

Лабораторна робота № 11

Тема: Методи кількісного обліку мікроорганізмів

Мета роботи. Освоїти метод кількісного обліку мікроорганізмів висівом на щільні поживні середовища (метод Коха); ознайомитись зі стандартами мутності та їх застосування для підрахунку клітин.

Матеріали та обладнання. Бактеріологічні петлі, спиртівка, стерильна дистильована вода, чисті культури бактерій, стерильні піпетки на 1 - 2 мл, МПА в чашках Петрі, термостат з температурою 37 °С, стандарти мутності.

Теоретичні відомості

На відміну від підрахунку мікроорганізмів під мікроскопом цей метод дає можливість визначити тільки число життєздатних клітин в популяції. Оскільки середовищ, придатних для росту всіх мікроорганізмів, не існує, метод висіву дає можливість визначити лише число мікроорганізмів, здатних рости на середовищі певного складу. При цьому не враховуються мікроорганізми, які не ростуть на середовищах (так звані життєздатні, але не культивуємі форми) або ростуть дуже повільно. В основі методу визначення кількості клітин висівом на щільні поживні середовища лежить принцип Коха, згідно з яким кожна колонія є потомством однієї клітини. Це дозволяє на підставі числа колоній, які вирости після посіву на щільне ЖС (живильне середовище) певного обсягу досліджуваної суспензії, судити про вихідний вміст в ній клітин мікроорганізмів. Результати кількісного обліку мікроорганізмів, проведеного методом Коха, часто виражають не в числі клітин, а в умовних одиницях - так званих колонієутворюючих одиницях (КУО).

Визначення числа мікроорганізмів цим методом включає три етапи: приготування розведень, посів на щільне середовище в чашки Петрі і підрахунок вирослих колоній. Посів. Висівати суспензію можна поверхневим або глибинним способом. Перед посівом поверхневим способом розливають розплавлене, найчастіше агаризоване живильне середовище в ряд стерильних чашок Петрі по 15 - 20 мл в кожену. Чашки залишають на горизонтальній поверхні, поки середовище не застигне. Поверхню агаризованих середовищ перед посівом рекомендується підсушувати для видалення конденсаційної води. Після того як середовище застигне, на його поверхню стерильною піпеткою наносять точно виміряний об'єм (0,05 або 0,1 мл) відповідного розведення і рівномірно розподіляють по поверхні. При глибинному посіві точно виміряний об'єм (як правило, 0,1 та 0,5 або 1,0 мл) вихідної суспензії або розведення вносять в розплавлене і охолоджене до 48 - 50°C агаризоване середовище, ретельно перемішують і потім негайно виливають в чашку Петрі. Середовищу дають застигнути.

Підрахунок вирослих колоній. Колонії мікроорганізмів в залежності від швидкості росту підраховують через 2 - 15 діб інкубації. Підрахунок, як правило, проводять, не відкриваючи чашок Петрі. Для зручності кожен прораховану колонію позначають точкою на зовнішній стороні дна чашки. При великій кількості колоній дно чашки Петрі ділять на сектори, прораховують колонії в кожному секторі і підсумовують результати. Результати враховують на тих чашках Петрі, на яких виростає від 30 - 50 до 100 - 150 колоній. Якщо число вирослих колоній виявилось менше 10, то ці результати для розрахунку кількості клітин у вихідному матеріалі не використовують.

Кількість клітин в 1 мл досліджуваного субстрату обчислюють за формулою:

$$M = a \times 10^n / V$$

де M- кількість клітин в 1 мл;

a – середнє число колоній на чашці Петрі;

V- об'єм суспензії, взятий для посіву, мл;
 10^n – коефіцієнт розведення.

ІНСТРУКЦІЯ

Завдання 1. Засвоїти метод кількісного обліку мікроорганізмів висівом на щільні поживні середовища

1. Приготуйте послідовні 10-кратні розведення вихідної суспензії бактерій: 10-1, 10-2, 10-3, 10-4, 10-5 (до 4,5 мл дистильованої води додайте 0,5 мл)
2. Отримані розведення суспензії мікроорганізмів ретельно перемішати (струсити) і висійте на поверхню агару до чашки Петрі (0,1 або 0,2 мл). Посів проводити, починаючи з найбільшого розведення (10-5).
3. Рівномірно розподіліть на поверхні агару висіяні суспензії, повільно обертаючи чашки Петрі, і залиште їх при кімнатній температурі на 30 хв. для адсорбції мікробів на поверхні агару.
4. Засіяні чашки Петрі розмістіть до термостату з температурою 37°C та інкубуйте 24 - 48 год. (в залежності від виду мікроорганізмів). Після цього зробіть облік вирослих колоній. Враховувати необхідно ті чашки, на яких число колоній знаходиться в діапазоні від 10 до 150 і загальне число підрахованих колоній при посіві з даного розведення повинно бути не менше 300. При дотриманні цих умов облік результатів буде правильним.
5. Результати роботи оформіть у вигляді таблиці.

Завдання 2. Ознайомитись з методом підрахунку клітин за стандартами мутності

У ряді випадків кількість клітин у суспензії буває достатньо визначити візуально шляхом порівняння зі стандартом мутності. Стандарти мутності являють собою суспензію частинок скла пірекс в дистильованій воді. За одиницю стандарту мутності умовно прийнята мутність суспензії (в фізрозчині) бактерій з концентрацією клітин 100 млн/мл.

Стандарт мутності включає 4 еталона на 11, 10, 9 та 5 одиниць, що відповідає змісту $1,1 \times 10^9$; 1×10^9 ; $0,9 \times 10^9$ і $0,5 \times 10^9$ клітин в 1 мл суспензії.

Для визначення кількості клітин пробірку з досліджуваною суспензією ставлять поруч з еталоном 10 і розглядають їх у відбитому та прохідному світлі на тлі білого аркуша паперу, в центрі якого нанесено декілька чорних ліній. Еталони 9 і 11 допоміжні, що дозволяють більш чітко порівняти мутність досліджуваної суспензії бактерій з еталоном.

Стандартизація мутності суспензії бактерій (особливо часто у випадку тест-організмів) має істотне значення при приготуванні посівного матеріалу в серійних дослідах, наприклад при визначенні антибіотичної активності препаратів методом дифузії в агар.

Контрольні питання:

1. Які методи кількісного обліку мікроорганізмів ви знаєте?
2. Назвіть основні методи визначення кількості мікроорганізмів
3. Який метод рекомендується використовувати для підрахунку клітин дріжджів? Опишіть його.
4. Охарактеризуйте метод граничних розведень стосовно до кількісного обліку біфідо- і молочнокислих бактерій