

Накопительные культуры автотрофных микроорганизмов получают на средах, где единственным источником углерода служит углекислота. Отсутствие в среде других соединений углерода задерживает развитие гетеротрофов. Такие специфические питательные среды, удовлетворяющие потребности преимущественно одной группы микроорганизмов, носят название селективных. В зарубежной литературе большее распространение получили термины «накопительные», или «селективные», среды.

Иногда при выделении микроорганизмов из природных популяций в среду включают антибиотики, которые отличаются специфичностью действия и позволяют избирательно подавлять рост определенной группы микроорганизмов. Так, селективные условия для развития грамотрицательных бактерий можно создавать внесением в среду пенициллина в концентрации от 0,2 до 100 мг/л. Поскольку многие виды грамположительных бактерий при этом или совсем не развиваются, или развиваются медленно. Чтобы создать благоприятные условия для развития бактерий и, напротив, подавить рост мицелиальных грибов, к средам рекомендуют добавлять нистатин в концентрации от 0,1 до 20 мг/л или гризеофульвин в концентрации от 1 до 20 мг/л.

После того как получена накопительная культура, приступают к выделению чистой культуры. Она может быть получена из отдельной колонии или одной клетки.

Выделение чистой культуры из отдельной колонии.

Основным методом выделения чистых культур микроорганизмов является метод, предложенный Р. Кохом. Принцип его заключается в получении чистой культуры из отдельной колонии. Однако этот метод неприменим для выделения микроорганизмов, которые не растут или плохо растут на плотных средах. К числу таких микроорганизмов относятся некоторые бактерии, многие водоросли и простейшие.

При выделении чистой культуры **аэробных** микроорганизмов накопительную культуру высевают на поверхность плотной среды. Изолированные колонии **микроаэрофильных** микроорганизмов и **факультативных анаэробов** чаще получают методом глубинного посева.

1.2.1 Выделение чистой культуры аэробных бактерий из отдельной колонии с помощью шпателя Дригальского

Цель работы – освоить практический навык выделения чистой культуры аэробных бактерий из отдельной колонии с помощью шпателя Дригальского.

Методика выполнения работы.

Порядок работы следующий. Расплавленную на кипящей водяной бане стерильную и охлажденную до 50 °С питательную среду, содержащую агар или желатину, разливают в стерильные чашки Петри. После того как среда застынет, на ее поверхность из пипетки наносят каплю накопительной культуры или ее разведения в стерильной воде и стерильным стеклянным шпателем Дригальского распределяют каплю по поверхности плотной среды в

чашке Петри. Далее этим же шпателем протирают поверхность среды последовательно во второй, третьей и четвертой чашках. Обычно в первых двух чашках после инкубации наблюдается сплошной рост микроорганизмов, тогда как в последующих – рост изолированных колоний (рисунок 2).

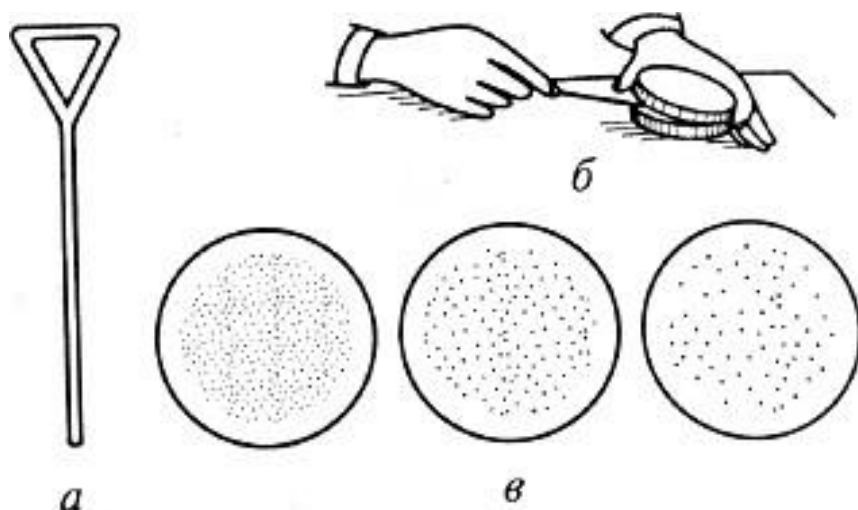
1.2.2 Выделение чистой культуры аэробных бактерий из отдельной колонии с помощью бактериологической петли

Цель работы – освоить практический навык выделения чистой культуры аэробных бактерий из отдельной колонии с помощью бактериологической петли.

Рассевать накопительную культуру можно бактериологической петлей методом истощающего штриха.

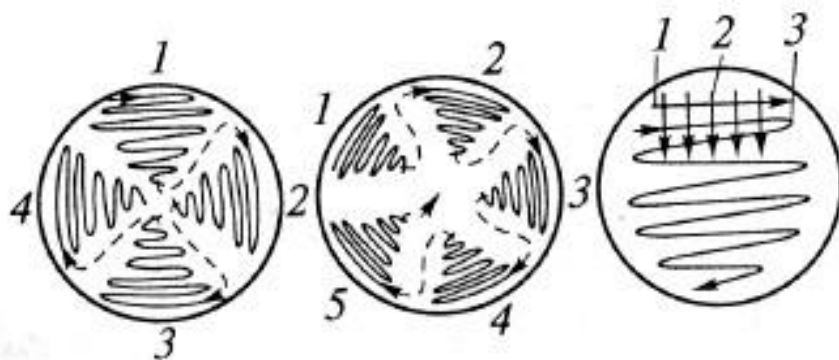
Методика выполнения работы.

Накопительную культуру или ее разведение отбирают петлей и на поверхности плотной среды проводят штрихи в порядке, указанном на рисунке 3. Перед каждым новым штрихом петлю стерилизуют в пламени горелки. После посева чашки Петри помещают в термостат крышками вниз, чтобы конденсационная вода, образовавшаяся на крышке чашки при застывании агара, не помешала получить изолированные колонии. Чашки выдерживают в термостате в течение 1 – 7 суток в зависимости от скорости роста микроорганизмов.



а — шпатель Дригальского; б — рассев; в — рост микроорганизмов после посева.

Рисунок 2 - Рассев культуры микроорганизмов на поверхность плотной среды шпателем Дригальского



1 – 5 – последовательность рассева культуры петлей.

Рисунок 3 - Рассев культуры микроорганизмов на поверхность плотной среды бактериологической петлей

1.2.3 Выделение чистой культуры микроаэрофильных и факультативно анаэробных бактерий из отдельной колонии методом глубинного посева

Цель работы – освоить практический навык выделения чистой культуры микроаэрофильных и факультативно анаэробных бактерий из отдельной колонии методом глубинного посева.

Методика выполнения работы.

Плотную питательную среду предварительно разливают в пробирки по 15 - 20 мл и стерилизуют. Непосредственно перед посевом пробирки помещают в кипящую водяную баню, чтобы среда расплавилась. Высев проводят из разведений накопительной культуры в стерильной водопроводной воде. Разведения готовят с таким расчетом, чтобы при высеве 0,5 - 1,0 мл разведения получить изолированные колонии. Степень разведения определяется плотностью накопительной культуры. Высевы делают, как правило, из трех-четырех последних разведений. Для этого в пробирку с расплавленной и остуженной до 48 – 50 °С средой вносят 0,5 - 1,0 мл одного из разведений накопительной культуры. Посевной материал тщательно перемешивают, вращая пробирку между ладонями. Затем около пламени горелки вынимают из пробирки пробку, обжигая края пробирки в пламени горелки, и быстро выливают содержимое пробирки в стерильную чашку Петри. После того как агаризованная среда застынет, чашки Петри помещают в термостат. Колонии выросшие в толще среды, вырезают стерильным скальпелем, извлекают стерильными капиллярными трубками или просто петлей и переносят в жидкую среду, благоприятную для развития выделяемых микроорганизмов.

1.2.4 Пересев чистой культуры аэробных, микроаэрофильных и факультативно анаэробных бактерий

Цель работы – освоить навык пересева чистой культуры аэробных, микроаэрофильных и факультативно анаэробных бактерий.

Методика выполнения работы.

Выросшие изолированные колонии отсейте петлей на поверхность скошенной плотной среды в пробирке или в жидкую среду.

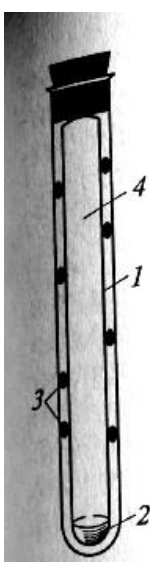
Особые трудности возникают при выделении чистых культур **облигатных анаэробов**. Если контакт с молекулярным кислородом не вызывает сразу гибели клеток, то посев проводят на поверхность среды в чашки Петри, но после посева чашки тотчас помещают в анаэроостат. Однако чаще пользуются **методом разведения**. Сущность его заключается в том, что разведения накопительной культуры проводят в расплавленной и охлажденной до 45 – 50 °С агаризованной питательной среде. Делают 6 - 10 последовательных разведений. Затем среду в пробирках быстро охлаждают и заливают поверхность слоем стерильной смеси парафина и вазелинового масла (в соотношении 3:1), что препятствует проникновению воздуха в толщу агаризованной среды.

Иногда агаризованную питательную среду после посева и тщательного перемешивания переносят в стерильные трубки Бурри. Можно использовать капиллярные пипетки Пастера, в которые набирают соответствующее разведение накопительной культуры в расплавленной агаризованной питательной среде. Конец капилляра запаивают. При удачно выбранном разведении накопительной культуры в одной из пробирок (пипеток Пастера, трубок Бурри) вырастают изолированные колонии. Чтобы извлечь образовавшиеся колонии, поступают следующим образом. Удаляют стерильной иглой слой парафина, а столбик агаризованной среды осторожно выдувают из пробирки в стерильную чашку Петри, пропуская газ, не содержащий кислород, через капилляр или иглу, помещенные между стенкой пробирки и агаризованной средой. Агаризованную среду из трубки Бурри выдувают, пропуская газ через ватную пробку.

В некоторых случаях плотную среду из пробирки извлекают иначе. Пробирку слегка нагревают, все время быстро вращая ее над пламенем горелки. При этом агар, непосредственно прилегающий к стенке, плавится и содержимое пробирки в виде агарового столбика легко выскальзывает в стерильную чашку Петри. Столбик агара разрезают стерильным ланцетом и извлекают колонии, захватывая их стерильными капиллярными трубками или петлей. Можно также вырезать их стерильным ланцетом. Извлеченные колонии переносят в жидкую среду, благоприятную для развития выделяемых микроорганизмов. Если изолированные колонии получены в капилляре, то после тщательной дезинфекции поверхности его разламывают стерильным пинцетом и участки капилляра, содержащие изолированные колонии, переносят в стерильную среду.

Для получения изолированных колоний методом глубинного посева и методом разведений рекомендуется использовать осветленные питательные среды.

Метод вращающихся пробирок. Когда хотят получить изолированные колонии облигатных анаэробных бактерий, характеризующихся особенно высокой чувствительностью к кислороду (экстремальные анаэробы), используют метод вращающихся пробирок Р. Хангейта. Сущность его заключается в следующем. Расплавленную агаризованную среду засевают бактериями при постоянном токе через пробирку стерильного инертного газа, освобожденного от примеси кислорода. Затем пробирку закрывают резиновой



1 - агаризованная питательная среда; 2 - конденсационная вода; 3 - колонии бактерий; 4 - смесь газов H_2 и CO_2 .

Рисунок 4 – Изолированные колонии облигатных анаэробов в пробирках, заполненных газом (по Р. Хангейту)

пробкой и помещают горизонтально в зажим, вращающий пробирку. Агаризованная среда при этом равномерно распределяется по стенкам пробирки и застывает тонким слоем. Тонкий слой агаризованной среды в пробирке, заполненной газовой смесью, позволяет получить изолированные колонии, хорошо видимые невооруженным глазом (рисунок 4).

Применяют также модификацию метода Р. Хангейта. При этом расплавленную агаризованную среду при постоянном токе стерильного инертного газа разливают по пробиркам. Затем пробирку закрывают резиновой пробкой и помещают горизонтально в зажим, вращающий пробирку. После того как среда на стенках пробирки застынет, производят засев среды в этой пробирке в токе стерильного газа с помощью бактериальной петли, проводя штрих во вращающейся пробирке в направлении от ее дна к горлышку (рисунок 5).

Иногда для получения чистой культуры бывает достаточно одного посева в плотную среду, однако чаще посев в плотную питательную среду повторяют 2 - 3 раза. В качестве посевного материала при этом используют культуру, полученную из отдельной колонии.

Выделение чистой культуры из одной клетки.

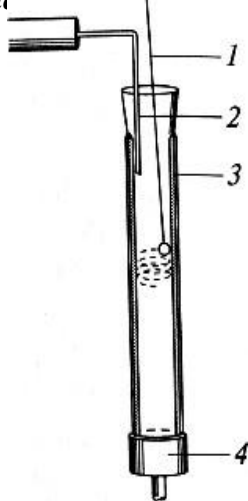
Чистую культуру из одной клетки можно выделить капельным методом с помощью микроманипулятора, а также с помощью микроселектора.

Капельный метод Линднера. Метод используют при работе с крупными микроорганизмами: дрожжами, мицелиальными грибами, цианобактериями, водорослями. Порядок работы следующий. Накопительную культуру разводят в стерильной среде с таким расчетом, чтобы в небольшой капле были одиночные клетки микроорганизмов. Затем на поверхность нескольких стерильных покровных стекол стерильным стальным пером наносят по капле приготовленного разведения. Готовят препараты «висячая капля». Нанесенные на покровные стекла капли просматривают под микроскопом и отмечают те, в которых обнаружена только одна клетка. После этого препарат помещают в термостат во влажную камеру, которой обычно служит чашка Петри с увлажненной фильтровальной бумагой на дне. Через 12 - 24 ч отмеченные капли вновь микроскопируют. Капли, в которых наблюдается образование микроколоний, осторожно снимают с покровного стекла кусочками стерильной фильтровальной бумаги и переносят в пробирки со стерильной средой.

Выделение отдельных клеток с помощью микроманипулятора.

Микроманипулятор - прибор, позволяющий с помощью специальной микропипетки или микропетли извлекать из суспензии одну клетку. Эту операцию контролируют под микроскопом. Микроманипулятор имеет два операционных штатива, между которыми расположен обычный микроскоп (рисунок 6). На предметном столике микроскопа установлена влажная камера, в которую помещают препарат «висячая капля». В держателях операционных штативов закреплены микропипетки (микропетли), перемещение которых в поле зрения микроскопа осуществляется с микронной точностью благодаря системе винтов и рычагов. Микропипетки вводят во влажную камеру таким образом, чтобы их концы оказались в висячей капле. Исследователь, глядя в микроскоп, извлекает отдельные клетки микропипетками и переносит их в пробирки со стерильной жидкой средой.

Выделение отдельных клеток с помощью микроселектора Перфильева. Наиболее



1 - бактериальная петля; 2 - трубка для подачи стерильного инертного газа; 3 - питательная среда, застывшая на стенках пробирки; 4 - механизм, вращающий пробирку.

Рисунок 5 – Посев культуры строго анаэробных микроорганизмов с использованием модификации метода вращающихся пробирок Р. Хангейта

существенной частью микроселектора Перфильева является стеклянный микрокапилляр, имеющий строго прямоугольное сечение. Благодаря этому канал капилляра хорошо просматривается даже с иммерсионным объективом. Стерильный капилляр заполняют исследуемой суспензией клеток в агаризованной питательной среде и при большом увеличении микроскопа находят участок с одной клеткой. Специальным приспособлением этот участок капилляра стерильно выбивают в приемник, из которого затем переносят в стерильную среду (рисунок 7). Микроселектор Перфильева можно использовать для выделения как крупных, так и мелких микроорганизмов.

1.3 Оценка чистоты выделенной культуры микроорганизмов

Чистота выделенной культуры микроорганизмов должна быть тщательно проверена. Это осуществляется обычно несколькими способами: визуальным, микроскопическим контролем и высевом на ряд питательных сред. При визуальном контроле просматривается рост микроорганизмов по штриху на поверхности скошенной агаризованной среды. Если рост по штриху неоднороден, культура загрязнена. Такой контроль возможен только для культур, способных расти на поверхности плотных сред.

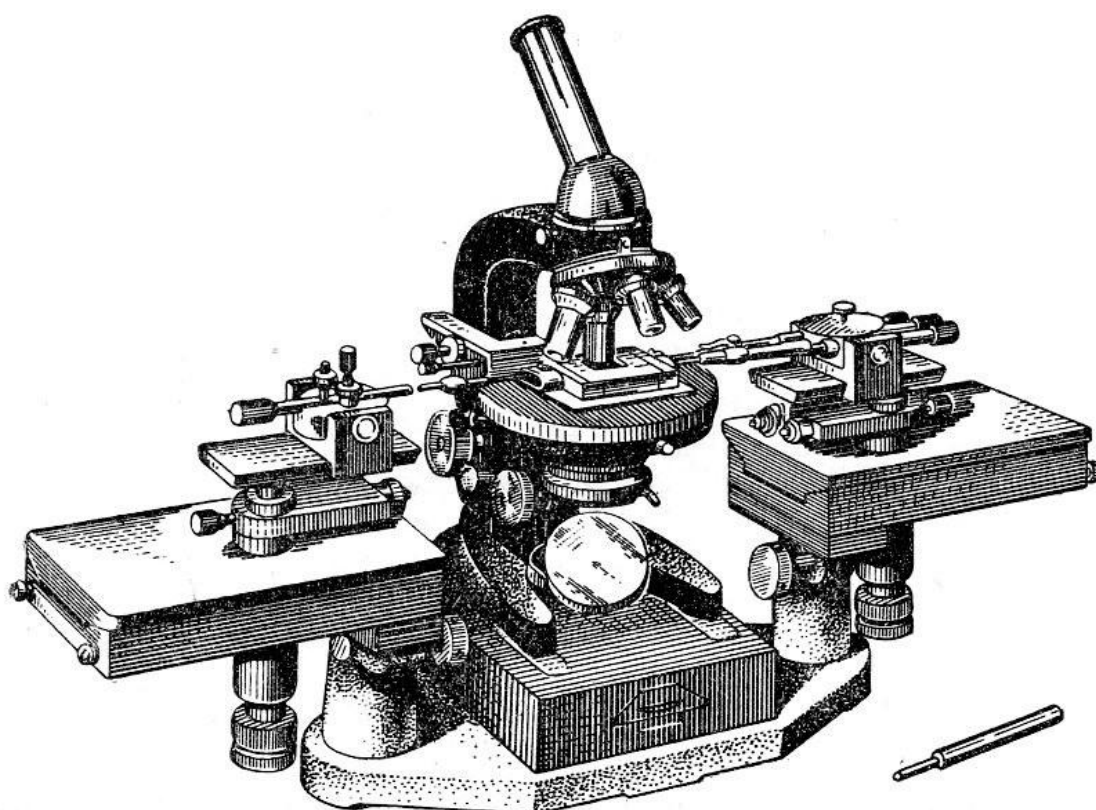


Рисунок 6 – Микроманипулятор вместе с микроскопом

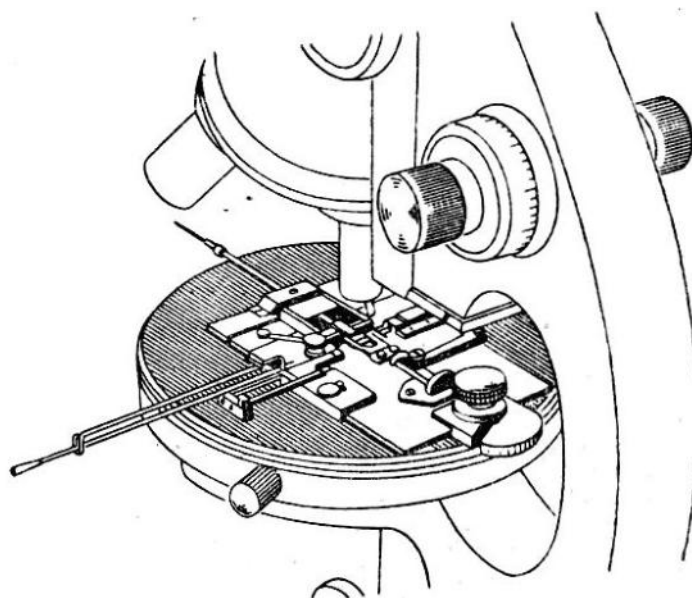


Рисунок 7 – Микроселектор Б.В. Перфильева

Чистоту культур микроорганизмов обязательно нужно контролировать под микроскопом. Для этого следует приготовить препарат фиксированных окрашенных клеток и посмотреть его с иммерсионной системой или сделать препарат живых клеток и посмотреть его, используя фазово-контрастное устройство. Чистая культура многих микроорганизмов, как правило, морфологически однородна; допустимо лишь незначительное варьирование

размеров клеток. Однако необходимо помнить, что клетки некоторых бактерий, например микобактерий, нокардий и др., очень полиморфны, поэтому определение чистоты таких культур при микроскопировании вызывает некоторые затруднения. Чистоту культур микроорганизмов обязательно проверяют высевом на питательные среды. Прежде всего, выделенную культуру высевают на питательную среду, благоприятную для ее роста. Однородность выросших колоний — свидетельство чистоты культуры. Обязателен посев на мясопептонный агар — среду, которая обеспечивает рост многих хемогетеротрофов. Критерием чистоты культуры является однородность выросших колоний или отсутствие роста, если данные микроорганизмы на мясопептонном агаре не развиваются.

Следует иметь в виду, что заключение о чистоте некоторых культур микроорганизмов нельзя сделать только по результатам посева на МПА.

Особенно это касается автотрофных микроорганизмов, а также представителей гетеротрофов, склонных развиваться с одним или несколькими спутниками.

Чистоту таких культур микроорганизмов проверяют высевом еще на ряд сред — сусло, мясопептонный бульон, картофельный агар и др. Набор сред и их состав определяются особенностями метаболизма выделенных микроорганизмов, а также их возможных спутников.

1.3.1 Оценка чистоты выделенной культуры

Цель работы – освоить навык оценки чистоты выделенной культуры микроорганизмов.

Методика выполнения работы.

Приготовьте микропрепарат из чистой культуры, зафиксируйте его и окрасьте по Граму. Исследуйте микропрепарат с помощью светлостойкой иммерсионной микроскопии. Результаты микроскопирования зарисуйте в таблице 4, обозначив один, два или более типов клеток. Сделайте заключение о чистоте выделенной культуры.

Таблица 4

Результат микроскопии чистой культуры	Обозначения

2 Методы идентификации чистых культур микроорганизмов

2.1 Методы оценки морфологических свойств микроорганизмов

2.1.1 Изготовление нативных препаратов (содержащих живые клетки) микроорганизмов

Цель работы – освоить практические навыки изготовления нативных препаратов микроорганизмов.

Для изучения живых клеток микроорганизмов применяют препараты «раздавленная капля», «висячая капля», «отпечаток», «агаровая пленка»