. прокалить бактериологическую петлю и около пламени спиртовки приподнять крышку чашки Петри.

2. остудив петлю о питательную среду, захватить часть клеток колонии, выбранной для дальнейшей работы и закрыть чашку Петри.

3. в левую руку взять пробирку со свежей средой (так, чтобы видеть всю поверхность скошенной среды) и держать почти горизонтально. Петлю с клетками ввести почти до дна пробирки и, слегка касаясь поверхности агара, провести вверх прямую или зигзагообразную черту - штрих. *Поверхность агара не должна быть залита конденсационной водой, иначе получится сплошной рост. Важно, чтобы штрих был проведен ровно через всю поверхность питательной среды, в противном случае будет трудно отметить характерные свойства посевной черты.*

4. пробку и края пробирки обжечь в пламени и закрыть пробирку. Бактериологическую петлю тщательно прокалить и поместить в штатив.

5. на пробирке необходимо тщательно надписать свою фамилию или другие обозначения, понятные вам, и дату посева. *Надпись делают чернилами по стеклу или маркером.* После чего пробирку с культурой помещают в термостат, наблюдения за её развитием ведут ежедневно до тех пор, пока она не перестанет изменяться визуально.

ВНИМАНИЕ! Техника безопасности. Посев (или пересев) микроорганизмов требует соблюдения определенных правил, которые необходимо выполнять, чтобы предохранить исследуемую культуру от загрязнения посторонними микроорганизмами. Поэтому всю работу необходимо проводить в стерильной зоне пламени, соблюдая технику безопасности, как указано в заданиях №3 и №6.

Вопросы для самопроверки

1. Из каких этапов складывается выделение чистых культур микроорганизмов? Можно ли сократить некоторые из них и в каких случаях?

2. Что такое смешанные культуры? Как их получить?
3. Что такое культуральные признаки? В каких случаях их изучают и для чего?
4. Что такое накопительные культуры и как их выращивают?
5. Чем отличаются элективные условия от элективных питательных сред?
6. Для каких культур и с какой целью можно применять элективные условия и элективные среды?
7. Какая разница между дифференциально-диагностическими и элективными средами?

Занятие № 8

АНАЛИЗ НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ БАКТЕРИЙ. ПОСЕВ и ВЫРАЩИВАНИЕ КЛОНА МЕТОДОМ КОХА

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ. Освоить анализ роста бактерий по штриху. Ознакомиться и овладеть техникой механического разъединения бактерий (приготовление разведений) для получения изолированных колоний на поверхности питательной среды.

Наблюдение и описание роста культур по штриху

Рост культур на питательном агаре. Описание штриха производят тогда, когда рост кончился. Отмечают следующие признаки:

М о щ н о с т ь и ф о р м ы роста: *скудный, умеренный, обильный*. Скудный или *слабый* рост дает еле заметную узкую черточку на поверхности; умеренный или *ограниченный* рост, идущий лишь полоской по проведенной черте (его предельная форма – нитевидный рост) и обильный или *затягивающий* рост – неограниченный, покрывающий всю поверхность питательной среды. Между ними идут различные по мощности переходные формы ограниченного роста. Некоторые бактерии дают как бы комбинированную форму штриха: снизу как-будто затягивающий, сверху – ограниченный или даже нитевидный, такая форма роста свидетельствует о большой потребности исследуемого микроорганизма во влаге.

Ф о р м а к р а я: *ровный, гладкий, волнистый, четковидный в виде цепочки изолированных колоний, диффузный, лопастной, лопаточно-волосистый, перистый, древовидный или ризоидный* и т.п.

П р о ф и л ь р о с т а (макрорельеф) может быть совершенно *плоский* и если при этом толщина штриха ничтожна, то его обозначают как *пленчатый* штрих. У пленчатых культур наблюдается иногда своеобразная игра цветов (цвета тонких пластинок) – иризация. Далее следует различать степени вы-

пухлости в виде заостренного валика. *Выпуклый* штрих встречается у многих дрожжей, у сарцин, у некоторых микрококков.

П о в е р х н о с т ь ш т р и х а: (микрорельеф) может быть *гладкая* или на поверхности наблюдаются бугорки, поперечно расположенные складки, штрихи и т.п., т.е. поверхность *бугровато-складчатая*.

Б л е с к ш т р и х а: *блестящий, жирный* блеск, или *блеск застывающего са-ла, влажный блеск*, или *блеск воды, матовый*, а как крайнюю степень матовости, отмечают *мучнистость поверхности*.

П и г м е н т а ц и я ш т р и х а: при определении цвета рекомендуется положить культуру на белую бумагу и рассматривать в отраженном свете. Необходимо различать окраску штриха и окраску окружающей среды. Микроорганизмы иногда образуют пигмент, и в зависимости от того, растворим ли этот пигмент или нерастворим, окрашенной оказывается вся среда или только штрих. Например, штрих серовато-беловатый, а питательная среда окрашена в зеленоватый цвет или штрих сероватый, а питательная среда грязно-синего цвета, если пигмент почти нерастворимый, штрих ярко-красного цвета с кирпичным оттенком и лишь местами немного красителя переходит в питательную среду.

Цвет штриха может быть весьма различен - фиолетовый, синий, бурый, желтый, оранжевый, красный, чисто-белый (как бумага или фарфор) и с различными оттенками от желтого до зеленого. Микроорганизмы со штрихами грязно-белого цвета не относятся к пигментным. Наличие пигментации все же не может служи» характерным признаком: оно не постоянно и часто пигмент исчезает при неблагоприятных условиях; а восстановить его удастся лишь через несколько поколений.

К о н с и с т е н ц и я культуры определяется тем, как снимается материал с посевной черты, какова плотность культуры: культура может тянуться, как нить - эта *тягучая, слизистая* культура; иногда она трудно снимается - *кожистая* культура; вырастает в питательную среду - *хрящеватая*; бывают также *рыхлые маслянистые, кашеобразные* культуры.

Методы выделения чистых культур

После того, как получена накопительная культура, приступают к выделению чистой культуры, которая может быть получена из одной клетки или из отдельной колонии. Существует несколько приемов получения чистых культур, но все они основаны на выделении из популяции одной-единственной клетки.

Выделение чистой культуры из одной клетки

Получение чистой культуры из одной клетки производится капельным методом, микроманипулятором и с помощью микроселектора.

Капельный метод Линднера. Этот метод используют при работе с крупными микроорганизмами, такими как дрожжи, плесневые грибы, водоросли. При этом готовят разведения накопительной культуры в стерильной среде с таким расчетом, чтобы в небольшой капле были единичные клетки микроорганизмов. Затем на поверхность стерильного покровного стекла стерильным стальным пером наносят ряд капель суспензии из приготовленного разведения. Готовят препарат "висячая капля". Нанесенные на покровное стекло капли микроскопируют и отмечают те из них, в которых обнаружена только одна клетка. После этого препарат "висячая капля" помещают в чашку Петри, на дне которой находится увлажненная фильтровальная бумага, и чашку ставят в термостат. Через 12-24 час первоначально отмеченные капли вновь микроскопируют. Те капли, в которых произошло размножение клетки, осторожно снимают с покровного стекла кусочками стерильной фильтровальной бумаги и переносят в пробирку со стерильной жидкой средой для выращивания чистой культуры.

Выделение единичных клеток с помощью микроманипулятора. Микроманипулятор (прибор, изобретенный **Петффи** и **Чамберс**) - снабжен точными механизмами, позволяющими выполнять очень тонкие операции, в частности захватить одну клетку бактерий специальной микроскопической пипеткой. Все операции на микроманипуляторе проводят под микроскопом. Его устанавливают между двумя операционными штативами. Они снабжены микроскопическими винтами, с помощью которых осуществляется движение держателей с микроинструментами (микропипетка, микроигла, микрошпатель, микроскальпели и т.д.).

При этом на стерильное покровное стекло наносят небольшую каплю взвеси исследуемой культуры. Края капли устанавливают в середину поля зрения микроскопа и рядом с ней наносят из пипетки каплю питательного раствора. Микропипеткой набирают питательный раствор и подводят ее к капле с микроорганизмами, захватывают у края одну клетку и переносят в питательный раствор. Из отобранной клетки выращивают чистую культуру.

Выделение единичных клеток методом Б.В.Перфильева, который сконструировал специальный прибор - **микроселектор**. Основная часть его - стеклянный микрокапилляр прямоугольного сечения. Канал микрокапилляра хорошо просматривается под микроскопом с иммерсионным объективом. При большом увеличении в капилляре находят участок, где имеется только одна клетка. Специальным приспособлением этот участок под микроскопом стерильно выбивают в приемник с питательным субстратом и выращивают чистую культуру. Микроселектор Перфильева может быть использован для выделения как крупных, так и мелких микроорганизмов.

Однако, все указанные выше приемы достаточно трудоемки и выполнимы при наличии специального оборудования.

Выделение чистой культуры из отдельной колонии

Основным методом выделения чистых культур микроорганизмов до настоящего времени является метод, предложенный в 19 столетии Робертом Кохом. *Метод заключается в получении чистой культуры из отдельной колонии, которую считают результатом развития одной клетки.*

Для получения изолированных колоний накопительную культуру *аэробных микроорганизмов* высевают на поверхность плотной питательной среды. Высев проводят из накопительной культуры или чаще из ее разведения в стерильной водопроводной воде. Разведения делают с таким расчетом, чтобы получить на поверхности среды изолированные колонии. Рассев проводят петлей или шпателем. Для этого на поверхность плотной среды наносят каплю или "петлю" накопительной культуры или её разведения и осторожно распределяют стеклянным стерильным шпателем Дригальского. После чего этим же шпателем протирают поверхность плотной среды последовательно во второй, третьей и четвертой чашках. Обычно в первых двух чашках после инкубации наблюдается "сплошной" рост микроорганизмов, тогда как в последующих образуются изолированные друг от друга колонии.

Накопительную культуру на поверхность плотной среды можно рассеять и штриховым способом. Для этого накопительную культуру обычно разводят в стерильной водопроводной воде в 10-100 раз в зависимости от плотности исходной суспензии. Берут петлю одного из разведений накопительной культуры и проводят зигзагообразную линию или ряд параллельных штрихов через всю поверхность среды в чашке Петри. Если предварительного разведения накопительной культуры не производили, то следует, не стерилизуя петли, провести последовательно по поверхности плотной среды в двух-трех чашках Петри.

Чашки выдерживают в термостате в течение 1-7 суток, так как скорость роста различных микроорганизмов неодинакова. *Чашки необходимо просматривать ежедневно.* Выросшие изолированные колонии предварительно проверяют на чистоту. С этой целью из выбранной колонии готовят окрашенный препарат и микроскопируют с иммерсионной системой. Если в препарате все клетки окажутся однородными, то считают, что это клон и отсеивают петлей в пробирки на поверхность скошенной среды или в жидкую среду.

Изолированные колонии микроорганизмов, относящихся к *факультативным анаэробам*, чаще получают при глубинном посеве, поэтому требует создания условий, ограничивающих доступ кислорода к культуре. Для этого делают разведения накопительной культуры в пробирках с предварительно расплавленной и остуженной до 45-50° С агаризованной средой. После застывания агара поверхность среды заливают смесью парафина и вазелинового масла (1:1). При удачно выбранном разведении накопительной культуры в толще среды развиваются отдельные колонии. Иногда достаточно одного посева на плотную питательную среду, чтобы получить клон. Однако чаще посев повторяют два-три раза.

Техника приготовления разведений клеточной суспензии

Чтобы получить изолированные колонии, исследуемую культуру или материал, содержащий микроорганизмы, как правило, разводят в стерильной водопроводной воде, пользуясь некоторым постоянным коэффициентом разведения, чаще всего равным 10. Таким образом получают серию разведений, в которых концентрации клеток образуют геометрическую прогрессию. В ходе одного опыта целесообразно использовать один и тот же коэффициент разведения, так как в этом случае при большом числе подсчетов уменьшается вероятность ошибки.

Для приготовления разведений стерильную воду разливают по 9 мл в стерильные сухие пробирки. Затем 1 мл исходной суспензии, взятый стерильной пипеткой, переносят в пробирку с 9 мл стерильной воды – это 1-е разведение, 1:10. Полученную в 1-м разведение суспензию с помощью новой стерильной пипетки тщательно перемешивают, вбирая в пипетку и выпуская из нее полученную взвесь. Эту процедуру выполняют 3-5 раз, что обеспечивает перемешивание суспензии и уменьшает адсорбцию клеток на стенках пипетки. Затем этой же пипеткой берут 1 мл полученного разведения и переносят его во 2-ю пробирку – это 2-е разведение, 1:100. Таким же образом готовят и последующие разведения. Если используется другой коэффициент разведения, например, 3, тогда 1-е разведение будет 1:3, 2-е – 1:9, 3-е – 1:27 и т. д. *Степень разведения определяется плотностью исходной суспензии микроорганизмов и соответственно число разведений тем больше, чем больше плотность исходной суспензии.* Высевы на плотную среду производят обычно из трех последних разведений. Из каждого разведения делают 2-4 параллельных посева. Посевы из разведений можно делать одной пипеткой, но начинать следует обязательно с большего разведения.

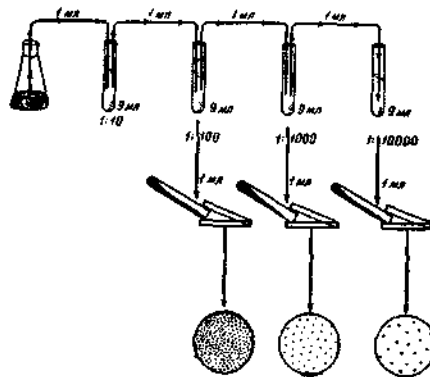


Рис. 65. Схема приготовления разведений суспензии микроорганизмов и проведения посева глубинным способом

ОБОРУДОВАНИЕ: МИКРОСКОП С-11, осветитель ОИ-31, удлинитель с розетками, плитка для плавления среды, термостат, кристаллизатор со стеклянным мостиком, спиртовка, капельницы, колба, стерильные чашки Петри, стерильные пробирки, стерильные пипетки, стерильный шпатель Дригальского, штатив бактериологическая петля, песочные часы.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ: РПА, 96°этиловый спирт, спирт-эфирная смесь, иммерсионное масло, раствор водного фуксина, вода для приготовления и промывания препарата, коробок спичек, х/б ткань для микроскопа, набор для приготовления препаратов (предметные стекла, кусочек сухого мыла, х/б тряпочка, полоски фильтровальной бумаги).

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ: накопительные культуры, выращенные на скошенной плотной среде в пробирках.

- ЗАДАНИЕ:**
1. Проанализировать визуально накопительную культуру микроорганизмов: подробно описать признаки роста культуры по штриху и способность клеток эмульгироваться в воде.
 2. Приготовить, промикроскопировать и зарисовать постоянный препарат бактерий из накопительной культуры (окраска водным фуксином в течение 3-5 мин, объектив 90х) Просмотреть не менее 10-ти полей зрения, отметить все формы, типы скоплений клеток и их особенности.
 3. Отчитаться в выполнении задания перед преподавателем: показать приготовленные препараты и выполненные рисунки.
 4. Разлить расплавленную стерильную питательную среду в стерильные чашки Петри в таком количестве (около 20 мл), чтобы дно чашки было полностью покрыто. Крышку тотчас закрыть, чашку оставить на горизонтальной поверхности до тех пор, пока не застынет среда.
 5. Соблюдая стерильные условия, приготовить разведения накопительной культуры в пробирках.
 6. Сделать посев из последнего разведения на стерильную питательную среду в чашки Петри.
 7. Чашки завернуть в бумагу, надписать свою фамилию и дату посева, поместить их в термостат при заданной температуре.
 8. В тетради отметить условия посева клонов (метод посева, состав среды, степень разведения исходной клеточной суспензии) и условия выращивания (температуру и продолжительность культивирования).
 9. Пробирки с накопительной культурой сохранить при комнатной температуре до получения клонов.
 10. Чашки со смешанной культурой передать лаборанту для уничтожения микроорганизмов. Промикроскопированные препараты поместить в кристаллизатор с дезинфицирующим раствором.
 11. Убрать свое рабочее место и сдать его лаборанту.

Методические указания

1. При описании роста культуры по штриху воспользуйтесь признаками, указанными в тексте, способность клеток эмульгироваться в растворе, выясните при приготовлении клеточной суспензии (см. занятие №6).

2. При микроскопировании препарата особое внимание обратите на однородность клеток по форме и размерам, т.е. на чистоту накопительной культуры.

При разведении накопительной культуры необходимо проделать следующие манипуляции, учитывая технику пересева бактерий из пробирки в пробирку в стерильных условиях.

1. В левую руку удобно взять две пробирки - одну со стерильной водой (дальше от себя), другую - с накопительной культурой микроорганизмов (ближе к себе).

2. Профламбировать бактериологическую петлю и, соблюдая условия асептики, перенести одну петлю накопительной культуры в пробирку с водой.

3. Поместить пробирку с накопительной культурой в штатив.

4. Засеянную пробирку поворачивайте несколько раз, зажав между ладонями и отметьте способность клеток эмульгироваться в растворах. Полученную клеточную суспензию используйте, как исходную, для дальнейших разведений.

5. В левую руку возьмите две пробирки - одну со стерильной водой, другую с исходной клеточной суспензией (см. п.1)

6. В правую руку надо взять стерильную пипетку, завернутую в бумагу и развернуть её в стерильной зоне за пламенем.

7. Открыть одновременно две пробирки, прижав пробки к ладони мизинцем и безымянными пальцами правой руки.

8. Быстро провести пипетку через пламя спиртовки и ввести в пробирку с исходной культурой. Перемешать полученную суспензию с помощью пипетки, вбирая и выпуская из нее полученную взвесь. Эту процедуру выполнить 3-5 раз, что обеспечит перемешивание суспензии и уменьшит адсорбцию клеток на стенках пипетки.

9. Отобрать 1 мл исходной клеточной суспензии и перенести в пробирку с 9 мл стерильной воды - это 1-е разведение, 1:10. **ВНИМАНИЕ!** *При взятии материала пробирки необходимо удерживать в наклонном положении, чтобы гарантировать стерильность культуры. Если их держать вертикально, то возможно попадание посторонних клеток микроорганизмов.*

10. Полученную в 1-м разведение суспензию с помощью пипетки тщательно перемешать, вбирая и выпуская из нее полученную взвесь несколько раз (как указано выше).

11. Не выпуская пипетку из руки, поместить пробирку с исходной культурой в штатив и взять вторую пробирку со стерильной водой. Отобрать этой же пипеткой 1 мл полученного разведения и перенести его во 2-ю пробирку - это 2-е разведение, 1:100. Таким же образом готовят и все последующие разведения.

12. Из последнего разведения отобрать 0,2-0,5 мл и, приоткрыв крышку чашки Петри, поместить на поверхность плотной среды.

13. В стерильных условиях развернуть шпатель, слегка обжечь в пламени спиртовки и, приоткрыв крышку чашки, студить его о её внутреннюю поверхность.

14. Осторожно распределить клетки шпателем сначала по одной половине поверхности среды, затем по второй, после чего этим же шпателем протереть поверхность плотной среды во второй чашке.

ВНИМАНИЕ! Техника безопасности. Все описанные выше манипуляции проводят около пламени горелки (но не в пламени!) по возможности быстро, чтобы не загрязнить культуру посторонними микроорганизмами. Не рекомендуется делать резкие движения, ходить около человека, проводящего посев микроорганизмов, так как движение воздуха увеличивает случайность загрязнения культуры. Особенно необходимо соблюдать все меры предосторожности, указанные в занятии № 6.

Вопросы для самопроверки

1. Сравните какие признаки учитывают при характеристике роста бактерий на плотной скошенной среде и на среде в чашке Петри?
2. Что такое клон и какие способы его получения вы знаете?
3. Какой принцип лежит в основе приемов получения микробиологического клона?
4. Чем различаются между собой методы Линднера, Перфильева и Коха?
5. На каких средах невозможно выделить клоны микроорганизмов и почему?
6. Как определить что на среде выросли клоны? Чем клоны отличаются от колоний смешанной культуры?
7. Что такое клонирование ДНК, плазмиды? В каких биологических исследованиях применяют этот прием?

Занятие № 9

АНАЛИЗ ЧИСТОТЫ КЛОНА БАКТЕРИЙ. ПОСЕВ и ВЫРАЩИВАНИЕ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Закрепить навыки изучения и описания культуральных признаков микроорганизмов, выращенных на плотных питательных средах. Закрепить навыки проведения микроскопического контроля чистоты штамма и посева бактерий на свежую питательную среду.

Описание выросших клонов

КЛОН (от греч. κλών – ветвь, побег, отпрыск) – это ряд следующих друг за другом поколений наследственно однородных организмов (или отдельных клеток в культурах), образующихся в результате бесполого или вегетативного размножения от одного общего предка. Поэтому потомство одной вегетативной

клетки, называемое клоном, образует колонию, характерную для данного вида организмов.

Как указывалось выше, культуральные признаки микроорганизмов, определяются характером их роста на питательных средах. Будучи постоянными для каждого вида микроорганизмов, они являются важным диагностическим признаком, хотя в различных группах бактерий имеют разную таксономическую значимость. Так, в группе грамотрицательных атипичных бактерий форма, размер и консистенция колоний практически не отличаются у представителей разных родов и имеют, следовательно, низкую диагностическую ценность. В то время как в группе спорообразующих бактерий, возможно провести предварительную дифференциацию на основании формы и характера поверхности колонии даже на видовом уровне. Специфические колонии образуют и миксобактерии: либо плоские и тонкие с большим числом концентрических складок или радиальных линий, широко распространяющиеся по поверхности среды, либо складчатые, из плотной слизи, имеющие неправильную форму и растущие в виде языков или отдельных скоплений и струй. Колонии многих видов миксобактерии эродированы агар. Сразу привлекают внимание исследователя колонии в виде башен из плотной слизи со складчатой поверхностью, характерные для представителей родов *Beijerinckia* и *Derxia*. В группе коринеподобных бактерий диагностическую ценность имеет степень врастания колонии в агар, благодаря образованию субстратного мицелия. Большинство колоний коринеподобных бактерий непрозрачные (плотные), выпуклой формы, гладкие или слегка шероховатые. Этим же бактериям свойственно образование воздушного мицелия на специфических средах. Колонии псевдомонад, как правило, плоские и прозрачные в проходящем свете.

Таким образом, изучение культуральных признаков выделяемых микроорганизмов, во многих случаях, позволяет получить важные сведения для определения чистоты культур и их идентификации.

ОБОРУДОВАНИЕ: МИКРОСКОП С-11, осветитель ОИ-31, удлинитель с розетками, термостат, кристаллизатор со стеклянным мостиком, спиртовка, капельницы, колба, штатив, бактериологическая петля, песочные часы, масштабная линейка.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ: 96°этиловый спирт, спирт-эфирная смесь, иммерсионное масло, раствор водного фуксина, вода для приготовления и промывания препарата, коробок спичек, х/б ткань для микроскопа, набор для приготовления препаратов (предметные стекла, кусочек сухого мыла х/б тряпочка для стекол, полоски фильтровальной бумаги), пробирка со скошенным РПА.

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ: выросшие колонии в чашке Петри.

- ЗАДАНИЕ:**
1. Проанализировать клоны микроорганизмов: провести подсчет выросших колоний по размеру и цвету.
 2. Провести визуальный контроль чистоты клона: подробно описать культуральные признаки одной бактериальной колонии, выбранной для дальнейшей работы.
 3. Провести микроскопический контроль чистоты клона: приготовить, промикроскопировать и зарисовать постоянный препарат бактерий из описанной колонии (окраска водным фуксином в течение 3-5 мин, объектив 90х). Просмотреть не менее 10-ти полей зрения, отметить все формы, типы скоплений клеток и их особенности.
 4. Пересеять часть клеток, выбранной колонии, в пробирку на стерильный скошенный РПА, подписать пробирку и поместить их в термостат при заданной температуре.
 5. В тетради отметить условия посева (метод посева, состав среды) и условия выращивания (температуру и продолжительность культивирования) чистой культуры.
 6. Отчитаться в выполнении задания перед преподавателем: показать приготовленные препараты и выполненные рисунки.
 7. Чашки с выросшими клонами оставить при комнатной температуре до получения штамма.
 8. Пробирки с накопительными культурами передать лаборанту для уничтожения микрофлоры. Промикроскопированные и зарисованные препараты поместить в кристаллизатор с дезинфицирующим раствором.
 9. Убрать свое рабочее место и сдать его лаборанту.

Методические указания

1. Если количество выросших колоний на чашке достаточно велико (больше 50-100 штук) или они разнообразны, то их не считают клонами и рассев накопительной культуры по методу Коха проводят вновь.

2. Просматривая колонии, выросшие на чашках Петри, проведите их описание по схеме, приведенной в занятии № 7. Проверьте однородность колоний и совпадение их признаков с описанными ранее.

3. Пересейте часть клеток клона на скошенный РПА, как указано в занятии №7. На пробирке тщательно надпишите свою фамилию или другие обозначения, понятные вам, и дату посева. После чего пробирку с культурой поместите в термостат, наблюдения за её развитием проводят ежедневно до тех пор, пока она не перестанет видимо изменяться.

ВНИМАНИЕ ! Посев (или пересев) микроорганизмов требует соблюдения определенных правил, которые необходимо выполнять, чтобы предохранить исследуемую культуру от загрязнения посторонними микроорганизмами. Поэтому всю работу необходимо проводить в стерильной зоне пламени, **как** указано в занятии № 3, соблюдая необходимые правила безопасной работы, **как** указано в занятии № 6.

Вопросы для самопроверки

1. Из каких этапов складывается выделение чистых культур микроорганизмов? Можно ли сократить некоторые из них и в каких случаях?
2. Что такое клон, чистые культуры и штаммы микроорганизмов? Как их получить?
3. Чем клоны микроорганизмов отличаются от их чистых культур?
4. Как определяется чистота клона? Какие признаки учитываются при этом?
5. Для каких исследований используются только клоны микроорганизмов и почему?
6. В каких случаях исследование микроорганизмов невозможно провести на клонах и почему? Ответ поясните.
7. Какие способы получения клона вам известны?
8. Какие среды используют для выращивания клонов? Обоснуйте свой ответ.

Занятие № 10

АНАЛИЗ ЧИСТОТЫ ШТАММА БАКТЕРИЙ. ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ПО МЕТОДУ ГРАМА

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ. Закрепить навыки изучения и описания роста культур на плотных питательных средах. Ознакомиться и освоить метод дифференциального окрашивания клеток прокариот методом Грама.

Определение чистоты выделенной культуры

Чистоту выделенных культур проверяют одновременно несколькими способами – визуально, микроскопированием и высевом на ряд питательных сред.

Визуальный контроль проводят просматривая рост выделенной культуры на поверхности скошенной агаризованной среды. Если культура чистая, то характер её роста однороден по всему штриху и её оставляют для дальнейшей работы. Если рост культуры по штриху неоднороден, культуру считают загрязненной и отбрасывают.

Микроскопический контроль обязательный этап проверки чистоты выделенной культуры. Для этого готовят препарат фиксированных окрашенных клеток и исследуют его с иммерсионной системой. Чистые культуры многих бактерий, как правило, морфологически однородны допустимо лишь некоторое варьирование размеров клеток. Однако, клетки некоторых микроорганизмов очень полиморфны, поэтому определение чистоты таких культур при микроскопировании затруднительно.

Во многих случаях загрязнение культур посторонней микрофлорой выявляется уже с помощью микроскопического контроля и такие культуры отбра-

сывают. Однако наиболее надежным способом проверки чистоты культуры является высев ее на ряд питательных сред.

Рассев на плотные среды проводят так, как это делают при расसेве накопительной культуры, чтобы получить изолированные колонии. Обязателен посев на мясо-пептонный агар - среду, благоприятную для развития многих гетеротрофных организмов. Выросшие колонии просматривают и сверяют их признаки с отмеченными при выделении. Однородность колоний и совпадение их признаков с описанными ранее или, напротив, отсутствие роста, если данные микроорганизмы не развиваются на этой среде, являются свидетельством чистоты выделенной культуры. Хотя в некоторых случаях такого высева недостаточно. Это касается автотрофных и гетеротрофных организмов, склонных развиваться в симбиозе с одним или несколькими спутниками. Частоту таких культур проверяют высевом ещё на ряд сред, состав которых определяется особенностями обмена веществ выделяемых микроорганизмов и их возможных спутников.

Признаки, необходимые для описания и идентификации микроорганизмов

Для идентификации микроорганизмов используются различные признаки: морфологические, культуральные, физиолого-биохимические и др. В настоящее время большое значение стали придавать составу клеточной стенки и пигментов, содержанию отдельных нуклеотидов в ДНК.

Принадлежность организма к классу, порядку, семейству, а иногда даже к роду можно установить на основании морфологических признаков и тех сведений, которые исследователь получает в процессе выделения чистой культуры. Одним из таких признаков является способность клеток к окрашиванию методом Грама.

Окраска клеток микроорганизмов по методу Грама

В 1884г. датский врач Христиан К. Грам предложил метод разделения микробных клеток, основанный на различной способности клеток к окраске дифференциальным методом. Как указывалось ранее, при сложных способах окраски на мазок клеток воздействуют двумя красящими веществами, из которых один является основным, а другой - дополнительным. Кроме красящих веществ, в таких способах окраски применяют различные обесцвечивающие вещества: спирт, кислоты и др.

Сущность метода Грама заключается в том, что при обработке генциан-виолетом и йодом в клетках одних микроорганизмов образуется относительно устойчивый и нерастворимый в спирте комплекс. Клетки других микроорганизмов после обработки генциан-виолетом и йодом легко обесцвечиваются спиртом и приобретают красный цвет при последующей покраске фуксином. Первые микроорганизмы называются грамположительными, вторые - грамотрицательными.

Способность клеток окрашиваться по Граму зависит от ряда причин и прежде всего от возраста культуры. Некоторые бактерии, будучи грамположительными в молодых культурах, в старых - неодинаково интенсивно окрашиваются данным способом. Поэтому красить по Граму всегда следует клетки молодых культур (чаще всего суточные). Целесообразно одновременно окрашивать клетки контрольных микроорганизмов, отношение которых к окраске по Граму известно заранее. Мазок для окраски по Граму должен быть тонким, чтобы клетки равномерно распределялись по поверхности предметного стекла и не образовывали скоплений, так как от толщины мазка зависят результаты окрашивания.

Окраску проводят следующим образом. На одном обезжиренном предметном стекле готовят три мазка из разных культур. В центре наносят мазок исследуемого микроорганизма, слева и справа - мазки контрольных культур. Клетки одного из контрольных микроорганизмов окрашиваются по Граму положительно (например, один из представителей рода *Sarcina*), а клетки другого - по Граму не окрашиваются (например, *Escherichia coli*). Мазок высушивают на воздухе и фиксируют над пламенем горелки. Фиксация химическими соединениями не рекомендуется. На фиксированный мазок наливают раствор карболового генциан-виолета. Мазок окрашивают в течение 1-2 мин. Краситель сливают и, не промывая препарат водой, обрабатывают его раствором Люголя в течение 1-2 мин до полного почернения. Сливают раствор Люголя и обрабатывают препарат в течение 0,5-1 мин 96° этиловым спиртом для обесцвечивания. С этой целью погружают предметное стекло 2-3 раза в стакан с 96° этанолом или наливают спирт на мазок. В последнем случае стекло слегка покачивают и спирт меняют несколько раз. Чтобы исключить излишнее обесцвечивание клеток, к спирту следует добавить йод (2 мл 10%-ного спиртового раствора йода на 100 мл этанола). Препарат промывают водой и дополнительно окрашивают водным фуксином в течение 3-4 мин. Краситель сливают, препарат вновь промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой. При правильном окрашивании грамположительные бактерии имеют сине-фиолетовый цвет, грамотрицательные - красный цвет фуксина.

ОБОРУДОВАНИЕ: МИКРОСКОП С-11, осветитель ОИ-31, удлинитель с розетками, термостат, кристаллизатор со стеклянным мостиком, спиртовка, капельницы, колба, стеклянный стаканчик, штатив, песочные часы, бактериологическая петля.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ: 96° этиловый спирт, спирт-эфирная смесь, иммерсионное масло, раствор карболового генциан-виолета, раствор Люголя, раствор водного фуксина, 96° этиловый спирт, вода для приготовления и промывания препарата, коробок спичек, х/б. ткань для микроскопа, набор для приготовления препаратов (предметные стекла, кусочек сухого мыла, х/б тряпочка для стекол, полоски фильтровальной бумаги).

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ: выделенные штаммы бактерий, грамполо-

жительные и граммотрицательные контрольные культуры, выращенные в течение суток на скошенной питательной среде.

- ЗАДАНИЕ:**
1. Проанализировать визуально чистую культуру микроорганизмов: подробно описать признаки роста культуры по штриху.
 2. Приготовить, промикроскопировать и зарисовать постоянный препарат бактерий из выделенной культуры и контрольных культур (окраска методом Грама, объектив 90x) Просмотреть не менее 10-ти полей зрения, отметить особенности окраски контрольных и выделенной культур, формы, типы скоплений клеток и их особенности.
 3. Отчитаться о выполнении задания перед преподавателем.
 4. Пробирку с чистой культурой сохранить при температуре +4°C для последующей работы.
 5. Чашки с клонами передать лаборанту для уничтожения микроорганизмов. Промикроскопированные препараты поместить в кристаллизатор с дезинфицирующим раствором.
 6. Убрать свое рабочее место и сдать его лаборанту.

Методические указания

1. При описании роста культуры по штриху воспользуйтесь признаками, описанными в занятии N 8.

2. Постоянный препарат из контрольных и выделенной культур готовьте на одном стекле так, чтобы мазки располагались рядом друг с другом, но клетки не смешивались. Мазки необходимо делать очень тонкими, четко соблюдать время окраски и время обесцвечивания препарата.

3. При микроскопировании препарата особое внимание обратите на окраску контрольных и выделенных культур, а также на чистоту мазка выделенной культуры, т.е. однородность клеток по форме и размерам. Под рисунком сделайте вывод о чистоте выделенного штамма и о способности окрашиваться по методу Грама. Данную характеристику используйте при идентификации выделенной культуры.

ВНИМАНИЕ ! *При взятии материала пробирки необходимо удерживать в наклонном положении, чтобы гарантировать стерильность культуры. Если их держать вертикально, то возможно попадание посторонних клеток микроорганизмов.*

ВНИМАНИЕ 'Техника безопасности. Все описанные выше манипуляции проводят около пламени горелки (но не в пламени!) по возможности быстро, чтобы не загрязнить культуру посторонними микроорганизмами. Не рекомендуется делать резкие движения, ходить около проводящего посева микроорганизмов, так как движение воздуха увеличивает случайность загрязнения культуры.

Вопросы для самопроверки

1. Каким образом определяют чистоту выделенных культур микроорганизмов?
2. Какие чистые культуры называют музейными? Как хранят музейные культуры микроорганизмов? Какие штаммы называют типовыми?
3. Что такое дифференциальное окрашивание клеток и чем оно отличается от простого?
4. Какой принцип лежит в основе метода окраски клеток по Граму?
5. Для чего клетки прокариот окрашивают данным способом?
6. Какие факторы влияют на степень окраски клеток методом Грама?

Занятие № 11

КОЛЛОКВИУМ: по всему пройденному материалу.

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Закрепление и проверка усвоения лекционного материала и теоретического материала практикума.

Для подготовки к коллоквиуму необходимо повторить теоретический материал по особенностям строения и функционирования клеток микроорганизмов; по условиям выращивания и способам сохранения чистых культур; способам стерилизации сред и инструментов; способы и этапы выделения чистых культур, методы изучения клеток микроорганизмов, простые и сложные способы окраски.

Библиографический список

1. Краткий определитель бактерий Берги /Под ред. Дж. Хоулта. М.: Мир, 1980. 496 с.
2. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. М.: Медицина, 1978. 394 с.
3. Пименова М.Н., Гречушкина Н.Н., Азова Л.Г. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М.: МГУ, 1971. 222 с.
4. Практикум по микробиологии /Под ред. Н.С. Егорова. М.: МГУ, 1976. 307 с.
5. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования /Под ред. М.О. Биргера. М.: Медицина, 1982. 464 с.
6. Стейннер Р., Эдельберг Э., Ингрэм Дж. Мир микробов. М.: Мир, 1979. 1-3т.

СОДЕРЖАНИЕ

ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ	4
Занятие № 6 ПОСЕВ ВОЗДУШНОЙ МИКРОФЛОРЫ	4
Занятие №7 КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ УЧЕТ БАКТЕРИЙ В ВОЗДУХЕ. ОПИСАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КОЛОНИИ. ПОСЕВ НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ БАКТЕРИЙ	9
Занятие № 8 АНАЛИЗ НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ БАКТЕРИЙ. ПОСЕВ и ВЫРАЩИВАНИЕ КЛОНА МЕТОДОМ КОХА	16
Занятие № 9 АНАЛИЗ ЧИСТОТЫ КЛОНА БАКТЕРИЙ. ПОСЕВ и ВЫРАЩИВАНИЕ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ	23
Занятие № 10 АНАЛИЗ ЧИСТОТЫ ШТАММА БАКТЕРИЙ. ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ПО МЕТОДУ ГРАМА	26
Занятие № 11. КОЛЛОКВИУМ	30