

Государственное автономное образовательное учреждение
среднего профессионального образования

ЭНГЕЛЬССКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ КОЛЛЕДЖ

МЕТОДИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА ПО ТЕМЕ:

«ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ»

Специальность 060604
«Лабораторная диагностика»
Дисциплина: «Теория и практика
лабораторных микробиологических
исследований»

Составлена преподавателем
дисциплины: «Теория и практика
лабораторных микробиологических
исследований»

Угольковой Н.С.

Рассмотрено на заседании ЦМК
«Лабораторная диагностика»

Протокол № ___ от «___» _____ 2013г.

Председатель ЦМК _____

Корягина С.А.

Энгельс 2013г.

При выполнении практических занятий учащиеся должны:

ЗНАТЬ: 1 – день исследования

1. Патологический материал, доставляемый в лабораторию.
2. Питательные среды и требования к ним.
3. Методы посевов.
4. Условия культивирования.
5. Выделение чистой культуры аэробов – 1й день исследования.
6. Методы выделения чистой культуры анаэробов.
7. Понятия – чистая культура, колония, штамм, клон.

УМЕТЬ:

1. Посеять патологический материал на элективные и дифференциально-диагностические среды шпателем по Дригальскому.
2. Обработать рабочее место.

ПРИБРЕСТИ НАВЫКИ:

1. Проводить посев патологического материала на элективные и дифференциально-диагностические среды тампоном.
2. Посев на среды обогащения.
3. Подготовка мазков из нативного материала.
4. Фиксация.
5. Окраска простым методом и методом Грама.
6. Работа с микроскопом.
7. Правила работы с патологическими бактериальными агентами (ПБА).

2 – день исследования

ЗНАТЬ:

1. Культуральные свойства (характер роста на средах).
2. Ход бактериологического исследования – 2й день исследования.
3. Формы микроорганизмов, классификация по методу Грама.
4. Роль капсул, жгутиков.
5. Характеристику колоний.

УМЕТЬ:

1. Изучать морфологию колоний с помощью светового микроскопа.
2. Готовить мазки, красить по методу Грама, микроскопировать с иммерсией.
3. Определять подвижность методом «висячей и раздавленной капли».
4. Определять капсулу по Бурри и Бурри-Гинсу.
5. Проводить предварительную агглютинацию на стекле (АГ+АТ).
6. Пересевать изолированную, изученную колонию на кос. агар.

ПРИБРЕСТИ НАВЫКИ:

1. Отбор подозрительных колоний.
2. Подготовка мазков.
3. Фиксация.

4. Окраска по Граму.
5. Подготовка препаратов на выявление капсулы, подвижности.
6. Микроскопия препаратов.
7. Техника посева петлёй на скошенный агар.
8. Агглютинация на стекле.
9. Высев со сред обогащения на элективные и дифференциально-диагностические среды – шпателем.
10. Правила работы с живой культурой.

3 – день исследования

ЗНАТЬ:

1. Ферменты, классификацию, роль ферментов при идентификации микроорганизмов.
2. Основные ферментативные свойства и их качественное определение, расщепление углеводов (сахаролитическая активность), протеолитические свойства, гемолитические свойства.

УМЕТЬ:

1. Подобрать минимальный «пестрый ряд» для изучения сахаролитических и протеолитических свойств и провести посев на среды.
2. Убедиться в чистоте выделенной культуры.

ПРИБРЕСТИ НАВЫКИ:

1. Подготовка мазков.
2. Фиксация.
3. Окраска по Граму.
4. Микроскопия.
5. Реакция агглютинации на стекле.
6. Посев из пробирки в пробирку – постановка «пестрого ряда».
7. Работа с посевами со сред обогащения.
8. Правила работы с живой культурой.

4 – день исследования

ЗНАТЬ:

1. Схему бактериологического анализа выделения чистой культуры.
2. Как учитывать ферментацию углеводов на средах Гисса, образование сероводорода, индола и других признаков исследуемой культуры. Пользование СИБами.

УМЕТЬ:

1. Заполнить протокол выделения чистой культуры.
2. Выдать результат выделения чистой культуры до рода, вида, варианта.

ПРИБРЕСТИ НАВЫКИ:

1. Работа с посевами со сред обогащения.
2. Регистрация результата.

Цели практического занятия №1 (1й день исследования).

- Учебная: 1. Ознакомить учащихся с а) методами выделения чистых культур;
б) особенностями культивирования аэробов и анаэробов.
2. Получать изолированные колонии путем посева патологического материала на элективные и дифференциально-диагностические питательные среды методом Дригальского.
3. Выявить теоретическую подготовку по данной теме.

Воспитательная:

1. Соблюдать меры предосторожности при работе с патологическим материалом.
2. Соблюдать дез.режим.

Мотивация: ПОМНИТЬ! Правильно подобранная среда и правильно выбранный метод посева имеют решающее значение при получении изолированных колоний, при изучении чистых культур.

Цели практического занятия №2 (2й день исследования).

- Учебная: 1. Изучить: культуральные свойства изолированных колоний.
2. Изучить морфологию и тинкториальные свойства микробов.
3. Определить подвижность и капсулу.
4. Провести пробную агглютинацию.
5. Отколоть изолированные колонии на кос.агар.
6. Выявить теоретические знания по второму дню исследования.

Воспитательная: При работе с живой культурой не нарушать дез.режим.

Цели практического занятия №3 (3й день исследования).

- Учебная: 1. Убедиться в чистоте выделенной культуры.
2. Изучить ферментативные свойства выделенной культуры.
3. Выявить теоретические знания 3го дня выделения культуры.

Воспитательная: При работе с живой культурой не нарушать дез.режим.

Цели практического занятия №4 (4й день исследования).

- Учебная: 1. Уметь правильно учитывать результаты ферментации.
2. Выдача результатов исследования выделения чистой культуры до рода, вида, варианта.

Воспитательная: Соблюдение дез.режима.

Мотивация практических занятий.

Изучение морфологии, подвижности, тинкториальных свойств, характера роста на средах (культуральные свойства) ферментативной активности и ряда других особенностей выделенного микроба позволяет установить его таксономическое положение, т.е. классифицировать микроорганизмы: определить его род, вид, тип, подтип, разновидность. Это называется ИДЕНТИФИКАЦИЕЙ.

Идентификация микроорганизмов очень важна при диагностике инфекций, установлении источников и путей её передачи.

План и организационная структура практического занятия №1
1 – день выделения чистой культуры – 6 ч.

1. Организация занятия 5мин.
2. Постановка учебных целей и мотивация 5 – 10мин.
3. Проверка знаний учащихся (фронтальный опрос) 40мин.
4. Демонстрационная часть 10мин.
5. Самостоятельная работа учащихся 150мин.
6. Оформление дневников 40мин.
7. Подведение итогов занятия 10мин.
8. Задание на дом 5мин.

План и организационная структура практического занятия №2
2 – день выделения чистой культуры – 6 ч.

1. Организация занятия 5мин.
2. Постановка учебных целей и мотивация 10мин.
3. Проверка знаний учащихся (фронтальный опрос, тестовый контроль) 60мин.
4. Демонстрационная часть 10мин.
5. Самостоятельная работа учащихся 140мин.
6. Оформление дневников 30мин.
7. Подведение итогов занятия, оценка 10мин.
8. Задание на дом 5мин.

План и организационная структура практического занятия №3
3 – день выделения чистой культуры – 6 ч.

1. Организация занятия 5мин.
2. Постановка учебных целей и мотивация 10мин.
3. Проверка знаний учащихся (фронтальный опрос, заполнение таблиц) 60мин.
4. Демонстрационная часть 10мин.
5. Самостоятельная работа учащихся 135мин.
6. Оформление дневников 35мин.
7. Подведение итогов занятия, оценка учащихся 10мин.
8. Задание на дом 5мин.

План и организационная структура практического занятия №4
4 – день выделения чистой культуры – 6 ч.

1. Организация занятия 5мин.
2. Постановка учебных целей и мотивация 5мин.
3. Проверка знаний учащихся (карточка, таблица, кроссворды – зачет по теме) 235мин.
4. Самостоятельная работа учащихся 20мин.
5. Оформление дневников 30мин.
6. Подведение итогов занятия 10мин.
7. Задание на дом 5мин.

Самостоятельная работа учащихся.

1 – день выделения чистой культуры.

1. Провести посев патологического материала (испражнений) на кишечную группу шпателем по Дригальскому, используя питательные среды: Плоскирева, Левина, ВСА, ЭНДО.
2. Провести посев патологического материала (испражнений) на среды обогащения - Магниевую среду.
3. Зарисовать схему бактериологического исследования выделения чистой культуры – аэробов.
4. Зарисовать 1й день исследования.
5. Занести в дневник протокол выделения чистой культуры.
6. Записать особенности культивирования анаэробов (используя записи или стр.386-387 Ф.К.Черкес).
7. Обработать рабочее место и руки дез.средством.

Задание на дом: Записи в тетрадях. Стр.109-117; повторить стр.55-66, 44-51, 386-387.

Самостоятельная работа учащихся.

2 – день выделения чистой культуры.

1. Изучение характера роста (культуральных свойств) на средах Плоскирева, Левина, ВСА, Эндо:
 - а) Макроскопическое
 - б) Микроскопическое
 - в) С помощью бак.петли.
2. Изучить форму микроба и тинкториальные свойства для чего: приготовить мазки, зафиксировать, окрасить по методу Грама, промикроскопировать с иммерсией (об:90, ок:7) со среды Эндо.
3. Приготовить препараты «висячая и раздавленная» капли для изучения подвижности. Микроскопия.
4. Приготовить препараты для обнаружения капсулы по Бурри и Бурри-Гинсу. Микроскопия.
5. Провести пробную РА на стекле.
6. Откол изученных колоний на косячок об.агара для получения чистой культуры.
7. Зарисовать результаты микроскопии.
8. Внести в протокол результаты 2го дня исследования.
9. Зарисовать и записать признаки колоний стр.147.
10. Обработать рабочее место и руки дез.средством.
11. Выполнит тестовый контроль.

Задание на дом: Записи в тетрадях. Стр.109-117; повторить стр.58-60, 94-109; записи в дневниках.

Самостоятельная работа учащихся.

3 – день выделения чистой культуры.

1. Изучить характер роста на косячке об.агара.
2. Проверить чистоту выделенной культуры, для чего: приготовить мазки, зафиксировать, окрасить по методу Грама, промикроскопировать с иммерсией.
3. Закрепить практические навыки по определению подвижности и капсулы.
4. Провести агглютинацию на стекле.
5. Провести посев из пробирки в пробирку на следующие питательные среды для изучения биохимических свойств, т.е. поставить «пестрый ряд»: ср.Клиглера (или Рессель, или Олькеницкий), ср.Гисса (СИБ). На подвижность – Пешкова (ТТХ); Симонса; желатин; индол.
6. Зарисовать «пестрый ряд».
7. Оформить протокол 3й день исследования.
8. Зарисовать агглютинацию на стекле.
9. Записать рецепт приготовления бумажек на обнаружения сероводорода и индола.

10. Заполнить таблицы.

Задание на дом: стр.115-117. Учить весь материал по выделению чистой культуры.

Вопросы к фронтальному опросу по теме: «Выделение чистой культуры» -

1й день исследования.

1. Каким требованиям должны удовлетворять питательные среды?
2. От каких факторов зависит техника посевов? Цель посевов?
3. Какие питательные среды следует использовать при первичных посевах: простые или элективные и почему?
4. Какие среды позволяют получить преимущественный рост одних микробов при одновременном подавлении других?
5. Какой патологический материал доставляют в лабораторию для бак.исследования?
6. Условия взятия пат.материала и доставки.
7. Какие условия необходимы для культивирования микроорганизмов аэробов?
8. На какие группы подразделяются микроорганизмы по типу дыхания?
9. Какие условия необходимы для культивирования анаэробов?
10. Какой прибор используют для культивирования? Устройство, техника безопасности, режим работы термостата.
11. От чего зависит выбранный метод посева?
12. Какими методами удаляется кислород, т.е. создаются оптимальные условия для культивирования анаэробов?
13. Назовите физические методы удаления кислорода.
14. Назовите биологические методы удаления кислорода.
15. Благодаря чему создаются анаэробные условия для культивирования на среде Китта-Тароцци?
16. Что входит в понятие «бактериологическое исследование»?
17. Какой должна быть культура для такого исследования?
18. Дать понятие: колония, штамм, клон, популяция.
19. Укажите какие исследования проводятся в первый день выделения чистой культуры?

Вопросы к фронтальному опросу по теме: «Выделение чистой культуры» -
2й день исследования.

1. Как вы понимаете изучение культурных свойств микроорганизмов?
2. Охарактеризуйте рост микроорганизмов на плотных питательных средах (пластинчатых средах).
3. Охарактеризуйте рост микроорганизмов на жидких питательных средах.
4. Охарактеризуйте рост микроорганизмов на полужидких питательных средах. Для каких целей производят на них посевы?
5. Как изучают морфологию микроба?
6. Как вы понимаете изучение «тинкториальных свойств»?
7. Какова цель изучения культуральных и морфологических свойств микроорганизмов?
8. Дать понятие что такое колония, чистая культура, штамм, клон.
9. Рассказать по схеме бак.исследования – 2й день выделения чистой культуры.

Вопросы к фронтальному опросу по теме: «Выделение чистой культуры» -
3й день исследования.

1. Назовите ферменты бактериальной клетки. Их роль.
2. Основное свойство ферментов.
3. Почему изучение ферментативного состава имеет важное значение?
4. Какие же основные ферментативные свойства изучают у микроорганизмов при выделении чистой культуры?
5. рассказать о сахаролитической активности. На каких средах она изучается?
6. Рассказать о протеолитических свойствах.
7. Рассказать о гемолитических свойствах. На каких средах идет определение?
8. Для каких целей готовят препараты с косячка об. агара?
9. Как вы понимаете «идентификация выделенной культуры»?
10. Как нужно изучать микроб, чтобы определить таксономическое положение? Назовите главные таксономические категории.
11. Как вы понимаете таксономическое положение микроба или его классификацию?
12. Для каких целей идентифицируют микроорганизмы?
13. Как отмечается в протоколе наличие или отсутствие признака?
14. Рассказать 3й день исследования.
15. Рассказать схему выделения чистой культуры.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР АЭРОБНЫХ И АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ

ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

1 ЭТАП (НАТИВНЫЙ МАТЕРИАЛ)

МИКРОСКОПИЯ

(Ориентировочное представление о микрофлоре)

Подготовка материала к исследованию

Посев на среды обогащения

Посев на плотные питательные среды(получение колоний)

2 ЭТАП (ИЗОЛИРОВАННЫЕ КОЛОНИИ)

Макроскопическое изучение колоний в проходящем и отраженном свете (величина, форма, цвет, прозрачность, положение, поверхность, консистенция, структура, края). Микроскопическое изучение колоний под малым увеличением микроскопа и в окрашенной мазке. Постановка пробы на аэротолерантность.

Посев на скошенный питательный агар (выделение чистой культуры).

3 ЭТАП (ЧИСТАЯ КУЛЬТУРА)

Идентификация выделенной культуры по комплексу биологических свойств: морфология и тинкториальные свойства, культуральные свойства, биохимические свойства, серологические свойства, патогенность для животных, фаголизательность, чувствительность к антибиотикам, др. свойства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ О ВЫДЕЛЕННОЙ КУЛЬТУРЕ

Изучение биохимических свойств, определение ферментативной активности, постановка «пестрого ряда» позволяет установить видовую и типовую принадлежность микроба, определить его варианты – так называемые БИОВАРЫ.

ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ СВОЙСТВА.

1. Сахаролитические свойства (сахаролитическая активность) – способность расщеплять (разлагать, ферментировать) сахара - моно- и дисахара на средах Гисса – (глюкоза, лактоза, сахароза, арабиноза, ксилоза и т.д.);
многоатомные спирты – (глицерин, дульцит, инозит);
полисахариды – (крахмал, инулин) – с образованием кислоты или кислоты и газа.

Среды Гисса содержат 1% углевода и индикатор. Под действием образующейся при расщеплении углевода кислоты, индикатор изменяет окраску среды. Поэтому эти среды названы «пестрый ряд». Микробы, не ферментирующие данный углевод, растут на среде, не изменяя её.

Сахаролитическую активность изучают так же на средах Эндо, Левина (ЭМС), Плоскирева. Микроорганизмы, сбраживая до кислоты находящийся в этих средах молочный сахар (лактозу), образуют окрашенные колонии – кислота изменяет цвет имеющегося в среде индикатора. Колонии микробов, не ферментирующих лактозу, бесцветны.

2. Протеолитические свойства (т.е. способность расщеплять белки, полипептиды и т.п.) изучают на средах с желатином, молоком, сывороткой, пептоном – отмечают разжижение желатина, свертывание сыворотки, пептонизацию молока. При расщеплении пептонов могут выделяться индол, сероводород, аммиак. Их обнаруживают при помощи индикаторных бумажек.

Кроме сред, способность расщеплять различные питательные субстраты определяют с помощью бумажных дисков, пропитанных определенными реактивами (система индикаторные бумажные – «СИБ»). По изменению цвета дисков судят о разложении углеводов, аминокислот, белков и т.д.

3. Гемолитические свойства (способность разрушать эритроциты) изучают на средах с кровью. Жидкие среды становятся прозрачными, а на плотных средах вокруг колонии появляется прозрачная зона – гемолиз. Вокруг колоний может быть позеленение среды – это за счет превращения гемоглобина в метгемоглобин.

4. Рост на синтетических средах – утилизация цитратов – изучают на средах Симонса и ацетатных средах.

При утилизации цитратов цвет среды изменяется – из зеленого в синий.

Выделение чистых культур бактерий.

Чистая культура – определённый вид микроорганизмов, по наличию которого в организме больного человека и животного можно подтвердить поставленный диагноз инфекционного заболевания.

Получение чистой культуры и умение установить её видовую принадлежность в медицинской микробиологии имеют первостепенное значение. При выполнении этой задачи следует иметь в виду, что в патологических материалах возбудитель заболевания, как правило, находится в ассоциации с банальной (посторонней) микрофлорой. Следовательно, для его изоляции гной, мокроту, осадки мочи, испражнения и прочие экскреты необходимо засеять так, чтобы получить колонии. С этой целью бактериальной петлёй или шпателем материалы засевают на агаризованные среды в чашках Петри. Выросшие колонии после детального изучения пересевают на скошенные и жидкие среды для накопления биомассы. В процессе накопления исследуются культуральные свойства чистой культуры ((1 этап идентификации)).

Окончательное заключение о природе чистой культуры (вида) делают только после всестороннего изучения биохимических свойств, которые тесно переплетены с культуральными; серологических реакций (действие специфических сывороток); фагочувствительности культуры и её патогенности для экспериментальных животных ((2 этап идентификации)). При этом следует учитывать некоторые различия в выборе метода получения чистых культур аэробных и анаэробных бактерий.

ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ.

В исследуемом материале содержится обычно не один, а несколько видов микроорганизмов. Для выделения одного из них существуют разные методы в зависимости от свойств изучаемого материала и цели исследования. Один из методов – метод посева по Дригальскому.

На плотную питательную среду на ч.Петри наносят каплю исследуемого материала. Стерильным шпателем каплю растирают по всей поверхности среды. Этот же шпатель переносят в другую чашку, затем не обжигая в третью. В последнюю чашку попадает меньше микробов, а следовательно вырастет меньше колоний, они могут быть изолированными, что позволит выделить чистую культуру.

При этом происходит механическое разделение микробных клеток. Из каждой такой клетки вырастает КОЛОНИЯ, которая представляет собой совокупность особей одного исходного организма.

КОЛОНИЯ – совокупность микроорганизмов, развивающихся из одной микробной клетки.

ЧИСТОЙ КУЛЬТУРОЙ называется скопление микробов одного вида на плотной или жидкой питательной среде.

ШТАММ – чистая культура микроорганизмов одного вида, у которого изучены морфологические и физиологические особенности. Разные штаммы микроорганизмов одного и того же вида по ряду свойств (например, чувствительности к антибиотикам) отличаются друг от друга.

КЛОН – (ветвь, отпрыск) ряд следующих друг за другом поколений наследственно-однородных потомков одной исходной особи (растения, микроорганизмов, животного) образующиеся в результате бесполого размножения.

Клонирование клеток применяется в онкологии, генетике.

Клон – это однородные микроорганизмы, которые произошли от одной микробной клетки.

ЭТАПЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ

1-й день – получение изолированных колоний – посев по Дригальскому.

2-й день – изучают рост микробов на чашках. На 1-ой чашке сплошной рост; на 2,3-ей изолированные колонии. Пересев на скошенный агар.

ВНИМАНИЕ! ПЕРЕСЕВАТЬ МОЖНО ТОЛЬКО ИЗОЛИРОВАННЫЕ КОЛОНИИ!

3-й день – изучение характера роста на скошенном агаре; убедиться в чистоте культуры, затем приступают к её изучению: сахаролитических, протеолитических, гемолитических, серологических свойств и ставят биопробу.

4-й день – ВЫДАЧА РЕЗУЛЬТАТОВ: РОД, ВИД, ВАРИАНТ выделенной культуры.

При выделении чистой культуры из крови (гемокультуры) проводят посев в жидкую питательную среду в соотношении 1:10 или 1:15. Затем высевают на чашки для получения изолированных колоний.

При выделении чистой культуры из мочи, промывных вод желудка и других жидкостей их предварительно центрифугируют в асептических условиях и засевают осадок. Дальнейшее выделение чистой культуры производят обычным способом.

Для выделения чистых культур широко применяют элективные среды. В ряде методов для получения чистых культур используют биологические особенности выделяемого микроба. Например: перед посевом спорообразующих ворм их прогревают при 80° С 10 мин., убив вегетативные формы.

Возбудитель туберкулёза перед посевом обрабатывают кислотами, щелочами. Для выделения пневмококка и возбудителя чумы используют биологический метод.

ЭЛЕКТИВНЫЕ И ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ НА КИШЕЧНУЮ ГРУППУ

СРЕДА ЭНДО

Среда Эндо состоит из мясо-пептонного агара, 1% лактозы и индикатора в виде основного фуксина, обесцвеченного сульфитом натрия (фуксин-сернистая кислота). Микробы, имеющие фермент лактозу, ферментируют лактозу с образованием альдегидов, и фуксин-сернистая кислота переходит в альдегид-сернистое состояние. Фуксин освобождается, окрашивая колонии в красный цвет. Лактозоотрицательные бактерии образуют бесцветные колонии.

СРЕДА ЛЕВИНА

Среда Левина состоит из мясо-пептонного агара, 0,5% водного раствора метиленового синего, 2% раствора желтого эозина, лактозы и двуосновного фосворнокислого калия. Эта среда темно-фиолетового цвета. Лактозоположительные бактерии образуют колонии синего цвета (кишечная палочка), лактозоотрицательные – бесцветные колонии (дизентерийные бактерии).

БАКТОАГАР ПЛОСКИРЕВА

Бактоагар Плоскирева состоит из мясо-пептонного агара, лактозы, бриллиантового зеленого, солей желчных кислот, минеральных солей и индикатора нейтрального красного. Эта среда является не только дифференциально-диагностической, но и селективной, т.к. она подавляет рост многих микроорганизмов (микродов воздуха, кишечной палочки и др.) и способствует лучшему росту возбудителей брюшного тифа, паратифов и дизентерии. Лактозоотрицательные бактерии образуют бесцветные колонии, а лактозоположительные – колонии красного цвета.

СРЕДА ВИСМУТ-СУЛЬФИТ-АГАР

Среда ВСА состоит из мясо-пептонного агара, глюкозы, соли натрия (натрия-сульфит), соли Мора, висмута лимоннокислого, индикатора бриллиантовый зеленый. Колонии брюшного тифа, сальмонелл черного цвета с металлическим блеском за счет восстановления сульфита натрия. На месте снятия колонии остается черный цвет. Колонии брюшного тифа и паратифов могут быть и зеленого цвета.

ХАРАКТЕР РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ НА ПЛОТНЫХ И ЖИДКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ. (КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА)

Для каждой культуры микроорганизмов характерен определенный рост на питательных средах. Рост микроорганизмов изучают по следующей схеме:

1. МАКРОСКОПИЧЕСКОЕ (невооруженным глазом) изучение колоний в проходящем и отраженном свете.

В проходящем свете – со стороны дна ч.Петри:

- а) Величина колоний (размеры) – колонии могут быть – крупные, средние, мелкие, точечные или росинчатые, карликовые.
- б) Форма – круглая, овальная, правильная, неправильная.
- в) Прозрачность – прозрачная, полупрозрачная, непрозрачная.

В отраженном свете – со стороны крышки ч.Петри:

- а) Поверхность – ровная, гладкая, складчатая, бугристая, матовая или блестящая, шероховатая.
- б) Высота (расположение колоний на поверхности среды) – выпуклое, плоское, вдавленное.
- в) Пигмент (определение окраски колоний) – красный, желтый, черный, коричневый, бесцветные.

2. МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ изучение колоний с помощью микроскопа (малое увеличение, сухая система) по следующим признакам:

- а) Структура - аморфная, зернистая (мелкая, средняя, крупная).
- б) Край колоний – ровный, неровный, волнообразный, фестончатый, бахромчатый, локонообразный.

3. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ ПЕТЛЕЙ – при дотрагивании до колонии определяют её консистенцию – маслообразная, хрупкая, жесткая.

Изучение роста культур на жидких средах:

- 1. Рост на поверхности питательной среды может отсутствовать.
- 2. Может быть в виде пленки нежной или грубой, складчатой или гладкой.
- 3. Пристеночный в виде кольца.
- 4. Придонный в виде осадка, как кусок ваты или может быть зернистым. При встряхивании осадок вязкий или крошковатый.
- 5. Диффузный рост – помутнение питательной среды – слабое или сильное или может отсутствовать.

На полужидких средах при посеве уколом подвижные микробы вызывают диффузный рост или в виде пера, елочки (прямой или перевернутой). Неподвижный микроб – линия укола сплошная, в виде цепочки. (рост по уколу)

Все выше перечисленные признаки роста микроорганизмов служат для их **идентификации.**

ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

1. Применение щелочных растворов пирогаллола для поглощения кислорода в замкнутой воздушной среде. Для поглощения кислорода из 220мл. воздуха применяют смесь, состоящую из 1мл. 20%-ра пирогаллола и 1мл. насыщенного р-ра карбоната натрия Na_2CO_3 .

2. Для поглощения кислорода из замкнутого пространства можно применять гидросульфид натрия. Для связывания кислорода в 1л. объема берут 100 мл. свежеприготовленного 20%-ра NaHSO_3 и 16мл. 50% КОН. Эти реагенты связывают кислород быстрее, чем пирогаллол.

3. Для связывания остатков кислорода в предназначенных для роста анаэробов питательных средах используют вещества – редуценты, к которым относятся тиогликолевая кислота или тиогликолат натрия (0,01 – 0,02%), аскорбиновая кислота (0,1%), различные сахара (0,1 – 3%), цистин и цистеин (0,03 – 0,05%), муравьинокислый натрий (0,25 – 0,75%) и др.

МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ.

Для успешного культивирования необходимы следующие условия:

1. Правильно подобранные питательные среды.
2. Правильно произведенный посев.
3. Оптимальные условия:
 - а) Температура
 - б) Влажность
 - в) Аэрация (снабжение воздухом)
 - г) Сроки культивирования
 - д) Свет (при необходимости)
 - е) Создание анаэробных условий при культивировании анаэробов.

Для культивирования актиномицетов, грибов, микоплазм, Л-форм, спирохет, простейших разработаны специальные среды и подобраны режимы, соответствующие их потребностям.

Риккетсии и вирусы культивируют в культурах тканей, организме экспериментальных животных, в куриных эмбрионах.

МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ АНАЭРОБОВ.

Культивируют анаэробы в бескислородных условиях.

Существует несколько способов удаления кислорода при культивировании: физические и биологические.

Физические методы:

1. Удаление кислорода механическим путем; используя:
 - а) Анаэрокат
 - б) Эксикатор
2. Культивирование в атмосфере инертного газа.
3. Культивирование в высоком столбике агара с глюкозой.
4. Метод Виньяля-Вейона

Биологические методы:

1. Совместное выращивание анаэробов и аэробов.
2. Добавление в среду редуцирующих (окисляющих) веществ – использование среды Китта-Тароцци.
(Перед посевом среду кипятят 20 мин., охлаждают до 45°C засевают и заливают стерильным вазелиновым маслом (слой – 1-1,5 см.)).

ХАРАКТЕРИСТИКА S И R ФОРМ КОЛОНИЙ.

S форма	R форма
1. Колонии гладкие, блестящие, правильной выпуклой формы.	1. Колонии неправильной формы, мутные, шероховатые.
2. При росте в бульоне – равномерная муть.	2. Растут в бульоне в виде осадка.
3. У подвижных бактерий имеются жгутики.	3. У подвижных бактерий жгутики могут отсутствовать.
4. У капсульных бактерий имеется капсула.	4. Капсулы отсутствуют.
5. Биохимически активны.	5. Биохимические свойства выражены слабо.
6. Болезнетворны.	6. Большинство бактерий менее болезнетворны.
7. Выделяются чаще в остром периоде заболевания.	7. Выделяются обычно при хронической форме заболевания.

Изучение морфологических свойств микроорганизмов.

Изучение морфологии микробов служит для их дифференциации. Морфологию изучают в окрашенных препаратах.

Устанавливают форму и величину клеток, их расположение в препарате, наличие спор, капсул, жгутиков.

В окрашенных препаратах определяют отношение микробов к краскам (тинкториальные свойства).

Витальная (прижизненная) окраска позволяет установить подвижность, дифференцировать живые и мертвые клетки, следить за их делением.

Деление и подвижность можно изучать в нативных (неокрашенных) препаратах.

ОСОБЕННОСТИ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ НА ПЛОТНЫХ И В ЖИДКИХ СРЕДАХ (культуральные признаки)

Рост на плотной среде. Микроорганизмы, развиваясь на поверхности плотных сред, образуют характерные для данного вида колонии. Поэтому описание колоний — один из признаков, который необходим для идентификации исследуемого микроорганизма.

При описании колонии отмечают следующие признаки:

форму колонии (рис. 52) — округлая, амебовидная, ризоидная, неправильная и т. д.;

размеры — диаметр в мм; если размеры колонии не превышают 1 мм, то такие колонии называют точечными;

оптические свойства — прозрачная, полупрозрачная (просвечивает), непрозрачная, блестящая, матовая, флуоресцирующая; цвет — отмечают цвет колонии и выделяется или не выделяется пигмент в среду;

поверхность — гладкая, шероховатая, складчатая, бугристая; профиль (рис. 53) — плоский, выпуклый, кратерообразный, врастающий в агар и т. д.;

край колонии (рис. 54) — ровный, волнистый, лопастной, ризоидный и др.;

структуру колонии (рис. 55) — однородная, мелко- или крупнозернистая, струйчатая;

консистенцию — маслянистая, тестообразная, вязкая, пленчатая;

способность к эмульгированию — равномерная или зернистая суспензия в воде, слабо или совсем не суспендируется в воде.

Край и структуру колонии определяют при малом увеличении микроскопа; чашку Петри в этом случае помещают на столик микроскопа крышкой вниз. Консистенцию колонии устанавливают прикосновением к ее поверхности микробиологической петлей.

При посеве клеток в толщу плотной питательной среды наряду с поверхностными колониями наблюдается образование глубинных и донных колоний. Глубинные колонии довольно однообразны и чаще всего имеют вид сплюснутых чечевичек. Лишь у немногих бактерий глубинные колонии напоминают клочки ваты из-за нитевидных выростов в толщу среды. Если микроорганизмы

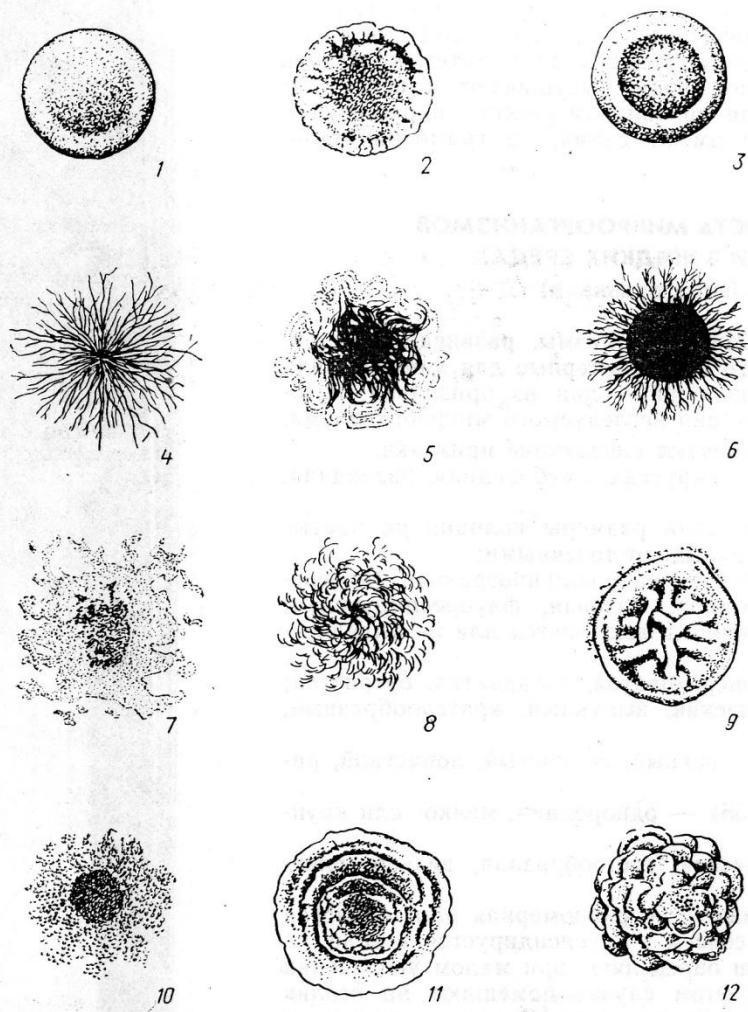


Рис. 52. Форма колоний: 1 — круглая; 2 — круглая с фестончатым краем; 3 — круглая с валиком по краю; 4 и 5 — ризондные; 6 — с ризоидным краем; 7 — амёбовидная; 8 — нитевидная; 9 — складчатая; 10 — неправильная; 11 — концентрическая; 12 — сложная

в процессе развития выделяют газы, образование глубинных колоний сопровождается разрывом плотной среды.

Еще менее характерны донные колонии, образующиеся при соприкосновении агаризованной среды с дном чашки Петри. Эти

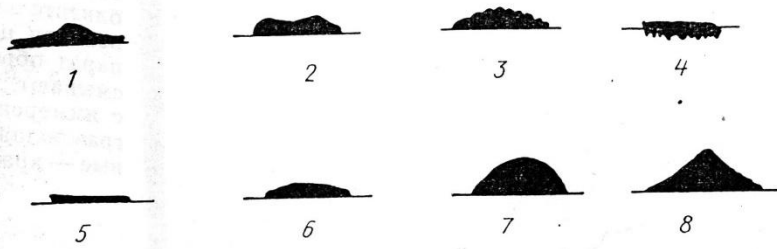


Рис. 53. Профиль колоний: 1 — изогнутый; 2 — кратерообразный; 3 — бугристый; 4 — растущий в агар; 5 — плоский; 6 — выпуклый; 7 — конусовидный; 8 — конусовидный

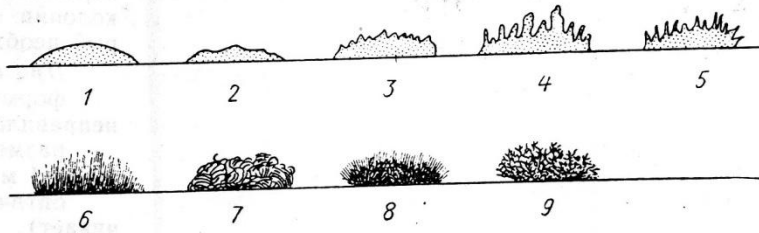


Рис. 54. Край колонии: 1 — гладкий; 2 — волнистый; 3 — зубчатый; 4 — лопастной; 5 — неправильный; 6 — реснитчатый; 7 — нитчатый; 8 — ворсинчатый; 9 — ветвистый

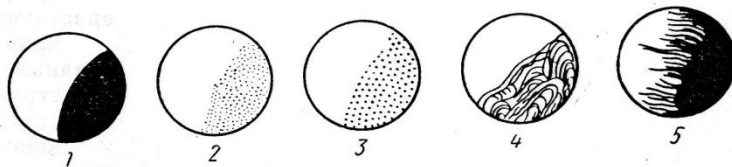


Рис. 55. Структура колонии: 1 — однородная; 2 — мелкозернистая; 3 — крупнозернистая; 4 — струйчатая; 5 — волокнистая

колонии обычно имеют вид довольно крупных, бесцветных прозрачных налетов.

Описание колонии часто дополняют описанием *роста микроорганизмов по штриху* на поверхности скошенной плотной питательной среды. Отмечают интенсивность роста по штриху: скудный, умеренный, обильный, — и его особенности: налет сплошной с ровным или волнистым краем, четковидный в виде цепочки изолированных колоний, диффузный, перистый, древовидный или ризонидный (рис. 56). Характеризуют оптические свойства штриха, его цвет, поверхность и консистенцию.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ:

НАЛИЧИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТА обозначают знаком «+»

ОТСУТСТВИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТА обозначают знаком «-»

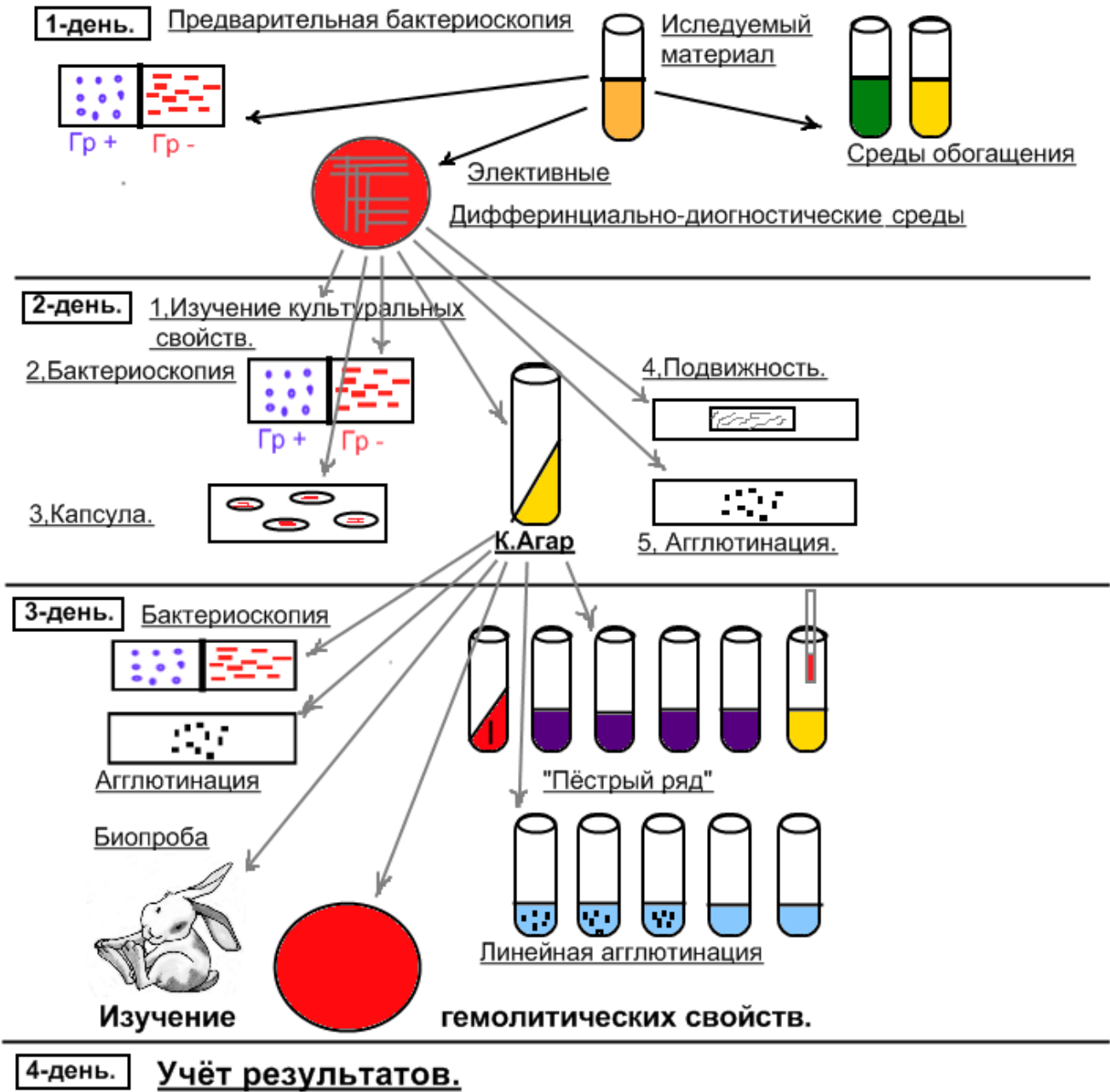
НАЛИЧИЕ КИСЛОТЫ обозначают – «к»

НАЛИЧИЕ КИСЛОТЫ И ГАЗА обозначают – «кг»

Выделение микроорганизмами различных ферментов определяет их биохимические свойства. Ферментный состав любого микроорганизма является достаточно постоянным признаком, а различные виды микроорганизмов довольно четко различаются по набору ферментов.

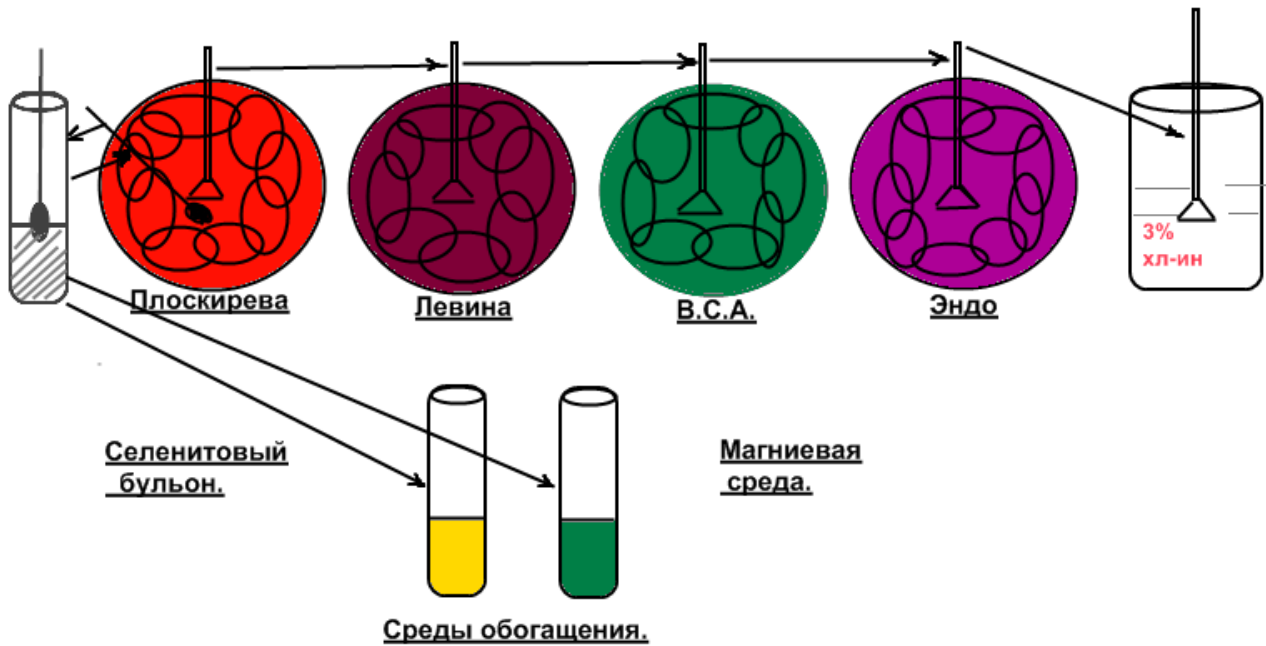
Поэтому изучение ферментативного состава имеет важное значение для дифференциации и идентификации различных микроорганизмов.

**Схема бактериологического анализа
(Выделение чистой культуры)**



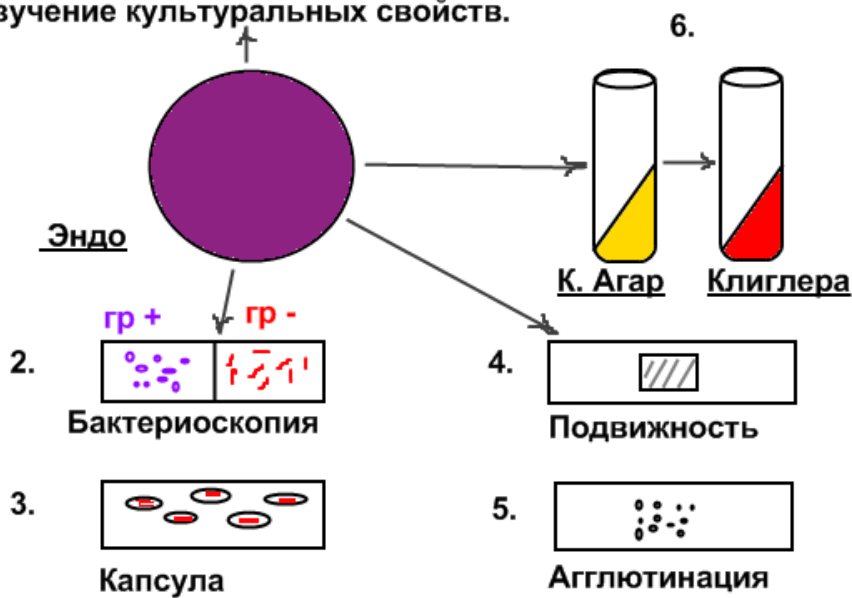
1-ый день выделения чистой культуры.

Посев шпателем по Дригальскому

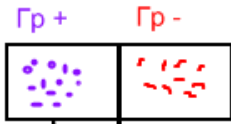


2-ой день выделения чистой культуры.

1. Изучение культуральных свойств.



3-ий день выделения чистой культуры.



Проверка чистоты культуры

Посев из пробирки в пробирку.



Изучение биохимических свойств (постановка "пёстрого ряда")

скошенный агар

Клиглера
(H₂S)

Глюкоза (гл)

Лактоза (ла)

Сахароза (са)

Мальтоза (мл)

Маннит (мн)

СИБ

Манноза (ма)

Симонса

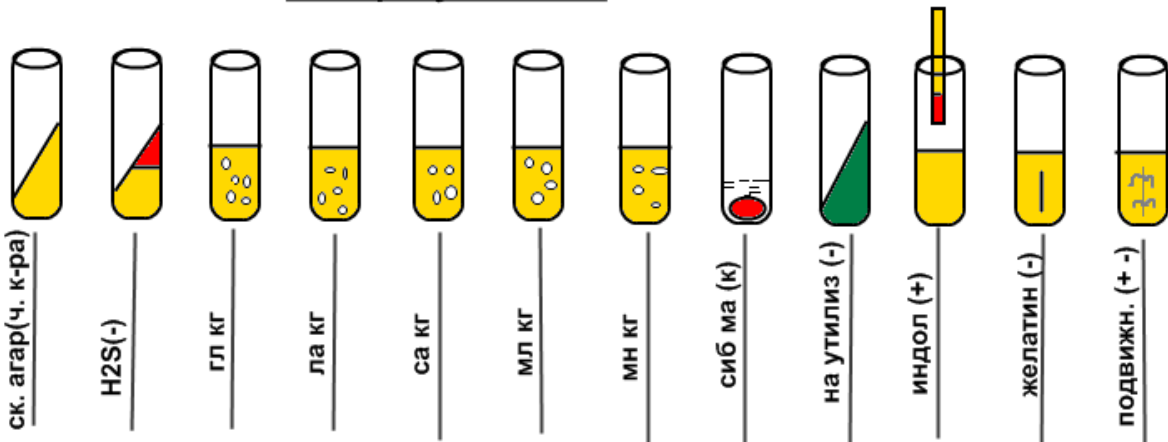
МПБ (индол)

Желатин

Пешкова
(подвижность)

4-ый день выделения чистой культуры.

Учёт результатов.



ск. агар(ч. к-ра)

H₂S(-)

гл кг

ла кг

са кг

мл кг

мн кг

сиб ма (к)

на утилиз (-)

индол (+)

желатин (-)

подвижн. (+ -)

Выдача ответа: Выделена:

Escherichia coli.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ф.К. Черкес «Микробиология» Москва, издательство «Медицина», 2012г.
2. М.Н. Синюшина, М.Н. Самсонова «Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии», Москва, издательство «Медицина», 1974г.
3. М.П. Зыкова «Руководство к практическим занятиям по микробиологии, иммунологии, вирусологии», Москва, издательство «Медицина», 1977г.
4. Л.Б. Борисова «Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии», Москва, издательство «Медицина», 1984г.
5. А.А. Воробьева, Ю.С. Кривошеина «Основы микробиологии, вирусологии, иммунологии», Москва, 2001г.
6. А.М.Королюк «Медицинская микробиология», Санкт-Петербург, 1999г.
7. С.А. Павлович «Медицинская микробиология», Минск, 1999г.

Тестовый контроль: «Изучение культуральных свойств микроорганизмов»

Вариант 1

1. При изучении морфологии колоний в проходящем свете их различают по:

- 1.цвету
- 2.величине
- 3.характеру поверхности
- 4.прозрачности
- 5.форме
- 6.высоте
- 7.консистенции
- 8.краю
- 9.структуре

2. При изучении морфологии колоний в отраженном свете их различают по:

- 1.величине
- 2.прозрачности
- 3.цвету
- 4.форме
- 5.характеру поверхности
- 6.высоте
- 7.консистенции
- 8.краю
- 9.структуре

3. При микроскопическом изучении отмечают следующие признаки:

- 1.величину
- 2.цвет
- 3.характер поверхности
- 4.край
- 5.прозрачность
- 6.форму
- 7.структуру
- 8.консистенцию
- 9.высоту

4. С помощью петли отмечают:

- 1.форму
- 2.цвет
- 3.структуру
- 4.консистенцию
- 5.характер поверхности
- 6.величину
- 7.высоту
- 8.прозрачность
- 9.край

Тестовый контроль: «Изучение культуральных свойств микроорганизмов»

Вариант 2

1. При изучении морфологии колоний в проходящем свете их различают по:

1. форме
2. прозрачности
3. характеру поверхности
4. цвету
5. величине
6. краю
7. структуре
8. консистенции
9. высоте

2. При изучении морфологии колоний в отраженном свете их различают по:

1. структуре
2. краю
3. высоте
4. характеру поверхности
5. форме
6. прозрачности
7. цвету
8. консистенции
9. величине

3. При микроскопическом изучении отмечают следующие признаки:

1. величину
2. структуру
3. консистенцию
4. форму
5. край
6. характер поверхности
7. высоту
8. цвет
9. прозрачность

4. С помощью петли отмечают:

1. высоту
2. величину
3. структуру
4. прозрачность
5. характер поверхности
6. край
7. форму
8. цвет
9. консистенцию

Тестовый контроль: «Изучение культуральных свойств микроорганизмов»

Вариант 3

1. При изучении морфологии колоний в проходящем свете их различают по:

1. консистенции
2. структуре
3. краю
4. величине
5. цвету
6. характеру поверхности
7. прозрачности
8. форме
9. высоте

2. При изучении морфологии колоний в отраженном свете их различают по:

1. цвету
2. прозрачности
3. форме
4. характеру поверхности
5. высоте
6. краю
7. структуре
8. величине
9. консистенции

3. При микроскопическом изучении отмечают следующие признаки:

1. край
2. форму
3. консистенцию
4. структуру
5. величину
6. характер поверхности
7. цвет
8. прозрачность
9. высоту

4. С помощью петли отмечают:

1. структуру
2. прозрачность
3. характер поверхности
4. край
5. форму
6. цвет
7. консистенцию
8. высоту
9. величину

Тестовый контроль: «Изучение культуральных свойств микроорганизмов»

Вариант 4

1. При изучении морфологии колоний в проходящем свете их различают по:

1. величине
2. краю
3. структуре
4. консистенции
5. высоте
6. форме
7. прозрачности
8. характеру поверхности
9. цвету

2. При изучении морфологии колоний в отраженном свете их различают по:

1. характеру поверхности
2. форме
3. прозрачности
4. цвету
5. консистенции
6. величине
7. высоте
8. структуре
9. краю

3. При микроскопическом изучении отмечают следующие признаки:

1. величину
2. структуру
3. консистенцию
4. форму
5. край
6. характер поверхности
7. высоту
8. прозрачность

4. С помощью петли отмечают:

1. консистенцию
2. цвет
3. высоту
4. форму
5. величину
6. край
7. характер поверхности
8. прозрачность
9. структуру

Тестовый контроль: «Изучение культуральных свойств микроорганизмов»

Вариант 5

1. При изучении морфологии колоний в проходящем свете их различают по:

- 1.цвету
- 2.характеру поверхности
- 3.прозрачности
- 4.форме
- 5.краю
- 6.структуре
- 7.высоте
- 8.величине
- 9.консистенции

2. При изучении морфологии колоний в отраженном свете их различают по:

- 1.структуре
- 2.краю
- 3.высоте
- 4.величине
- 5.консистенции
- 6.цвету
- 7.прозрачности
- 8.форме
- 9.характеру поверхности

3. При микроскопическом изучении отмечают следующие признаки:

- 1.прозрачность
- 2.высоту
- 3.цвет
- 4.характер поверхности
- 5.край
- 6.форму
- 7.консистенцию
- 8.структуру
- 9.величину

4. С помощью петли отмечают:

- 1.структуру
- 2.прозрачность
- 3.характер поверхности
- 4.край
- 5.величину
- 6.форму
- 7.высоту
- 8.цвет
- 9.консистенцию

Тестовый контроль: «Изучение культуральных свойств микроорганизмов»

Вариант 6

1. При изучении морфологии колоний в проходящем свете их различают по:

1. структуре
2. краю
3. форме
4. прозрачности
5. характеру поверхности
6. цвету
7. величине
8. высоте
9. консистенции

2. При изучении морфологии колоний в отраженном свете их различают по:

1. характеру поверхности
2. форме
3. прозрачности
4. цвету
5. консистенции
6. величине
7. высоте
8. краю
9. структуре

3. При микроскопическом изучении отмечают следующие признаки:

1. величину
2. структуру
3. консистенцию
4. форму
5. край
6. характер поверхности
7. цвет
8. высоту
9. прозрачность

4. С помощью петли отмечают:

1. консистенцию
2. цвет
3. высоту
4. форму
5. величину
6. край
7. характер поверхности
8. прозрачность
9. структуру