

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Вологодская государственная молочнохозяйственная академия имени Н.В.
Верецагина»

Факультет ветеринарной медицины и биотехнологий

Кафедра эпизоотологии и микробиологии

Техника посева и признаки роста микроорганизмов на питательных средах

Методические указания для проведения лабораторно-практических занятий по дисциплине «Основы микробиологии» для студентов по специальности 36.02.01 – Ветеринария, квалификация выпускника - Ветеринарный фельдшер

УДК 579.017.08
ББК 28.4
Т 381

Составитель -
Канд.вет. наук, доцент кафедры эпизоотологии и микробиологии
Е.Н. Закрепина

Рецензенты:
Кандидат тех. наук, доцент кафедры эпизоотологии и микробиологии
В.И. Носкова
Доцент кафедры внутренних незаразных болезней, хирургии и акушерства
Е.С. Баруздина

Т 381 Техника посева и признаки роста микроорганизмов на питательных средах:
Методические указания/ Сост. Е.Н. Закрепина. – Вологда – Молочное: ВГМХА, 2024.

Методические указания для проведения лабораторно-практических занятий по дисциплине «Основы микробиологии» для студентов по специальности 36.02.01 – Ветеринария, квалификация выпускника - Ветеринарный фельдшер

Печатается по решению редакционно-издательского совета Вологодской государственной
молочнохозяйственной академии имени Н.В.Верецагина.

ВВЕДЕНИЕ

Одно из ведущих мест в учебном процессе подготовки квалифицированного специалиста занимает дисциплина микробиология. Микроорганизмы распространены в окружающем нас мире довольно широко: в воздухе, воде, почве, продуктах питания и кормах, а также в организме животных и человека. Именно бактерии осуществляют такие глобальные процессы как брожение, гниение и т.д., участвуют в преобразовании соединений азота, углерода и других веществ. Однако, не все микроорганизмы полезны, нас постоянно окружают патогенные, условно-патогенные и технически вредные бактерии, которые также являются объектами изучения науки микробиологии.

Рациональное использование микроорганизмов и успешная борьба с вредной и опасной микрофлорой могут осуществляться только на базе глубоких знаний свойств бактерий. Начальным этапом этой работы является проведение посевов и культивирование микроорганизмов на питательных средах.

1 Материальное обеспечение

1. Инструменты и оборудование: лабораторные автоклавы; лабораторная посуда (пробирки, колбы, пипетки химические, пипетки автоматические, чашки Петри, химическая бюретка), дозатор диспенсер бутылочный, штативы для пробирок, электрические плиты, холодильники, посуда для приготовления сред.

2. Материалы для лабораторных занятий: наборы сухих питательных сред, чистые культуры бактерий, физиологический раствор, дистиллированная вода.

2 Техника посева микроорганизмов

Для получения бактериальных культур, изучения свойств и идентификации микроорганизмов, в начале, проводят посев материала на лабораторные питательные среды.

Посев – это внесение небольшого количества материала, содержащего микроорганизмы на питательную среду (в питательную среду) и создание условий для дальнейшего роста и развития их.

Эту работу проводят обязательно вблизи горячей газовой или спиртовой горелки, чтобы во время посева избежать бактериального загрязнения извне (рис.1).



Рис.1 Горелки, применяемые в бактериологии

Посев проводят петлей, пипеткой, иглой, шпателью или другим инструментом. Выбор инструмента зависит от консистенции материала и питательных сред, лабораторной посуды, назначения исследования и других факторов, но обязательным условием является стерильность инструментов (рис.2).

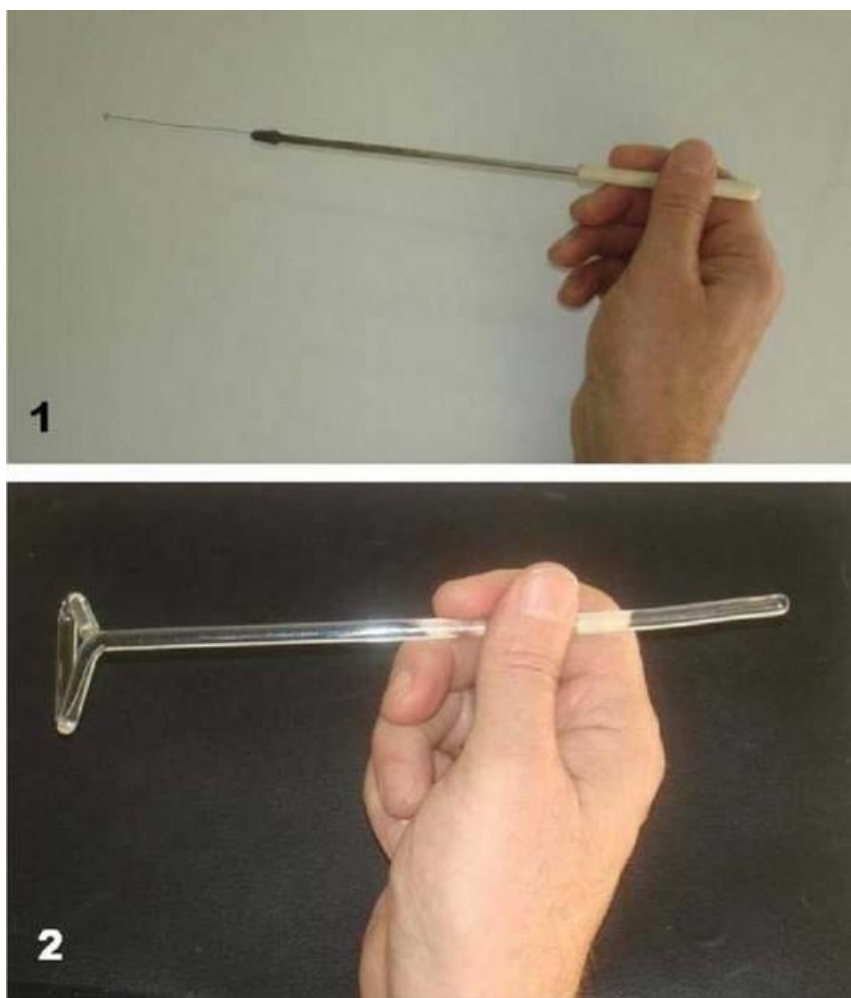


Рис.2 Инструменты, применяемые в бактериологии:
бактериологическая петля -1, шпатель -2

Перед посевом необходимо тщательно сделать надпись (маркировку) на пробирке (колбе или чашке Петри) с указанием номера экспертизы, названия микроорганизма (или материала) и даты посева. Надпись делают маркером по стеклу, восковым карандашом или наклеивают этикетку (рис.3).

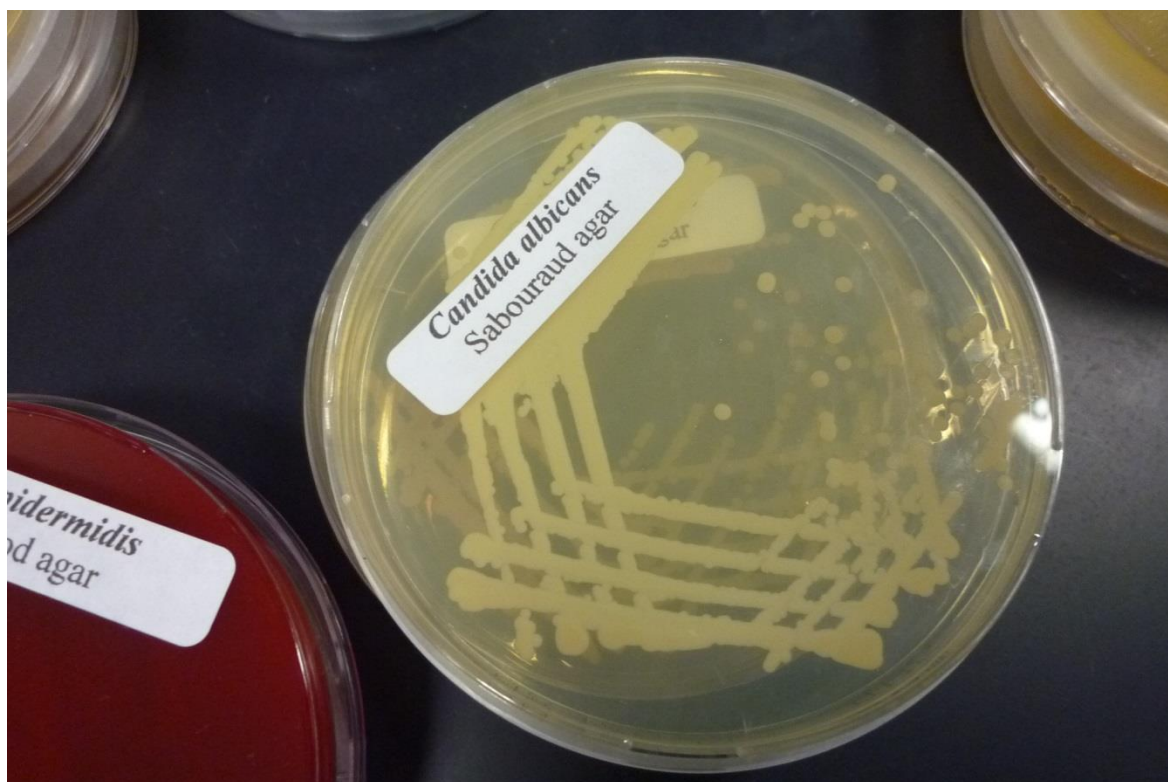


Рис.3 Маркировка чашек Петри

Для посева используют только стерильные питательные среды (рис.4).



Рис.4 Питательные среды, применяемые в микробиологии

При посеве и дальнейшем культивировании микроорганизмов обязательно учитывают их физиологические потребности: наличие необходимых питательных веществ в доступной форме, отношение к кислороду воздуха и т.д.

В качестве инструмента для посева микроорганизмов чаще всего используют бактериологическую петлю. Бактериологическую петлю перед взятием клеток

микроорганизмов стерилизуют методом фламбирования. Для этого проволоку прокалывают докрасна в пламени горелки и одновременно обжигают примыкающую к петле часть держателя, которая будет вводиться внутрь сосуда, содержащего микроорганизмы. При прокаливании петлю держат в пламени почти вертикально, чтобы вся проволока была равномерно раскалена. Сразу же после стерилизации, петлю (иглу) вводят в сосуд с микроорганизмами. Чтобы не повредить клетки микроорганизмов, петлю (иглу) вначале охлаждают, прикасаясь к внутренней поверхности сосуда или к питательной среде, где отсутствует рост, и только после этого захватывают небольшое количество микробной массы.

Отбор клеток микроорганизмов, выращенных на плотной среде в пробирке, осуществляют следующим образом. Пробирку с культурой берут в левую руку таким образом, чтобы поверхность питательной среды с налетом выросших микроорганизмов была обращена кверху и хорошо видна. Пробирку держат в горизонтальном или несколько наклонном положении. В правую руку берут петлю и держат ее как карандаш, прокалывают в пламени горелки. Затем, не выпуская петли, проносят горлышко пробирки и пробку в пламени горелки, а затем мизинцем и безымянным пальцем правой руки прижимают наружный конец ватной пробки к ладони и вынимают пробку из пробирки. Край открытой пробирки слегка обжигают в пламени горелки, вводят в пробирку стерильную петлю и, отобрав небольшое количество микробной массы, вынимают петлю из пробирки. Горлышко пробирки снова обжигают в пламени горелки, затем обжигают внутренний конец ватной пробки и закрывают ею пробирку, которую ставят в штатив, а извлеченный материал используют для посева в питательную среду или приготовления препарата. Клетки микроорганизмов, оставшиеся на петле, сжигают в пламени горелки. В этом случае прокалывание петли начинают с участка проволоки, примыкающего к кольцу, чтобы клетки, оставшиеся на петле, подсыхли и не образовали аэрозоль, загрязняющий воздух. Затем петлю переводят в вертикальное положение, прокалывают докрасна и только после этого ставят на место (рис.5).

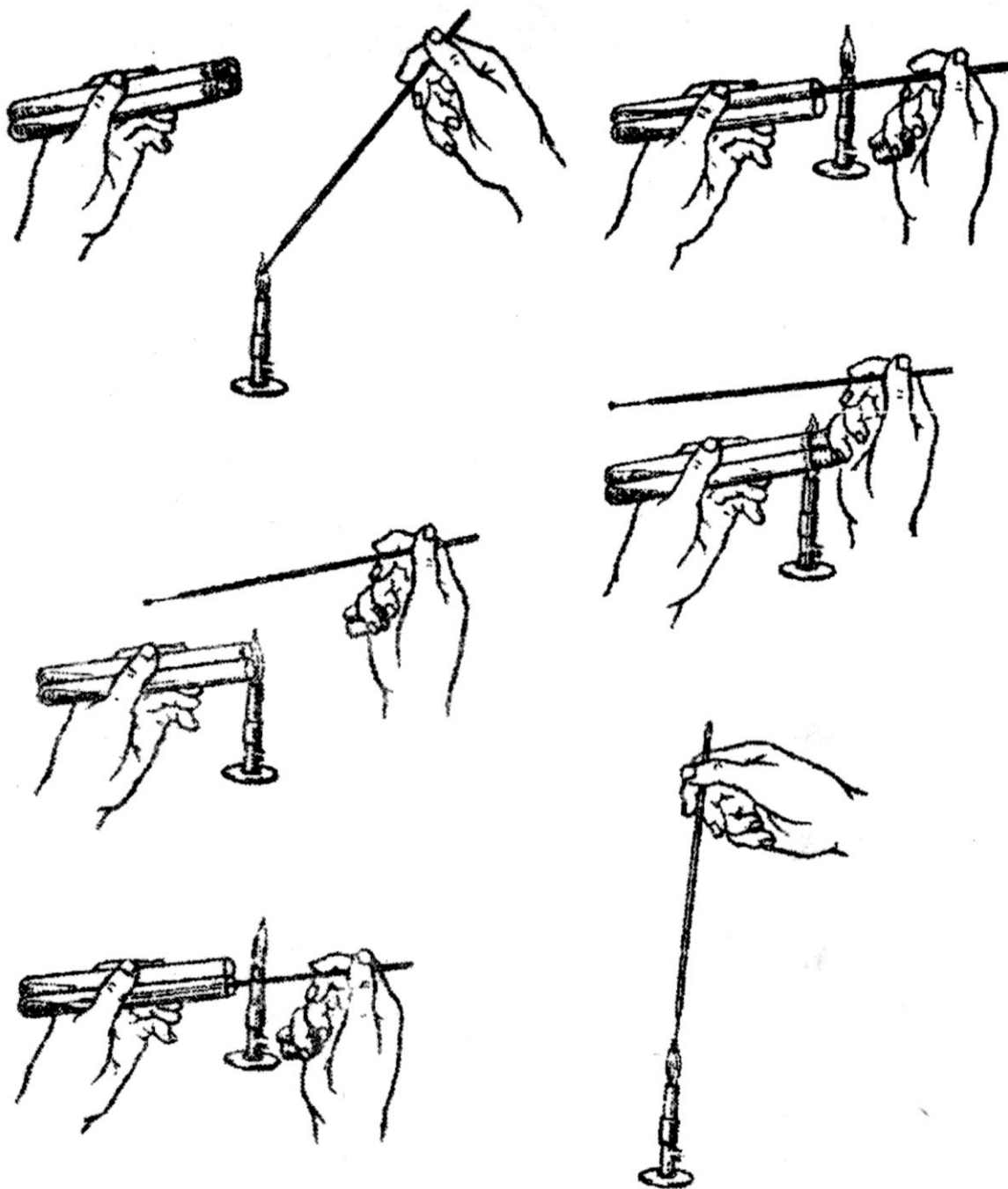


Рис.5 Техника отбора материала

Клетки микроорганизмов, выросшие в жидкой среде, отбирают стерильной пипеткой (рис.6), реже — петлей. Для этого на пипетку надевают стерильный наконечник, в левую руку берут пробирку (колбу) с жидкой средой, открывают пробку, соблюдая все предосторожности, описанные выше, пипетку вводят в сосуд. Отобрав часть среды, закрывают сосуд пробкой. Взятую пробу используют для приготовления препарата или

посева в свежую питательную среду. После этого наконечник немедленно помещают в дезинфицирующий раствор, не касаясь ею окружающих предметов.



Рис.6 Пипетки, применяемые в микробиологии

При пересеве клеток микроорганизмов с одной среды на другую в левую руку удобно взять две пробирки — одну со стерильной средой (дальше от себя), другую — с культурой микроорганизмов (ближе к себе), а в правую руку — бактериологическую петлю. Стерилизуют петлю в пламени горелки, затем, прижав пробки двух пробирок к ладони мизинцем и безымянным пальцами правой руки, открывают пробирки. Бактериологической петлей отбирают клетки микроорганизмов и вводят петлю в пробирку со стерильной скошенной средой почти до дна; петлю выводят вверх зигзагообразно или прямо (штрих) (рис.7).

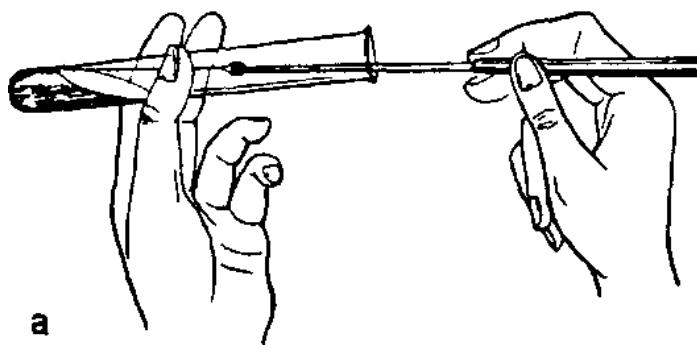


Рис. 7 Посев на скошенную поверхность питательной среды

Посев на плотные питательные среды петлей осуществляют передвигая петлю зигзагом или штрихом (рис.8,9).

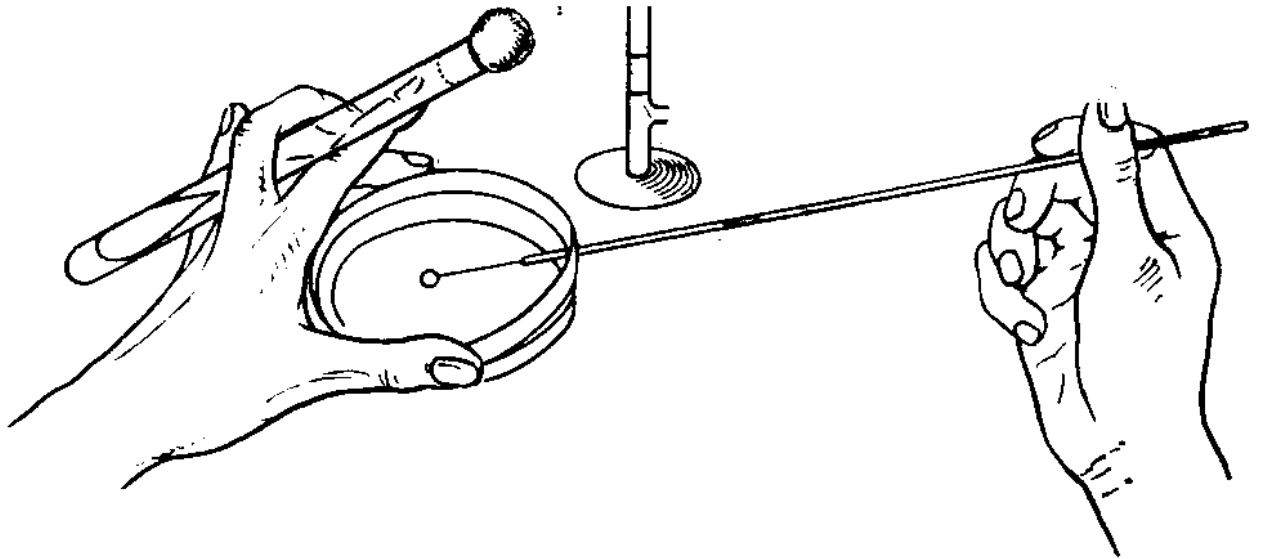


Рис.8 Посев на плотную питательную среду в чашки Петри



Рис. 9 Посев зигзагом и штрихом

Шпатель в микробиологии удобно использовать в том случае, когда нужно засеять питательную среду, разлитую в чашки Петри. При этом материал растирают шпателем по всей площади чашки (рис.10).

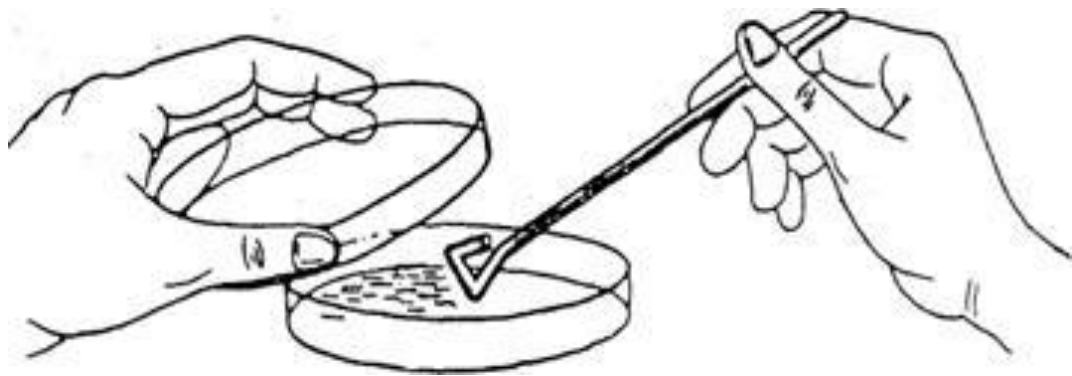


Рис. 10 Посев шпательем

Посев иглой осуществляют в такой же последовательности, как и посев петлей, с той лишь разницей, что в толщу плотной среды делают укол (рис.11).

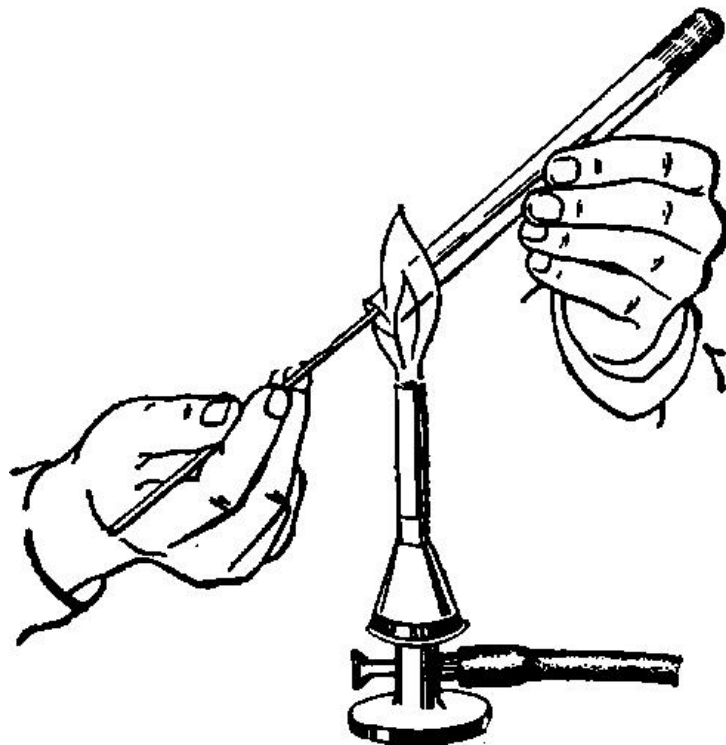


Рис.11 Посев уколом

Если посев делают в жидкую среду, то пробирки держат почти вертикально, чтобы не замочить пробки. Петлю с клетками микроорганизмов погружают непосредственно в среду, затем извлекают инструмент и равномерно распределяют микроорганизмы, вращая пробирку между ладоней.

Все описанные выше манипуляции проводят около пламени горелки (но не в пламени!) по возможности быстро, чтобы не загрязнить культуру посторонними микроорганизмами. Не следует делать резких движений, ходить около проводящего посев

микроорганизмов, так как движение воздуха увеличивает вероятность случайного загрязнения культуры.

Засеянные питательные среды (пробирки, чашки Петри, колбы и т.д.) ставят в термостат для культивирования. Через 16...18, 24...48 ч учитывают результат, определяют признаки роста микроорганизмов и изучают культуральные свойства бактерий.

3 Признаки роста микроорганизмов на питательных средах

Признаки роста бактерий зависят, прежде всего, от вида микроорганизмов, типа питательной среды, метода посева и других факторов (рис.12).

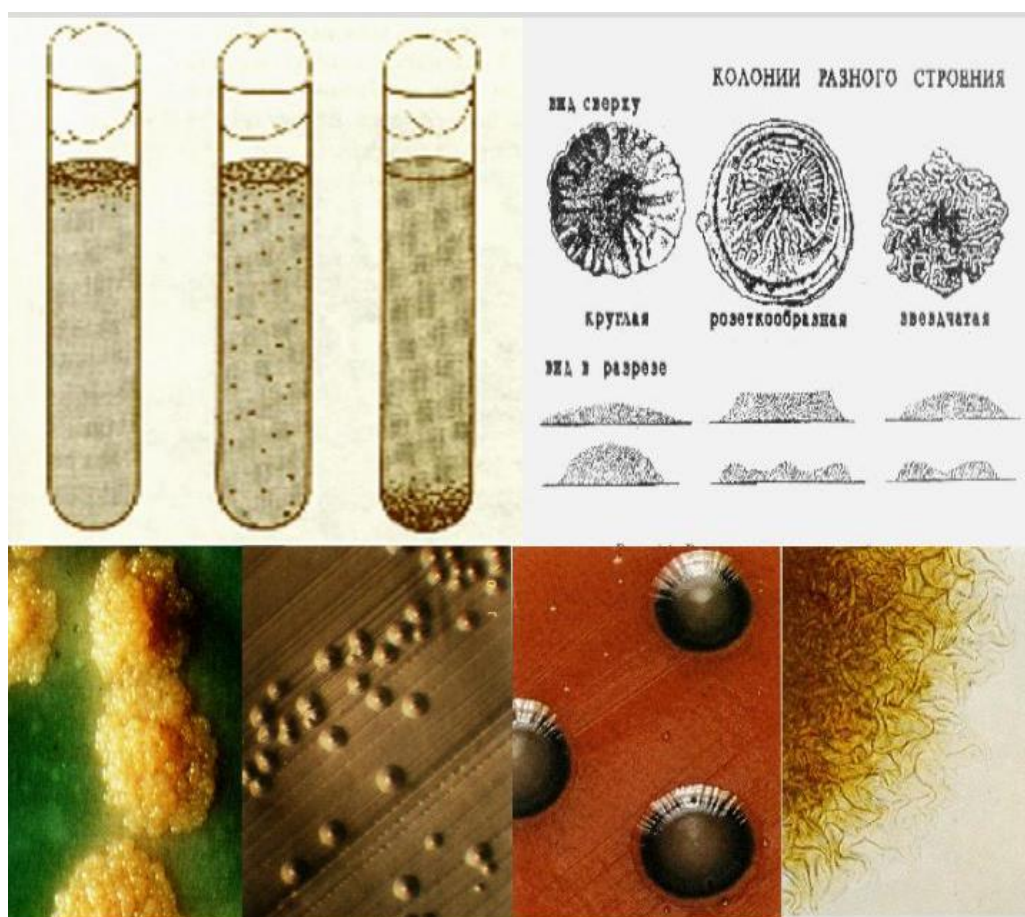


Рис.12 Признаки роста микроорганизмов на различных питательных средах

В *жидкой среде* рост микроорганизмов проявляется либо в виде равномерного помутнения за счет увеличения числа бактериальных клеток (диффузный рост), либо осадка (в этом случае среда остается прозрачной). Осадок может быть рыхлый, легко разбивающийся при встряхивании пробирки, или слизистый, поднимающийся в виде «косички», «смерчика», а также в виде сплошной массы на дне пробирки или мелких крупинок, располагающихся на стекле пробирки. Некоторые виды микроорганизмов из-за

повышенной потребности в кислороде воздуха растут на поверхности жидкой среды, образуя пленку (пристеночное кольцо) и не вызывая помутнения бульона. Пленка может быть сухой или слизистой, гладкой или складчатой. В ряде случаев бактериальные культуры дают одновременно помутнение среды, обильный осадок и пристеночное кольцо на поверхности (рис.13).

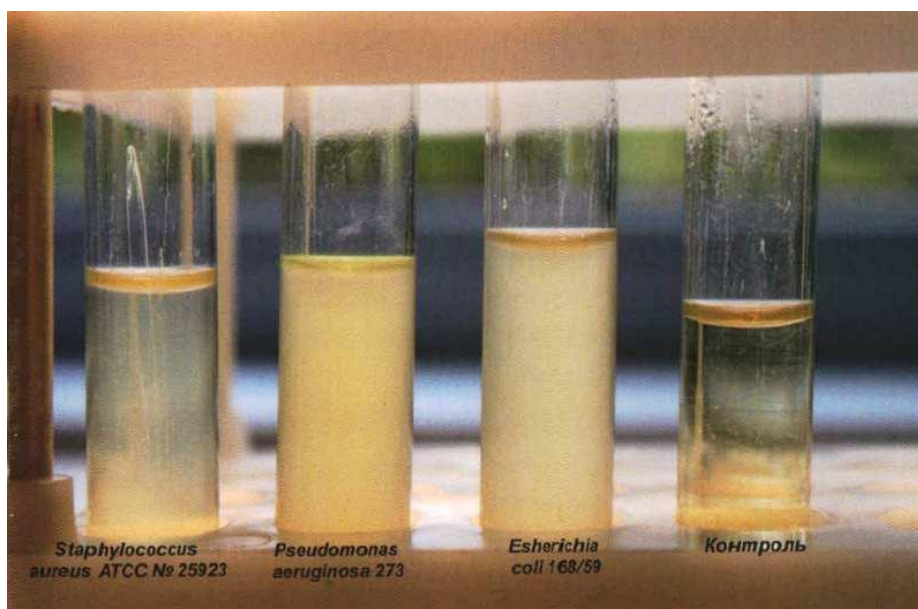
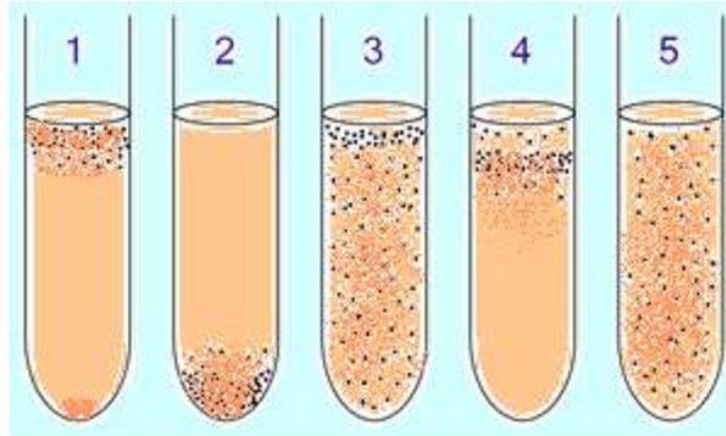


Рис.13 Признаки роста микроорганизмов на жидкой питательной среде

При этом можно определить отношение культивируемых микроорганизмов к кислороду воздуха (рис 14).

ОТНОШЕНИЕ БАКТЕРИЙ К КИСЛОРОДУ



1. **Облигатные аэробные** бактерии в *основном* собираются в верхней части пробирки.
2. **Облигатные анаэробные** бактерии собираются в нижней части.
3. **Факультативные** бактерии собираются в основном в верхнем слое и на всем протяжении среды, так как от O_2 не зависят.
4. **Микроаэрофилы** собираются в верхней части пробирки, но их оптимум — малая концентрация кислорода.
5. **Аэротолерантные анаэробы** не реагируют на концентрации O_2 и равномерно распределяются по пробирке.

Рис.14 Отношение бактерий к кислороду воздуха.

Обычно для того чтобы охарактеризовать рост в жидкой среде, используют МПБ. Если изучаемый микроорганизм не растет в МПБ, то подбирают такую жидкую среду, которая подходит для него. Рост в МПБ и в жидких средах описывают, используя 2...3-суточные культуры, выращенные в стационарных условиях.

Рост на плотной среде.

На плотной среде культуральные свойства определяют по характеру поверхностного налета или развивающихся колоний. При внесении на поверхность среды большого числа бактериальных клеток наблюдают сплошной рост микробной массы. При высеве небольшого числа клеток на среду с большой поверхностью, из каждой бактериальной клетки в результате ее деления (размножения) формируется колония (рис.15). Колония — это видимое невооруженным глазом скопление микробных клеток (обычно потомков одной клетки), выросшее на плотной питательной среде в лабораторных условиях.

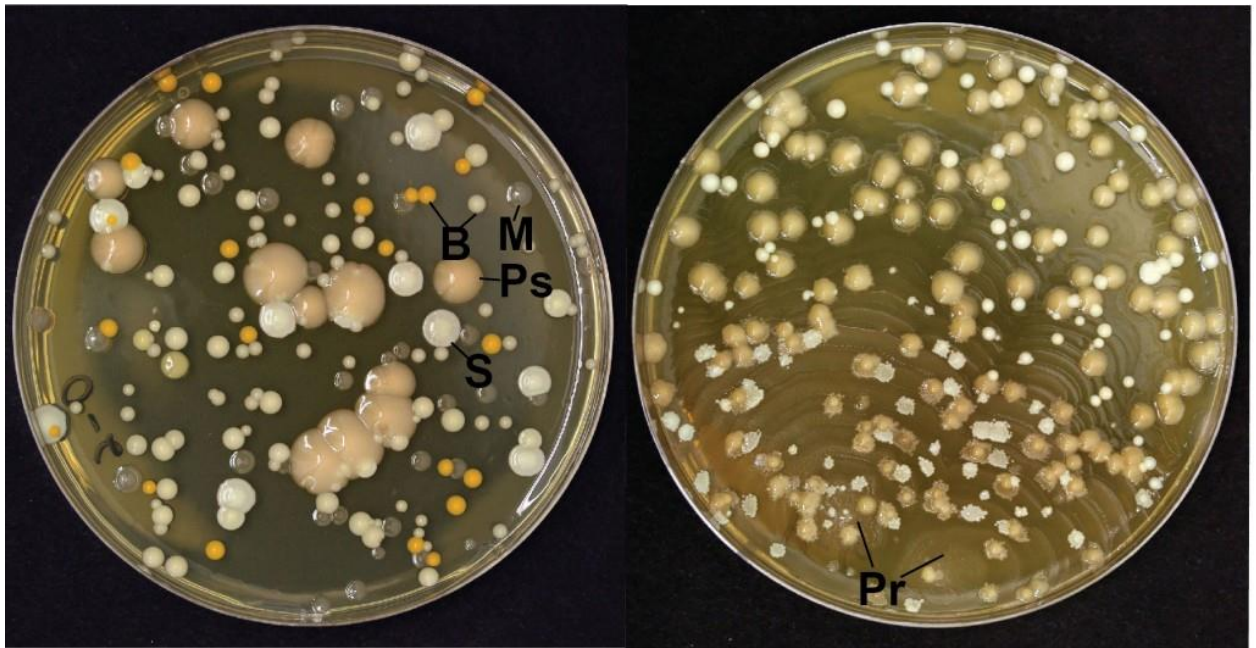


Рис.15 Колонии микроорганизмов.

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

При описании учитывают следующие признаки колоний: форму - округлая, амебовидная, ризоидная, неправильная и др. (рис.16); размеры - диаметр (мм); оптические свойства - прозрачная, полупрозрачная (просвечивает), непрозрачная, блестящая, матовая, флуоресцирующая; цвет - самой колонии и среды; поверхность - гладкая, шероховатая, складчатая, бугристая; профиль - плоский, выпуклый, кратерообразный, врастающий в агар и др.; характер края - ровный, волнистый, лопастной, ризоидный и др.; структуру - однородная, мелко- или крупнозернистая, струйчатая; консистенцию - маслянистая, тестообразная, вязкая, пленчатая; способность к эмульгированию - равномерная или зернистая суспензия в воде, слабо или совсем не суспензируется. Край и структуру колонии определяют при малом увеличении микроскопа. Консистенцию колонии устанавливают при прикосновении к ее поверхности бактериологической петлей. Необходимо учитывать, что наряду с поверхностными образуются, также глубинные и донные колонии (их формируют анаэробы).

Форма колоний микроорганизмов

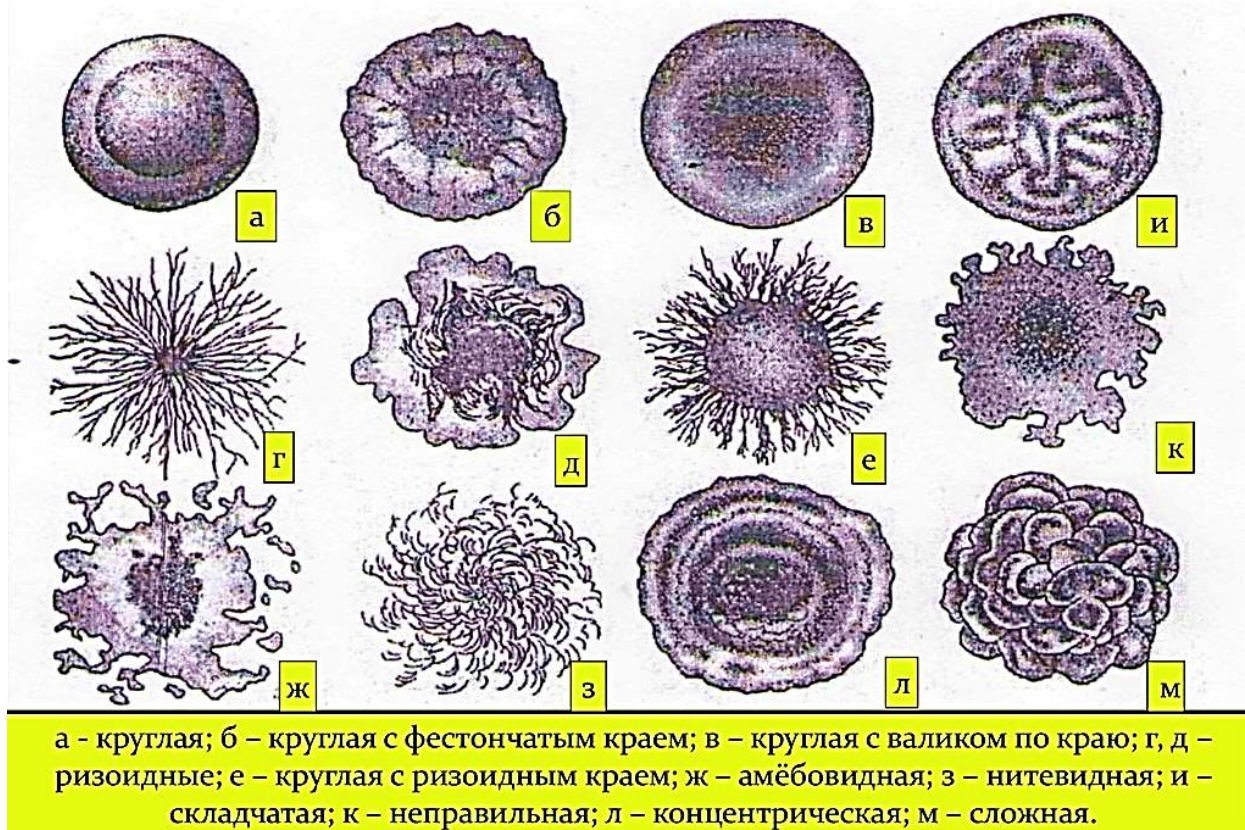


Рис.16 Форма колоний микроорганизмов.

Если микроорганизмы в процессе своего развития выделяют газы, то образование глубинных колоний сопровождается разрывом плотной среды (рси.17).

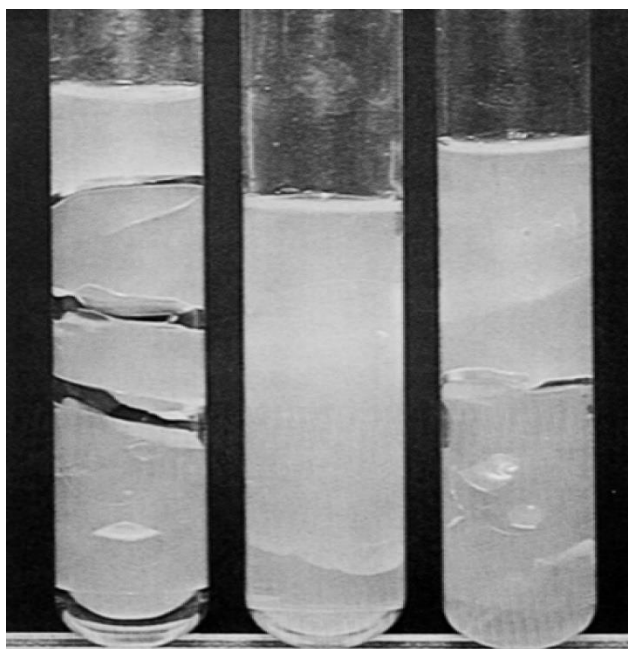


Рис.17 Разрыв столбика питательной среды.

Еще менее характерны донные колонии, образующиеся при соприкосновении агаризованной среды с дном чашки Петри. Эти колонии обычно имеют вид довольно крупных бесцветных прозрачных налетов.

Колонии многих видов бактерий, актиномицетов, плесневых грибов, дрожжей при росте на различных питательных субстратах могут принимать различную окраску, обусловленную выделением красящих веществ — пигментов. Если пигменты растворимы, окрашивается вся среда, а если не растворимые, тогда окрашивается микробная масса колоний. Для различных видов микроорганизмов характерно образование пигмента определенного цвета — сине-зеленого, золотистого, белого, кремового, лимонно-желтого, пурпурно-красного и др. (рис.18) Пигментообразование ярче выражено на плотных средах (МПА, Сабуро, молочный агар и др.). Для данного процесса имеет значение температурный уровень; оптимум для многих видов составляет 25...30°C. Определенное влияние оказывают кислород воздуха и рассеянный свет.



Рис. 18 Колонии пигментообразующих микроорганизмов

Описание колонии часто дополняют характером роста микроорганизмов по штриху на поверхности скошенной плотной питательной среды. При этом определяют его интенсивность - скудный, умеренный, обильный. Кроме того, отмечают и его особенности - налет сплошной с ровным или волнистым краем, четко видный в виде цепочки

изолированных колоний, диффузный, перистый, древовидный или ризоидный и др.(рис.19).



Рис.19 Рост микроорганизмов на скошенной поверхности плотной питательной среды.

В лабораторных условиях можно определить и характер роста микроорганизмов на *полужидких питательных средах*. Так как чаще всего посев на указанные среды проводят методом укола, то большинство бактерий растут по уколу в виде стержня. Однако, подвижные виды могут распространяться («разбегаться») от линии укола, образуя «ветви перевернутого дерева» (рис.20). Кроме того, анаэробы могут образовывать глубинные колонии.



Рис. 20 Рост микроорганизмов «по уколу».

Таким образом, при изучении культуральных свойств микроорганизмов можно сделать предположение об их таксономической принадлежности, биохимической активности и выделить чистую культуру бактерий, что является важным этапом лабораторной работы.

4 Контрольные вопросы

1. Дайте определение посева.
2. Для чего в микробиологической лаборатории проводится посев микроорганизмов на питательные среды?
3. Перечислите основные правила посева микроорганизмов.
4. Опишите технику посева микроорганизмов на жидкие питательные среды.

5. Опишите технику посева микроорганизмов на полужидкие питательные среды.
6. Опишите технику посева микроорганизмов на плотные питательные среды.
7. Укажите признаки роста микроорганизмов на жидких питательных средах.
8. Укажите признаки роста микроорганизмов на полужидких питательных средах.
9. Укажите признаки роста микроорганизмов на плотных питательных средах.
10. Дайте определение колонии.
11. Какие основные характеристики колоний учитывают в лабораторной работе?
12. В каких единицах измеряется размер колонии?
13. Как определяют консистенцию колонии?
14. Как можно объяснить появление ярко окрашенных колоний?
15. Укажите особенность колоний, образованных анаэробными микроорганизмами.

5 Список литературы

1. Колычев, Николай Матвеевич. Ветеринарная микробиология и микология [Электронный ресурс] : учебное пособие / Н. М. Колычев, Р. Г. Госманов. - 3-е изд., стер. - Электрон. дан. - Санкт-Петербург : Лань, 2019. - 624 с. - (Учебники для вузов) (Специальная литература). - Внешняя ссылка: <https://e.lanbook.com/book/125742>
2. Госманов, Р. Г. Практикум по ветеринарной микробиологии и микологии: учебное пособие / Р. Г. Госманов, Н. М. Колычев, А. А. Барсков. — Санкт-Петербург: Лань, 2022. — 384 с. — Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/211544>
3. Кисленко, Виктор Никифорович. Микробиология : учебник : для студ. вузов по направл. 36.03.01 "Вет.-сан. экспертиза" / В. Н. Кисленко, М. Ш. Азаев. - М. : ИНФРА-М, 2015. - 270, [2] с. + Доп. материалы [Электронный ресурс ; Режим доступа <http://www.znaniium.com>]. - (Высшее образование - Бакалавриат) (Бакалавриат). - Библиогр. в конце разд.
4. Кисленко, Виктор Никифорович. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии [Электронный ресурс] : учебное пособие / В. Н. Кисленко. - Электрон.дан. - М. : Инфра-М, 2017. - 232 с. - Внешняя ссылка: <http://znaniium.com/go.php?id=883955>
5. Краткий словарь микробиологических, вирусологических, иммунологических и эпизоотологических терминов [Электронный ресурс] / Р. Г. Госманов [и др.]. - Электрон. дан. - СПб.[и др.] : Лань, 2017. - 304 с. - (Учебники для вузов) (Специальная литература). - Внешняя ссылка: <https://e.lanbook.com/book/89929>

Содержание

ВВЕДЕНИЕ

1. Материальное обеспечение
2. Техника посева микроорганизмов
3. Признаки роста микроорганизмов на питательных средах
4. Контрольные вопросы
5. Список литературы