

## **Занятие 11**

**Бактериологический метод. Получение чистых культур аэробных и анаэробных бактерий.**

**(II, III день ).**

**Культуральные свойства микроорганизмов.**

**Идентификация микробов по ферментативной активности**

**Современные методы идентификации**

**dos. A.Bayramov  
prof. A.Qurbanov**

## Обсуждаемые вопросы:

- 1. Понятия «культивирование микроорганизмов», «культура», «клон», «колония», «штамм».
- 2.Продукты жизнедеятельности микроорганизмов: ферменты и пигменты, ароматические вещества и их значение.
- 3.Культуральные свойства бактерий – макроскопическое и микроскопическое изучение колоний (размер, форма, прозрачность, консистенция, расположение, поверхность, края и структура).
- 4.Подсчет количества колоний, значимость определения КОЕ в различных патологических материалах.
- 5.Классификация бактериальных ферментов.
- 6.Биохимические свойства бактерий, роль ферментов в идентификации бактерий.
- 7.Сахаролитические ферменты и их определение (среды Гисса и Клиглера).
- 8.Протеолитические ферменты и их определение (рост на желатине, сыворотке и молоке, определение индола, аммиака и сероводорода), окислительно-восстановительные ферменты (оксидаза, каталаза, декарбоксилаза).
- 9.Ферменты агрессии и их определение (гиалуронидаза, лецитиназа, фибринолизин, плазмокоагулаза).
- 10. Современные методы идентификации (микротест-системы, анализатор Vitek и пр.)

## Цель занятия:

- Ознакомить студентов с целью, этапами получения чистой культуры бактерий, и их культуральными свойствами. Дать студентам информацию о продуктах жизнедеятельности бактерий – ферментах и пигментах, их значении в дифференциации бактерий. Ознакомить студентов с современными методами идентификации бактерий.

# Получение чистой культуры

## этап II

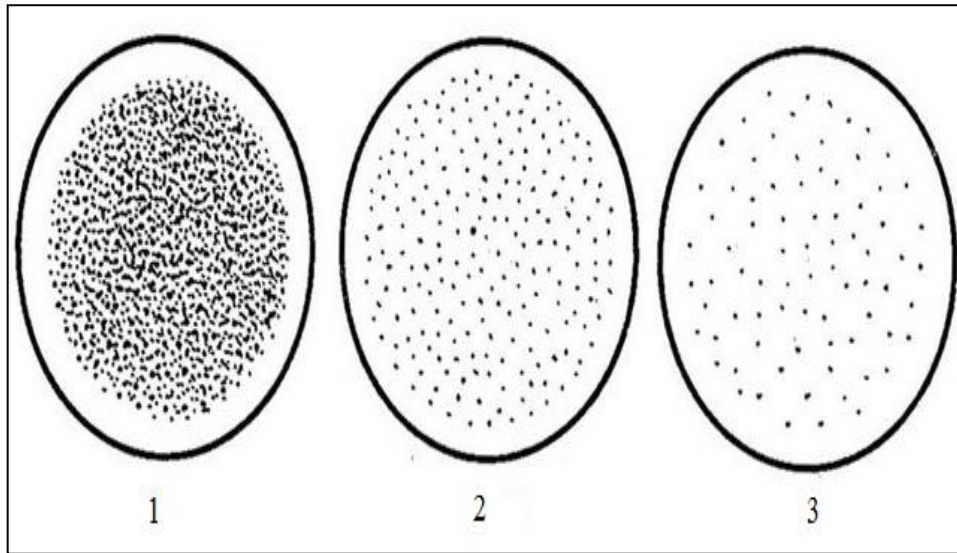
- II этап получения чистой культуры начинается с изучения культуральных свойств выросших на среде бактерий
- На II день чашки Петри достают из термостата и приступают к **изучению культуральных свойств** бактерий.
- Наблюдается последовательное разобшение микроорганизмов на средах в чашках, в которые производили посев по методу Дригальского. Обычно на поверхности среды во второй, или в третьей чашке наблюдается рост микроорганизмов в виде **изолированных колоний**
- При посеве на 4 сектора, после инкубации чашек, наблюдается последовательное уменьшение количества микроорганизмов на питательной среде и обычно в последнем секторе микроорганизмы растут в виде **изолированных колоний**

# Получение чистой культуры

## Этап II

- Считается, что начало одной колонии дает одна единственная бактериальная клетка
- Поэтому, на практике для получения чистой культуры обеспечивается рост микроорганизмов в виде изолированных колоний на поверхности или в глубине плотной питательной среды.
- На данном этапе получения чистой культуры производится пересев изолированных колоний на другие питательные среды, и их последующая инкубация в течение 1-2 дней.

# Получение изолированных колоний на поверхности питательных сред



# Культуральные свойства микроорганизмов

➤ Культура – это популяция, образуемая бактериями в оптимальных условиях. Колония - популяция (скопление) бактерий на плотной питательной среде

➤ Чистая культура - совокупность микроорганизмов, принадлежащих к одному виду и образующих популяцию на плотной питательной среде

➤ Штамм – чистая культура микроорганизмов одного вида, выделенных из разных (или одинаковых) источников в определенное время



# Культуральные свойства микроорганизмов

- Культуральные свойства лежат в основе идентификации микроорганизмов, так как являются характерным признаком для каждого рода и вида.
- С этой целью идентификации изучается характер роста бактерий на плотных и жидких питательных средах



# Культуральные признаки бактерий на плотных питательных средах

- Бактерии образуют *колонии* на плотных питательных средах
- Популяция, образуемая одной бактерией на поверхности или в глубине плотной питательной среды, называется *колонией*



# Морфология колоний

- При изучении морфологии колонии учитываются следующие признаки:
  - Размеры
  - Форма
  - Цвет
  - Структура
  - Высота
  - Края

# Колонии различной формы на поверхности агара

## Формы колоний



Округлые



Неправильной  
формы

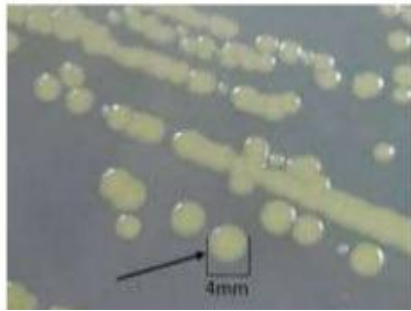


Точечные



Ризоидной формы

# Формы колоний



**Округлые**



**Точечные**



**Ризоидные**

# Края колоний



Плоские



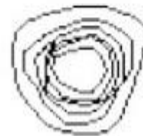
Волнистые



Изрезанные



Нитевидные



Закрученные

# Края колоний



**Волнист  
ые**



**Нитевид  
ные**

# Поверхность колоний на питательной среде



плоская



приподнятая



грибовидная



кратерообразная



куполовидная

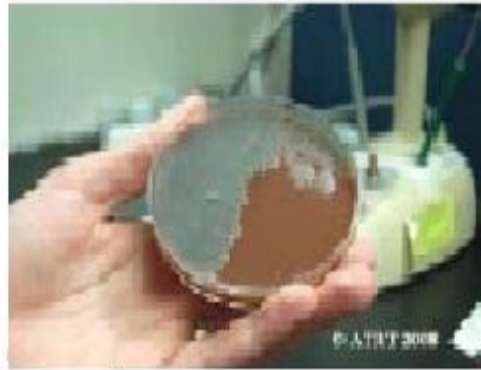
# Размеры колоний

- Крупные ( $< 4-5$ )
- Средние (2-4 мм)
- Мелкие (1-2 мм)
- Точечные ( $>1$  мм)



# Консистенция колоний

- Плотные
- Мягкие
- Вязкие
- Слизистые



Плотные



Вязкие



Слизистые

# Цвет колоний

- В процессе роста на питательных средах некоторые бактерии продуцируют пигменты



**Колонии *Pseudomonas* и *Serratia* продуцирующие пигменты на питательной среде**



# Прозрачность колоний

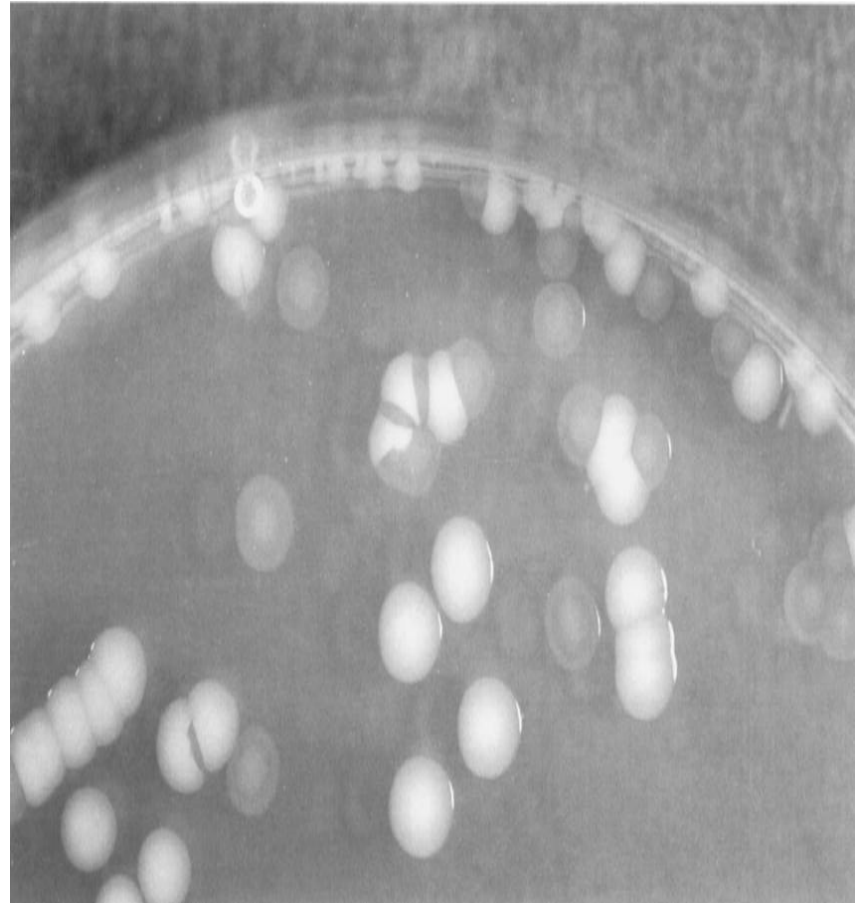
- По степени прозрачности различают

-прозрачные

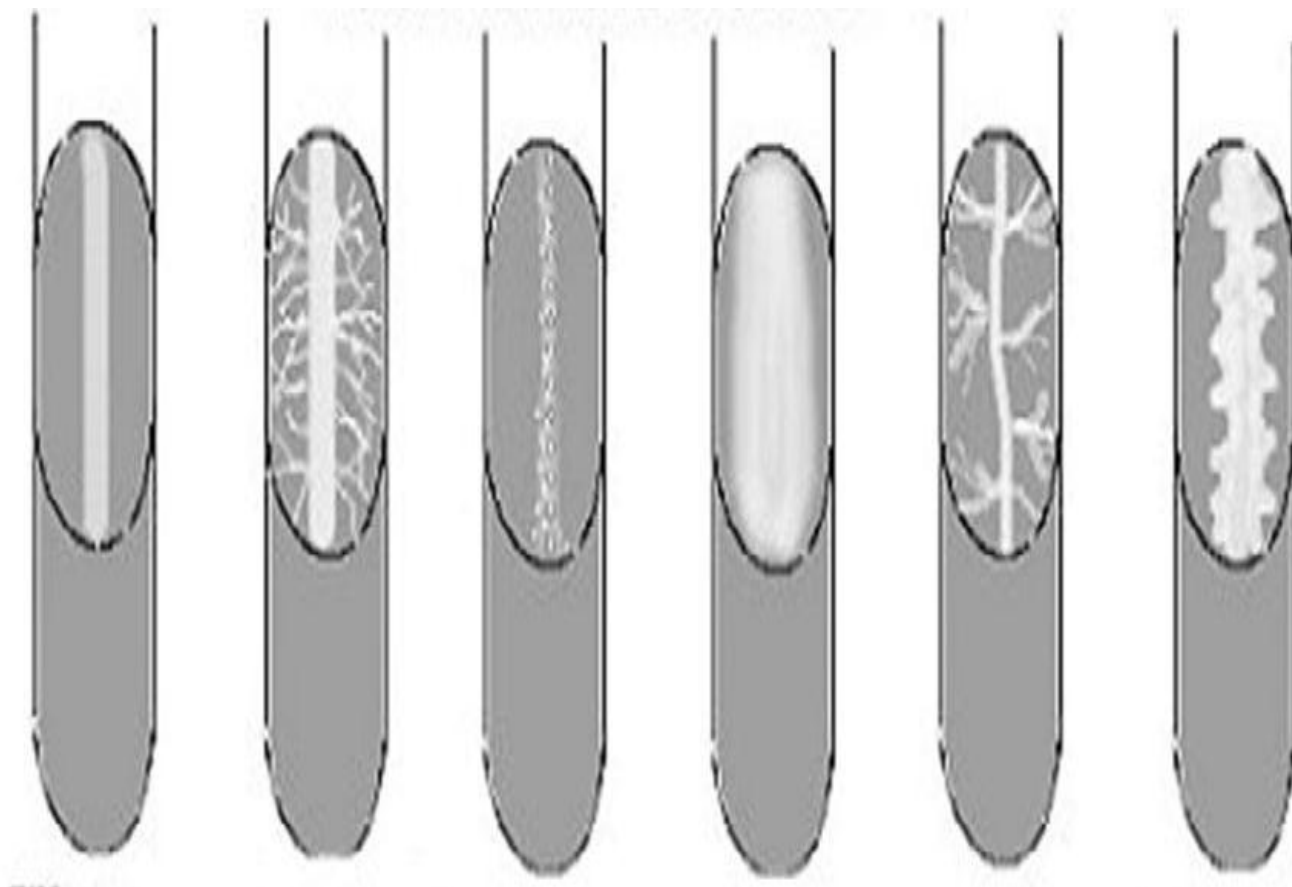
-полупрозрачные

-мутные

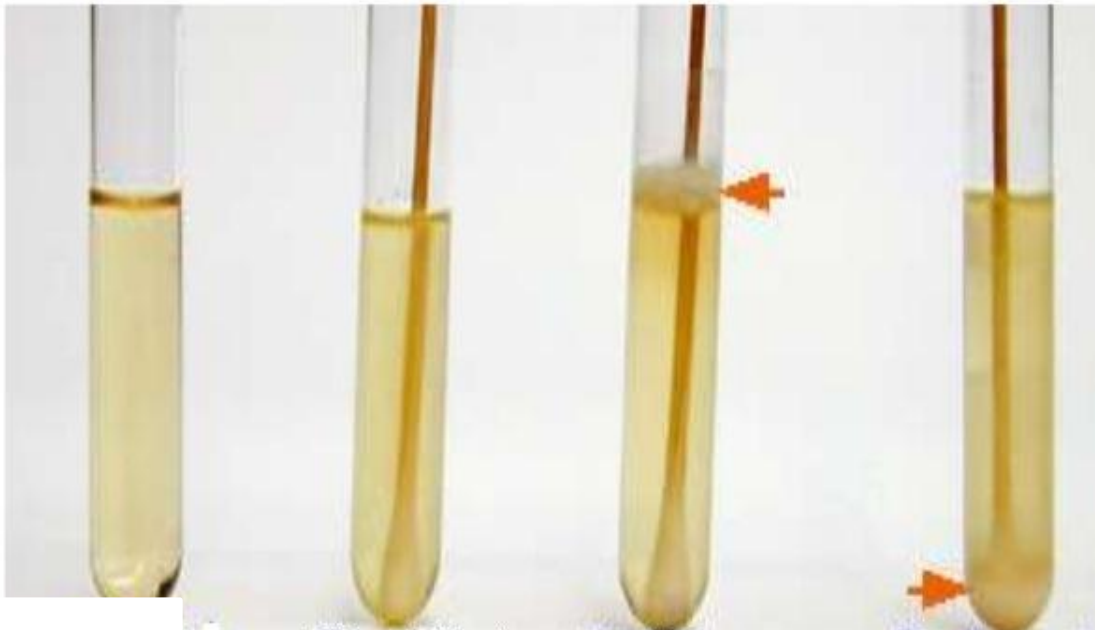
**КОЛОНИИ**



# Рост культуры на скошенном агаре



# Культуральные признаки бактерий на жидких питательных средах



**Контроль**

**Диффуз  
ный рост**

**Поверхностн  
ый рост**

**Осадок**

## Подсчет колоний

В случае малого количества колоний их считают на глаз, если же колоний много, то подсчет производят в камере, которая представляет собой разделенную на квадраты пластину на подставке. Чашка Петри помещается под пластину и производят подсчет колоний, попавших в поле 10 крупных квадратов площадью  $1\text{ см}^2$ . Общее количество колоний в одном квадрате вычисляют по формуле

$$X = \pi r^2 \times 1\text{ см}^2 \quad \pi = 3,14$$

r- радиус чашки = 5 см

Если в одном квадрате будет 10, то:

$$X = 3,14 \times 5^2 \times 10 = 785$$



# Определение общего количества клеток в 1 мл жидкости

1. Подсчет клеток под микроскопом в «счетной камере» (Горяева, Тома—Цейса, Нейбауэра)

2. Счетчики

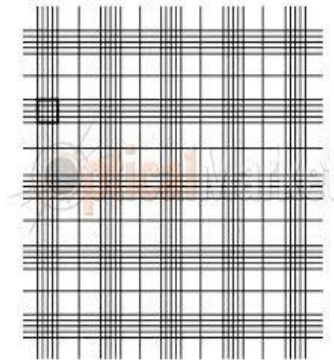
Электронный счетчик

Култера

Нефелометрия

(спектрофотометрия)

3. Подсчет клеток на мембранных фильтрах



*Счетная камера Горяева*





# Определение общего количества клеток



Для определения концентрации микроорганизмов может использоваться непрямой метод определения, основанный на визуальном сравнении мутности исследуемой взвеси со стандартным образцом мутности. Примером такой стандартизации микробной взвеси является использование стандарта Мак-Фарланда (McF).

Он изготовлен из:

1 % раствора серной кислоты

1 % раствора бария хлорида

# Получение чистой культуры

## III этап

- На третьем этапе выделения чистой культуры проверяют чистоту выделенной культуры
- С этой целью, готовят мазок из культуры, выросшей на скошенном агаре, окрашивают по методу Грама и микроскопируют. При наличии в мазке бактерий с одинаковой морфологией подтверждается чистота выделенной культуры. После выделения чистой культуры изучают ее **биохимические (ферментативные) свойства**
- Завершительный этап бактериологического исследования состоит в идентификации выделенной чистой культуры, то есть определении ее таксономического положения
- *Идентификация* микроорганизмов проводится по их культуральным, тинкториальным, морфологическим, ферментативным, антигенным и др. свойствам.

# Этапы культурального метода

**4 этапа:**

**Этап 1** : выбор материала



**Этап 2** : культивация



**Этап 3** : идентификация



**Этап 4** : результат

(Определение рода и вида микроорганизмов, определение антибиотикочувствительности)

# Изучение биохимических (ферментативных) свойств бактерий

- Изучение биохимических (ферментативных) свойств бактерий основывается на изучении их **ферментов и метаболитов**
- Ферментативные свойства являются основным таксономическим признаком, учитываемом при идентификации микроорганизмов
- Для идентификации бактерий определяют **сахаролитические, протеолитические и другие ферменты**

# Микробные ферменты

- Синтез ферментов микроорганизмов детерминируется на генном уровне. В основе всех метаболических реакций в бактериальной клетке лежит деятельность ферментов, которые принадлежат к 6 классам:
  1. **оксидоредуктазы** катализируют реакции окисления-восстановления,
  2. **трансферазы** - катализируют реакции переноса различных групп от донора к акцептору,
  3. **гидролазы** катализируют расщепление крупных молекул пептидов, полисахаридов, липидов до мономеров,
  4. **лигазы** катализируют образование химических связей между молекулами,
  5. **лиазы** катализируют реакции разрыва связей в субстрате не гидролитическим путем,
  6. **изомеразы** катализируют перенос групп внутри молекулы с образованием изомерных форм

Ферменты могут локализоваться как внутри клетки– **эндоферменты**, так и выделяться в окружающую среду – **экзоферменты**.

# Ферменты микробов

- *Эндоферменты* проявляют деятельность в пределах клетки, *экзоферменты* секретируются во внешнюю среду и обеспечивают распад и проникновение макромолекул в клетку
- *Конститутивные и индуцибельные* ферменты
- *Ферменты метаболизма* – оксидоредуктазы, трансферазы, лиазы, лигазы, гидролазы, изомеразы
- *Ферменты агрессии или патогенности* – гиалуронидаза, нейраминидаза, лецитиназа и пр.

# Изучение ферментативной активности микробов

- Основной таксономический признак, который учитывают при идентификации микроорганизмов - это спектр их ферментативной активности
- С целью идентификации бактерий определяют **сахаролитические, протеолитические** и др. ферменты

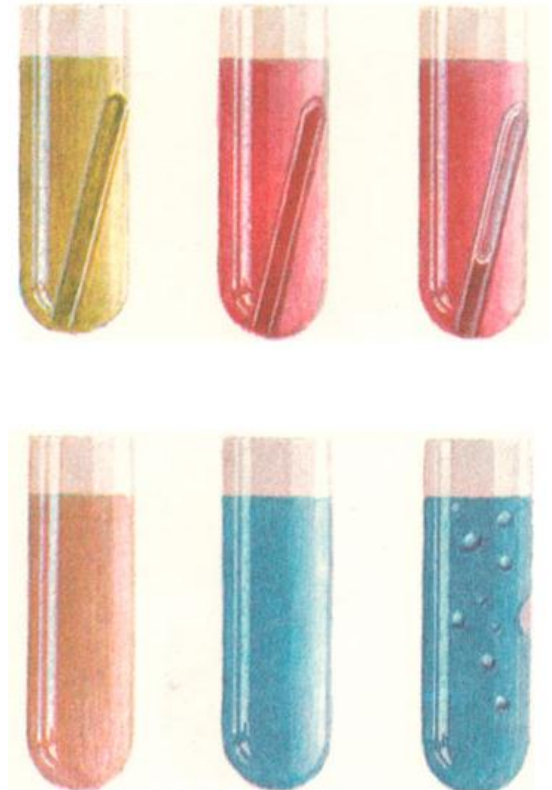
## Изучение способности микроорганизмов ферментировать углеводы (сахаролитических свойств)

- Для этого используют среды Гисса, которые называют «пестрый ряд». Они представлены набором пробирок с питательной средой в жидкой или полужидкой форме, в каждую из которых добавлены определенный углевод (сахар) и индикатор, меняющий окраску в кислой среде.
- При расщеплении какого-то углевода в пробирке наблюдается изменение цвета среды, если же исследуемая культура не расщепляет углевод, то цвет среды в других пробирках останется неизменным. Поэтому набор сред называется «пестрый ряд».



# Среды «цветного» ряда Гисса

- Некоторые бактерии расщепляют углеводы **только до кислоты**, некоторые расщепляют **до кислоты и до газа**, что также учитывается при идентификации.
- Для определения газообразования в пробирки с жидкой средой вкладывают стеклянный поплавок, который всплывает в случае образования газа при расщеплении углеводов.
- В полужидких средах Гисса газообразование определяют по образованию пузырьков



## Среды «цветного» ряда Гисса



## Среды «цветного» ряда Гисса



***E.coli* – расщепляет углеводы с образованием кислоты и газа.**

***S.sonnei* – расщепляет глюкозу до кислоты без образования газа.**

***P.aeruginosa* – не ферментирует углеводы.**

# «Цветной» ряд Гисса

- *Для определения сахаролитической активности* на третий день бактериологического исследования выделенную чистую культуру вносят петлей в пробирки с «пестрым» рядом и инкубируют при 37°С в течение 18-24ч или дольше.
- Расщепление бактериями углеводов протекает до образования кислых продуктов, при этом происходит изменение цвета среды; при расщеплении углеводов до кислоты и газа, параллельно с изменением цвета среды происходит образование пузырьков газа внутри поплавков. При использовании полужидких сред пузырьки газа образуются дне пробирок. При отсутствии ферментации цвет среды не меняется.
- Поскольку для каждого углевода используется отдельная пробирка, цвет в которых меняется в связи с ферментацией углеводов благодаря индикатору, весь ряд пробирок приобретает «пёстрый» вид .

# Среды «цветного» ряда Гисса

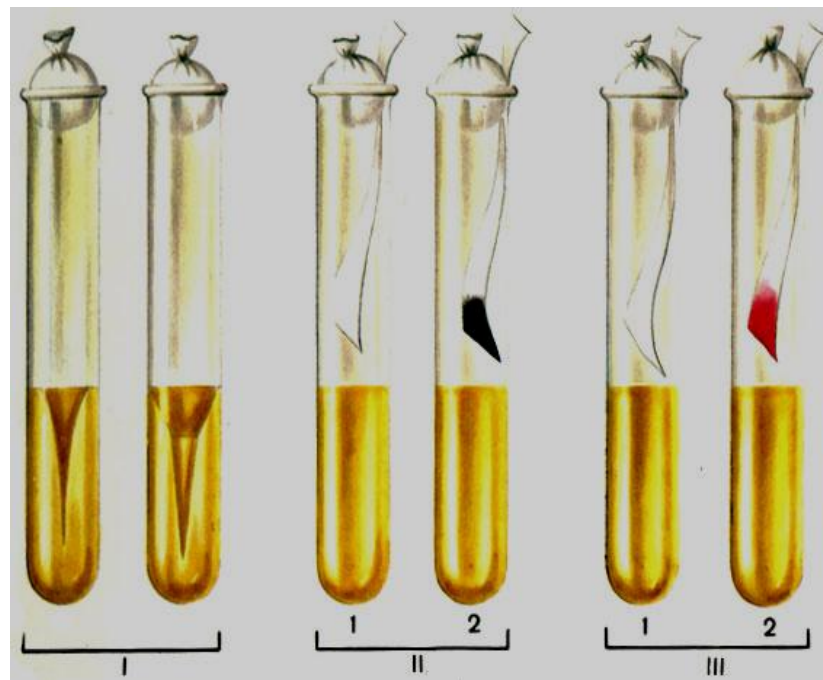
- **Короткий «пестрый» ряд** представлен жидкими средами, содержащими моно- и дисахариды - глюкозу, лактозу, сахарозу, мальтозу и шестиатомный спирт – маннит.
- **Длинный «пестрый» ряд** помимо вышеуказанных углеводов, содержит различные моносахариды (арабинозу, ксилозу, рамнозу, галактозу и др.), полисахариды (инулин, крахмал, гликоген и др.) и спирты ( глицерин, дульцит, инозит и др.)
- Во все среды в качестве индикатора добавляют реактив Андраде

**Изучение способности микроорганизмов  
расщеплять белки (*протеолитической активности*)**

Изучение протеолитической активности выделенной бактериальной культуры основывается на определении способности разжижения желатина, и образования конечных продуктов расщепления белков - аммиака, индола, сероводорода и др.

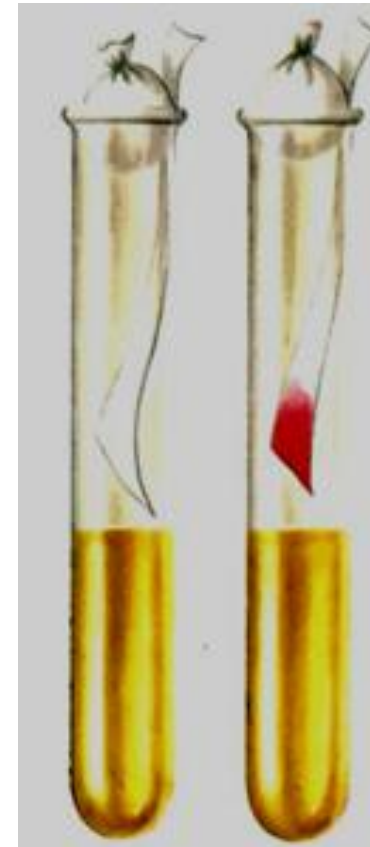
# Определение протеолитических ферментов

- Наличие *протеолитических ферментов* определяют при посеве бактериальной культуры уколом в столбик 10-20% желатина. Инокуляты инкубируют при температуре 20-22<sup>0</sup>С в течение нескольких дней. При положительном результате наблюдают разжижение желатина в виде воронки либо в виде перевернутой елочки.
- В пробирках с пептонной водой можно определить способность к продукции индола, сероводорода и аммиака в течение 2-3дн при 37<sup>0</sup>С



# Определение способности продуцировать индол

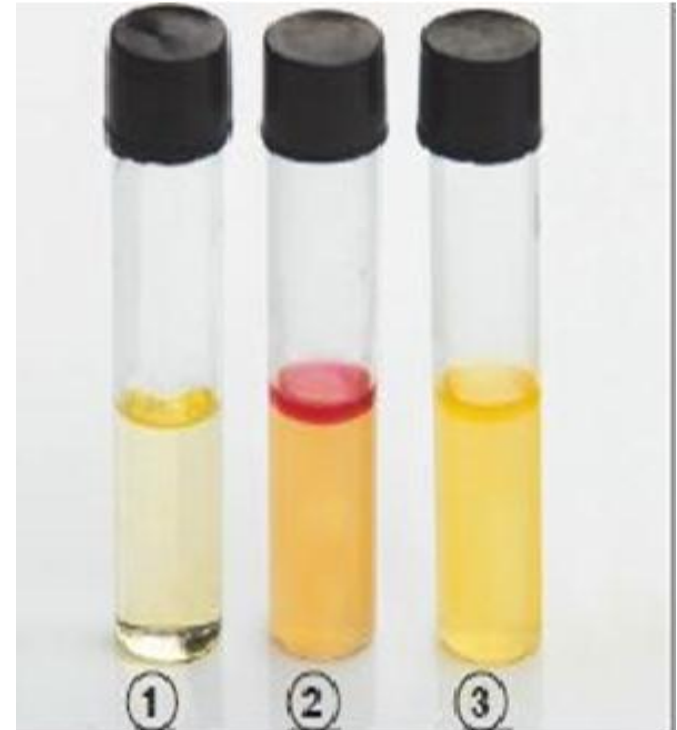
- *Метод Эрлиха:* в пробирке смешивают бактериальную культуру и 2-3 мл эфира, добавляют несколько капель реактива Эрлиха (раствора, приготовленного на основе парадиметиламиндобензальдегида, этилового спирта и концентрированной соляной кислоты). В случае индолообразования смесь окрашивается в розовый цвет.
- *Метод Мореля:* индолообразование определяют с помощью индикаторной бумажки, смоченной в щавелевой кислоте и укрепленной пробкой над пробиркой с питательным бульоном. При положительном результате индикаторная бумага краснеет.





# Определение индолообразования реактивом Ковача

• Бактериальную культуру инкубируют в среде с триптофаном при 37°C. Под влиянием бактериального фермента триптофаназы, триптофан распадается на индол, аммиак и пировиноградную кислоту. Добавление к среде диметиламинобензальдегида (реактива Ковача) вызывает образование кольца красного цвета

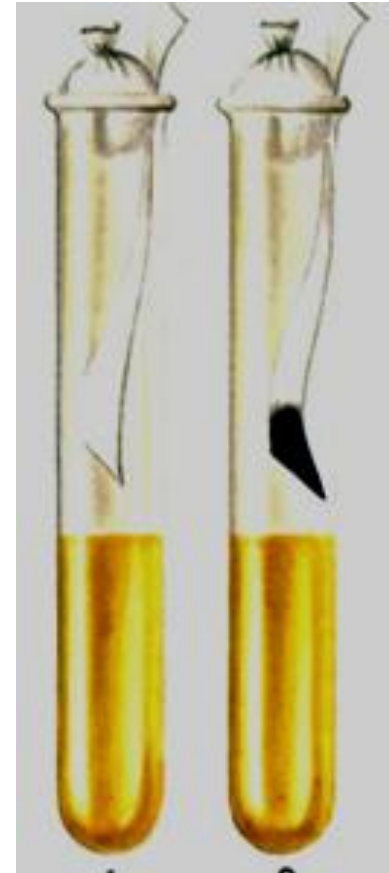


1. *Контроль*
2. *Escherichia coli*(ATCC25922)
3. *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048)

# Определение образования сероводорода

## сероводорода

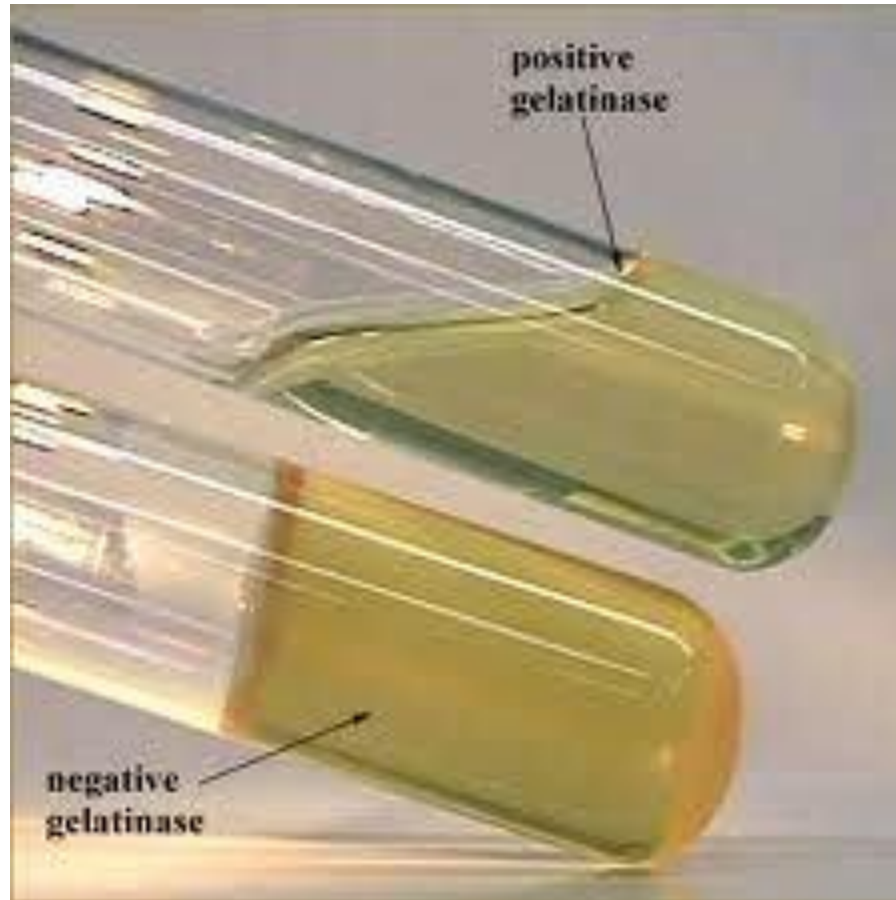
- Полоску индикаторной бумаги, смоченную в ацетате свинца закрепляют в пробирке пробкой.
- Почернение нижней части полоски после инкубации пробирки является показателем образования  $H_2S$  (за счет образования сульфида свинца).
- Бактериальную культуру инокулируют иглой в столбик среды, содержащей сульфат железа, тиосульфат натрия и сульфид натрия. При образовании сероводорода столбик агара чернеет.



# Определение аммиака

- Для определения способности к образованию аммиака, проводят посев в МПБ, и между его поверхностью и пробкой закрепляют полоску лакмусовой бумаги.
- При положительном результате бумажка синееет.

# Тест на желатиназу



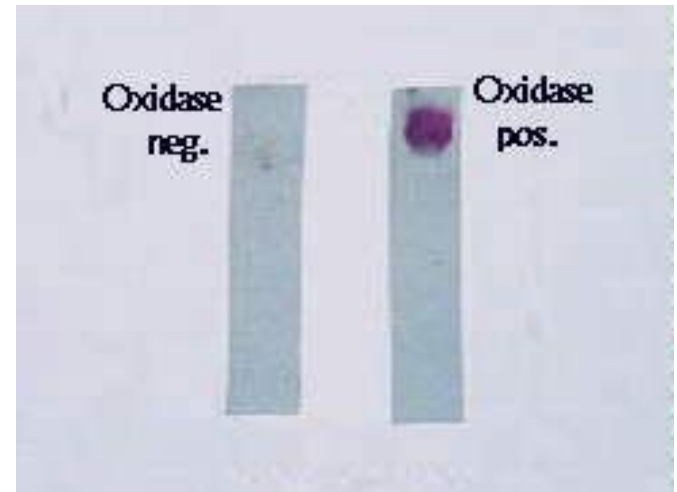
# Определение каталазной активности

- К капле 1-3% перекиси водорода на предметном стекле добавляют исследуемую культуру. Каталаза расщепляет перекись водорода до воды и кислорода.
- Появление пузырьков газа свидетельствует о наличии каталазы.



# Оксидазный тест

- **Принцип теста.** Определенные виды бактерий вырабатывают либо цитохромоксидазу, либо индофенолоксидазу (железосодержащий гемопротейн), которые катализируют перенос электронов на кислород.
- В оксидазном тесте бесцветный краситель *p*-фенилендиамин дигидрохлорид, используемый как искусственный акцептор электронов, при участии оксидазы окисляется и образует окрашенное вещество индофенол синий
- **Постановка теста.** Исследуемую культуру помещают на полоску или диск индикаторной бумаги.
- При положительном результате наблюдается появление синей или лиловой окраски в течение 10-30 сек.



**Test используется для идентификации грамотрицательных бактерий родов *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas*, *Campylobacter*, *Pasteurella*, *Neisseria***

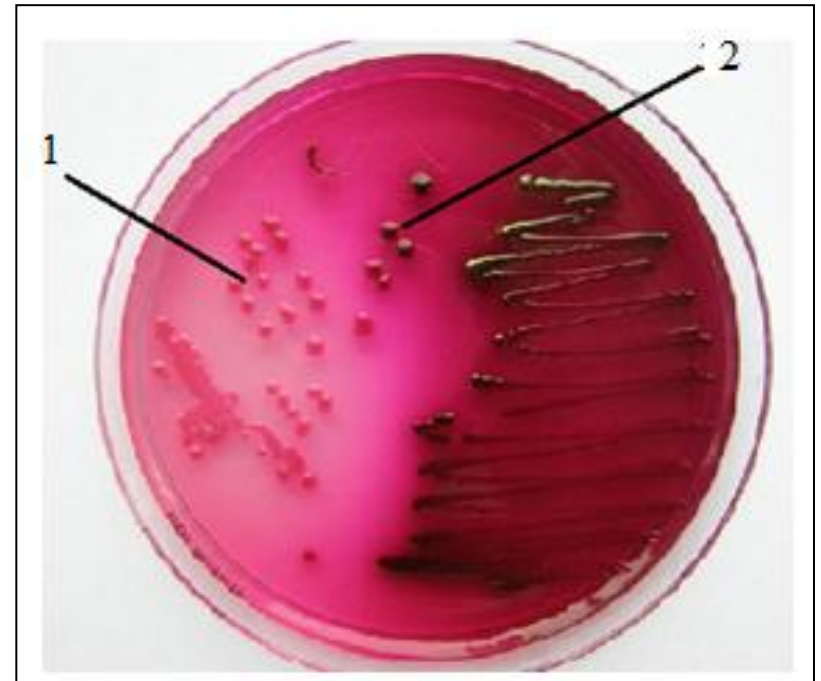
# Применение дифференциально-диагностических сред

- Использование дифференциально-диагностических сред позволяет проводить дифференциацию микроорганизмов, а также иногда их идентификацию.
- Дифференциация микроорганизмов на таких средах основывается прежде всего на их ферментативных свойствах.
- В лабораториях помимо среды Гисса, используются среды *Эндо*, *Мак Конки*, *среда с метиленовым синим и эозином (ЕМВ-агар)* и *пр.*

# Среда Эндо

*Состав 1% лактозы и индикатор (фуксин который обесцвечивается сульфитом натрия)*

- Среда имеет розовый цвет
- Бактерии, **сбраживающие лактозу** в процессе брожения выделяют муравьиную кислоту, которая даёт цветную реакцию с реактивами, в результате чего их колонии окрашиваются в малиново-красный цвет с металлическим блеском.
- Колонии бактерий, **не сбраживающих лактозу**, имеют белый или слабо-розовый цвет (цвет питательной среды).





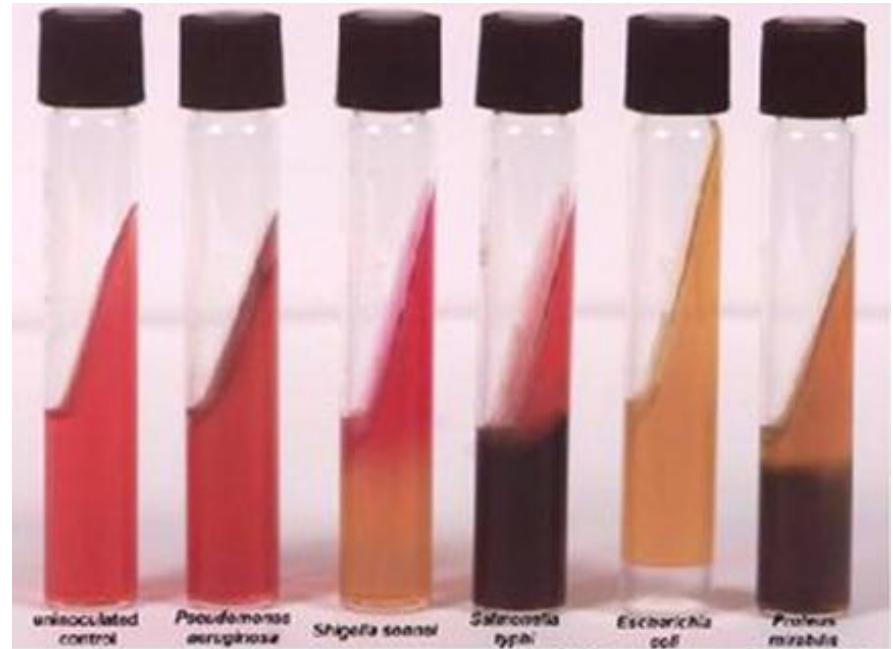
# Среда Клиггера

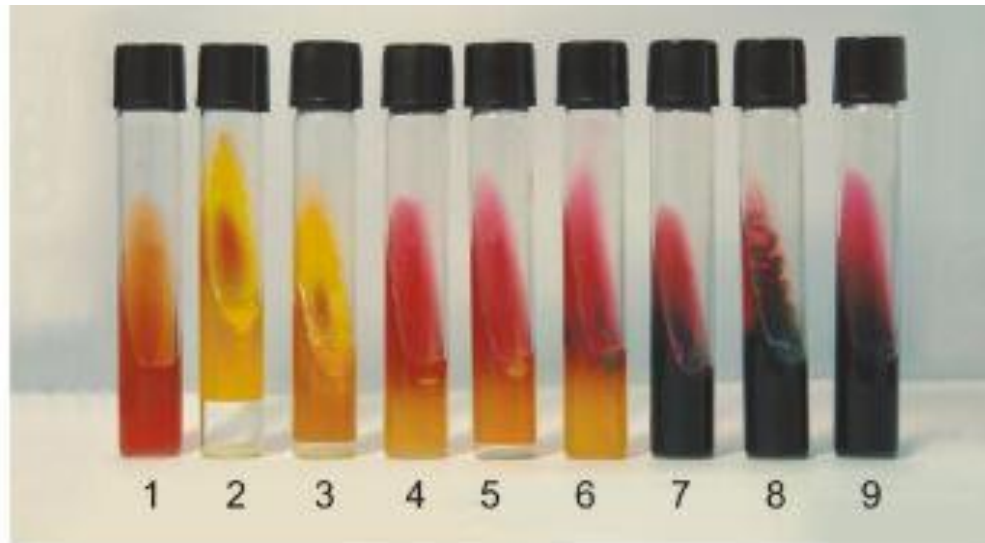
**Состав:** глюкоза - 0,1%, лактоза - 1%, индикатор, сульфат железа, тиосульфат натрия.

**Готовая среда** разлита в пробирках, в виде косо́го агара розового цвета,

**Инокуляцию** проводят петлей на скошенную часть агара, и иглой в столбик

- При ферментации глюкозы столбик среды окрашивается в желтый цвет, цвет скоса не меняется,
- При ферментации глюкозы и лактозы - пожелтение всей среды (*E.coli*),
- При образовании  $H_2S$  наблюдается почернение агара.





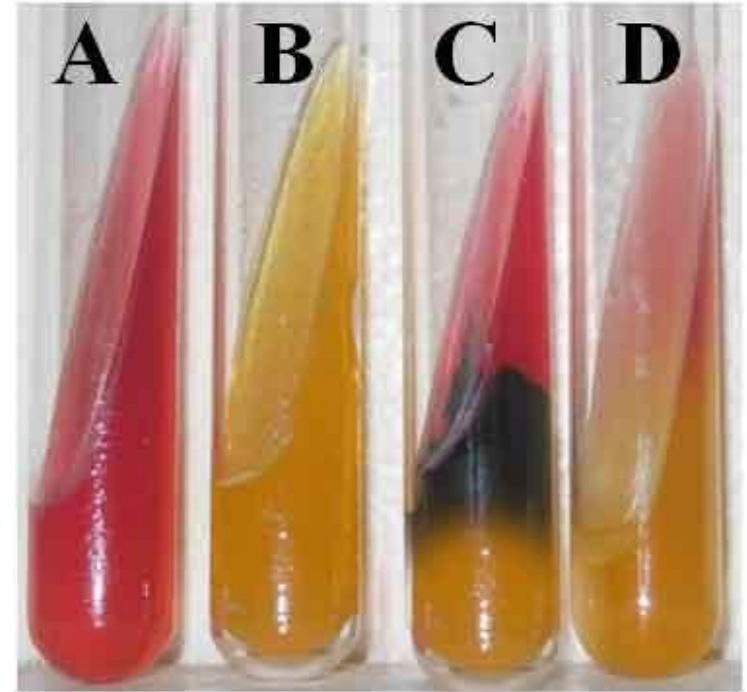
### **Kligler Iron Agar (M078)**

1. Control
2. *Escherichia coli* ATCC 25922
3. *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048
4. *Shigella flexneri* ATCC 12022
5. *Salmonella Paratyphi A* ATCC 9150
6. *Salmonella Typhi* ATCC 6539
7. *Proteus vulgaris* ATCC 6380
8. *Citrobacter freundii* ATCC 8090
9. *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076

# TSI(triple sugar iron) агар

## трехсахарный железосодержащий агар

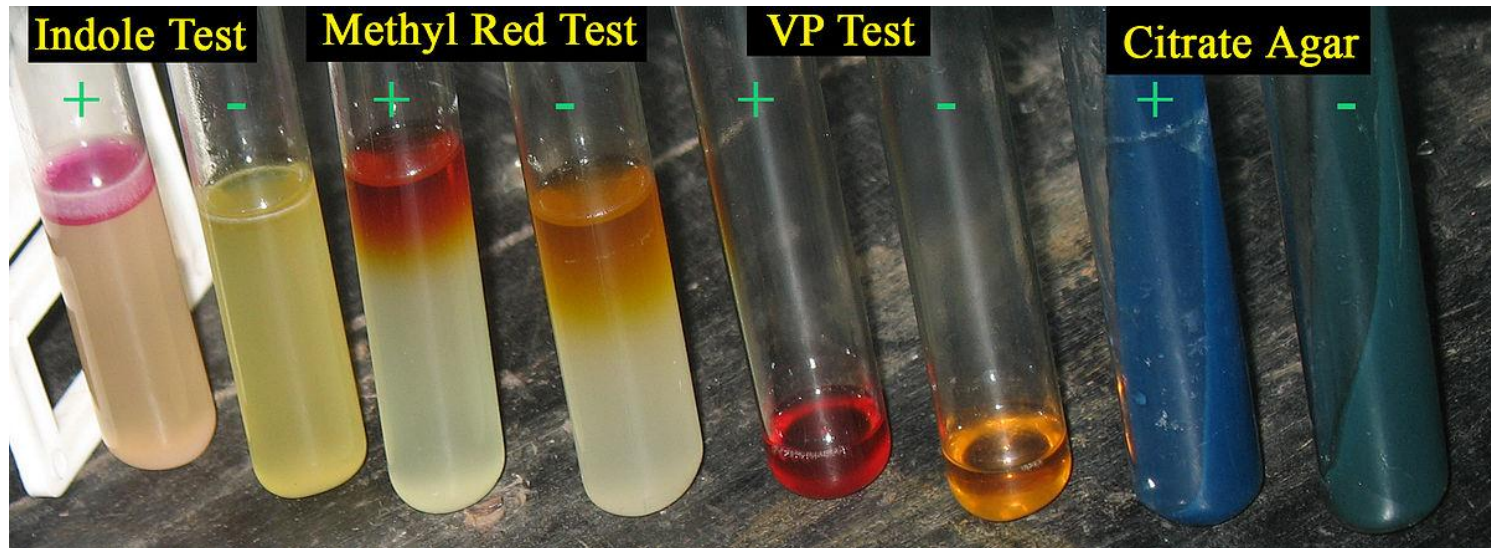
- Состав:
- 1% лактоза
- 1% сахароза
- 0,1% глюкоза (при расщеплении которой столбик агара желтеет)
- Сульфат железа (при выделении сероводорода наблюдается образование нерастворимого черного преципитата, связанного с восстановлением тиосульфата в кислой среде в присутствии соли железа.
- Индикатор феноловый красный



- A) *Psuedomonas aeruginosa*: Gluc (-), Lac/Suc (-), H<sub>2</sub>S (-)
- B) *Escherichia coli*: Gluc (+), Lac/Suc (+), H<sub>2</sub>S (-)
- C) *Salmonella typhimurium*: Gluc (+), Lac/Suc (-), H<sub>2</sub>S (+)
- D) *Shigella boydii*: Gluc (+), Lac/Suc (-), H<sub>2</sub>S (-)

# IMViC тест (включает 4 теста)

- Тест на индол
- Тест с индикатором метил-рот
- Реакция Фогеса-Проскауэра
- Цитратный тест



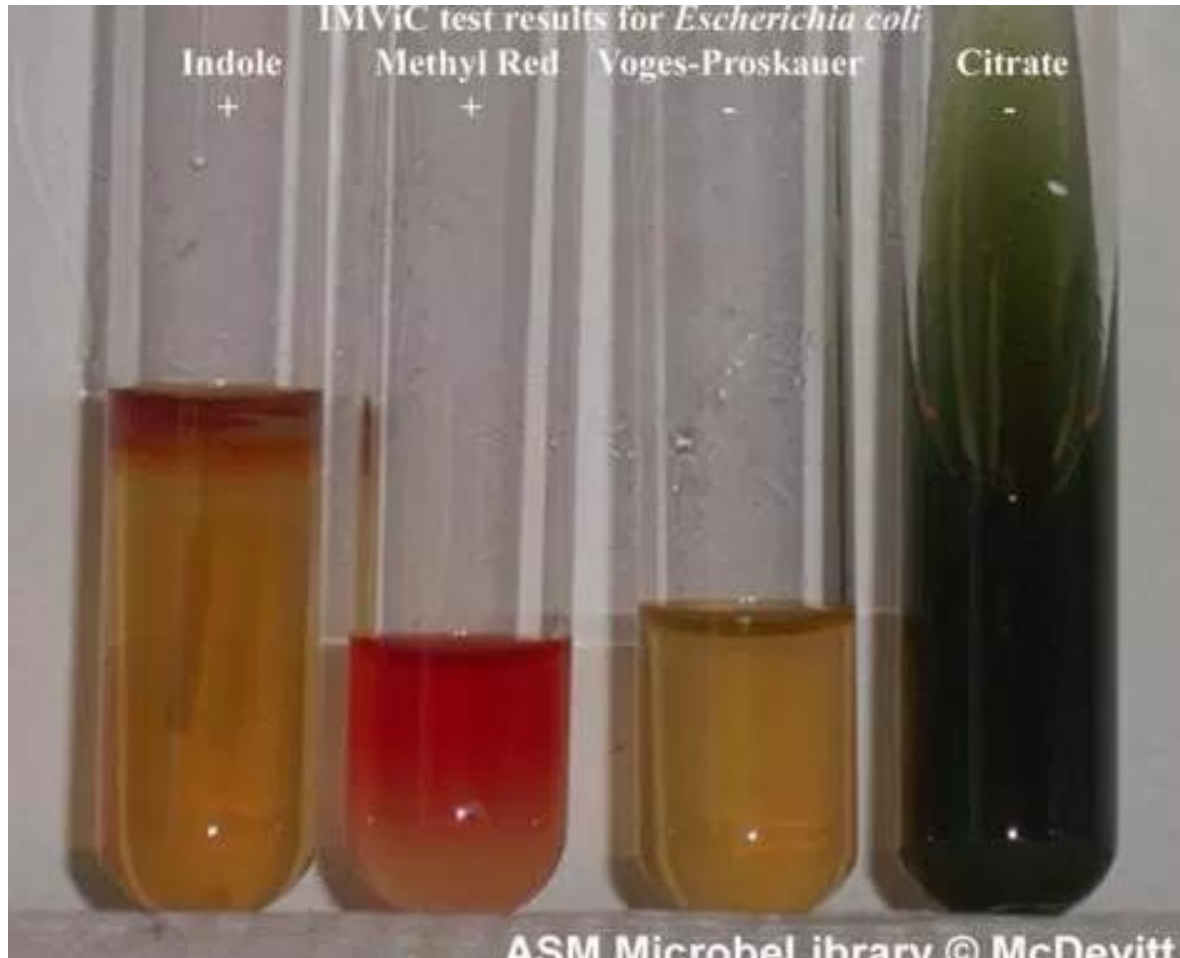
# Результат IMViC теста у различных бактерий

## IMViC Reactions

	I	M	Vi	C
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-
<i>Edwardsiella tarda</i>	+	+	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	+	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	-	+	+
<i>Enterobacter</i> spp.	-	-	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	+	+
<i>Citrobacter freundii</i>	-	+	-	+
<i>Citrobacter koseri</i>	+	+	-	+



# Идентификация *E.coli* при помощи IMViC теста



# API система

*(Application programming interface)*

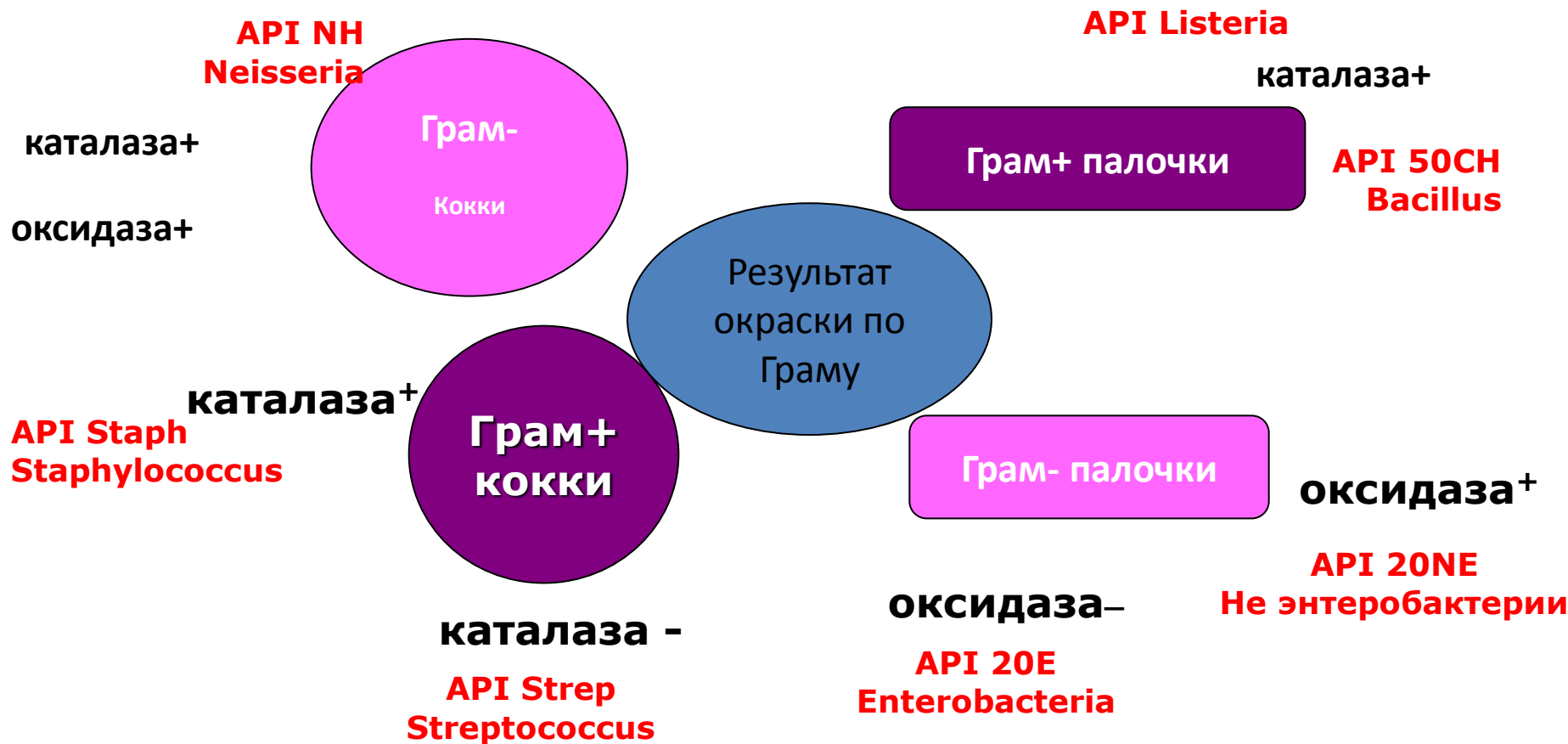
Перед проведением API теста проводят получение чистой культуры и некоторые первичные тесты по идентификации

**Тест 1:** Результат микроскопии мазка, окрашенного по Граму (грам-, грам+, палочковидные, кокковидные и пр.)

**Тест 2:** Тесты на ферменты дыхания → оксидазу, каталазу

# API система

Применение различных API-панелей зависит от результатов полученных после микроскопии, также оксидазного и каталазного тестов





# API система



## API Strep

→ Идентификация видов  
р. *Streptococcus*



## API Staph

→ Идентификация видов  
р. *Staphylococcus*



## API 20NE

→ идентификация не-  
ферментирующих  
бактерий  
(*Pseudomonas*)



## API 20E

→ Идентификация  
энтеробактерий

# Этапы идентификации посредством системы API



# API система

Изображение теста после инкубации при 37 °C в течение 24 ч



**Метаболизм азота**

**Метаболизм углеводов**

**24h / 37° C.....**

# API система

**API 20 E после инкубации ...положительные результаты тестов:**



**После инкубации...все тесты дали отрицательный результат**

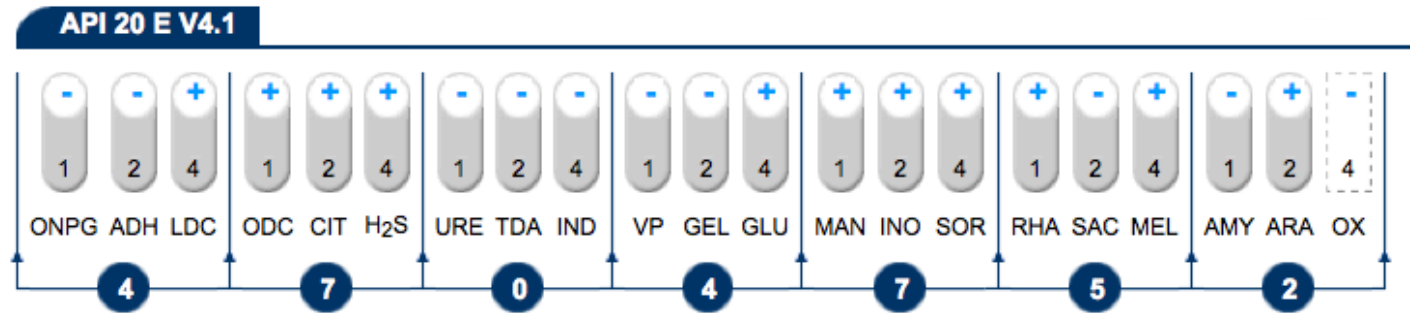


# API –система

(интерпретация результатов)



Внесение результатов в базу данных:



# API sistem

(интерпретация результатов)

Expression of results by software :

EXCELLENTE IDENTIFICATION						
Galerie	API 20 E V4.1					
Profil	4 7 0 4 7 5 2					
Note(s)	CONFIRMER PAR DES TESTS SEROLOGIQUES					
Taxons significatif(s)	% ID	T	Test(s) à l'encontre			
Salmonella spp	99.9	0.95				

Идентифицированные  
бактерии

Качество  
идентификации

# работа системы API

(результаты считываются через онлайн базу данных)



Reading an API20E using the online database (1).mp4

# Современные автоматизированные системы идентификации микроорганизмов

- **Анализатор Vitek 2 Compact** – полностью автоматическая система, обеспечивающая идентификацию микроорганизмов и определение их чувствительности к антимикробным препаратам за один день.
- Идентификация осуществляется путем автоматического определения биохимических свойств микроорганизмов, но если полная идентификация невозможна, то степень достоверности результатов об идентифицируемых микробах возможно указать в процентах, основываясь на данных компьютерной программы.



# Современные автоматизированные системы идентификации микроорганизмов

- Все используемые аналитические системы требуют получения идеальной чистой культуры идентифицируемых микроорганизмов
- После внесения инокулята (выделенной чистой культуры) в кассету, требуется определенное время для инкубации и уточнения результатов
- В завершении анализа система устанавливает видовую и родовую принадлежность микроорганизмов из инокулята, и определяет их чувствительность или резистентность к антимикробным препаратам
- Анализатор также позволяет установить минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) противомикробного препарата и сделать выводы о механизмах резистентности.

**Автоматизированный микробиологический  
анализатор *Vitek-2 Compact* фирмы BioMerieux  
(США)**



# Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация MALDI-TOF

Автоматизированная система основанная на масс спектрометрии

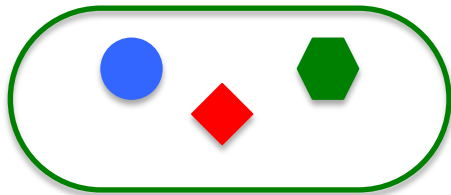
## принцип

Физическое определение клеточных белков с помощью масс-спектрометрии

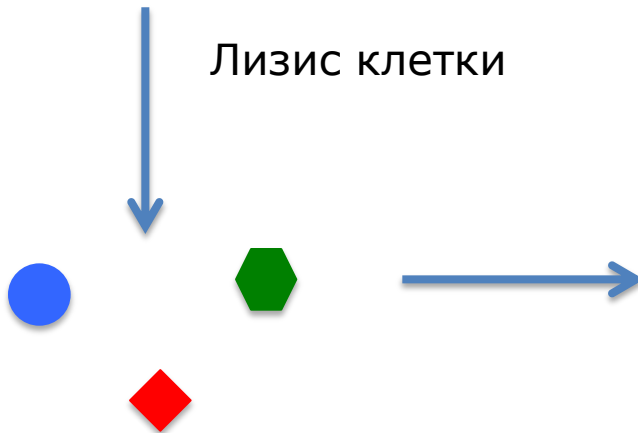
+ сравнение полученного спектрального профиля с базой данных

# MALDI-TOF

Бактерия

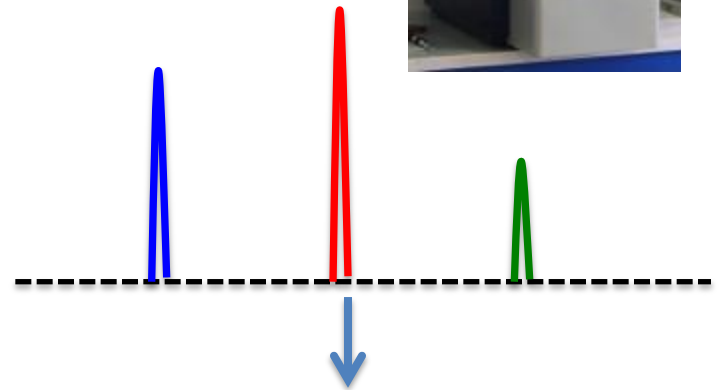


Лизис клетки



Экстракция молекул

Детекция молекул и  
получение масс-  
спектра

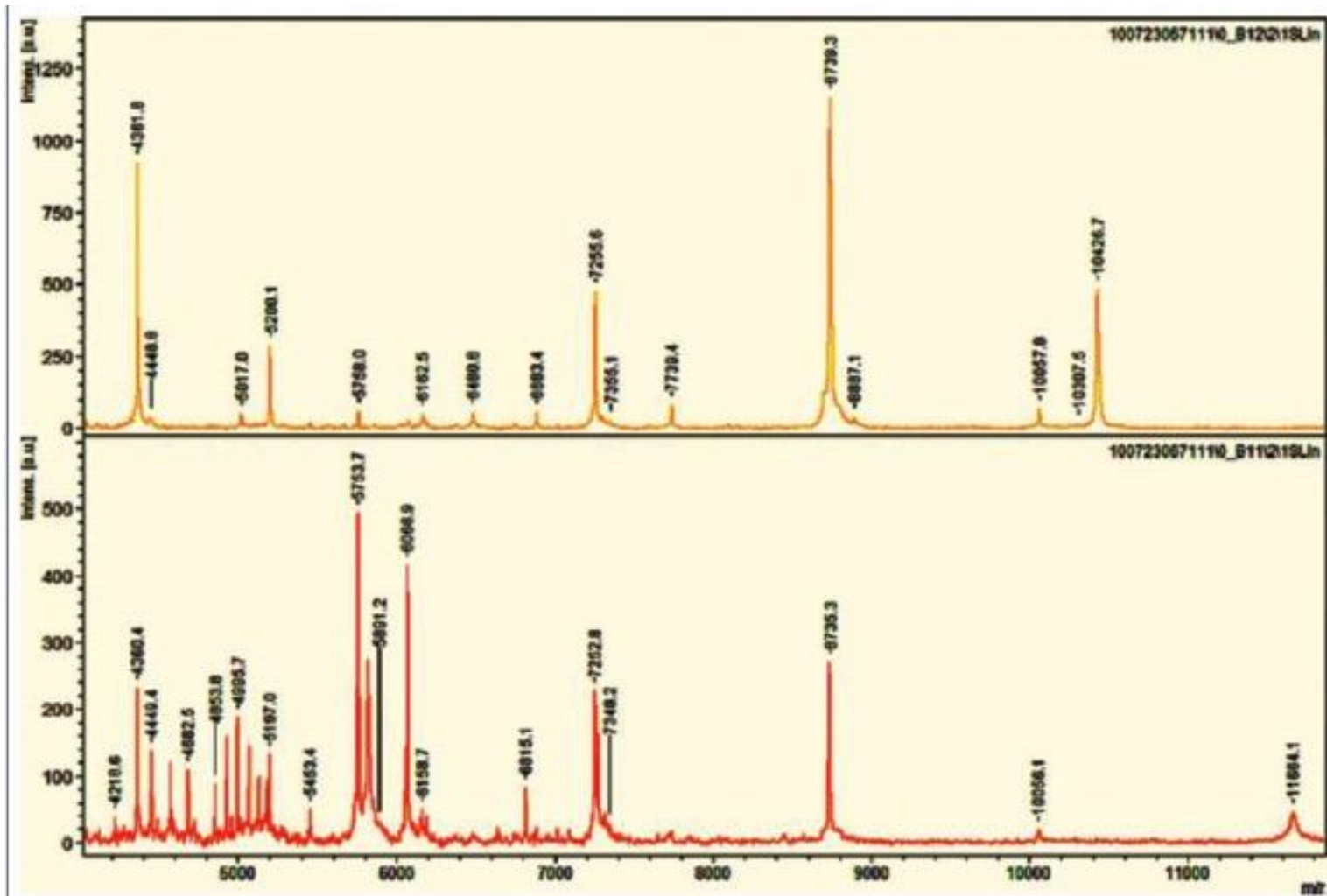


Сопоставление  
полученного спектра с  
базой данных и  
идентификация



# MALDI-TOF

(спектры бактерий)



## *Biomerieux VITEK-2*

- Анализатор Vitek-2 Compact представляет собой автоматическую систему.
- Идентификация микроорганизмов
- Определяется чувствительность к антимикробным препаратам (в течение 1 дня)
- Имеет пластиковые карты с 64 углублениями.
- Грамотрицательные бактерии
- Грамположительные бактерии
- Дрожжевые грибы
- Анаэробные бактерии, нейссерии, гемофильные бактерии
- Из высоковирулентных микроорганизмов: *Brucella melitensis*, *Burkholderia pseudomallei*, *Francisella tularensis*, *Burkholderia mallei*, *Escherichia coli* O157, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*.
- Время получения результата 6-8 часов.

## *Biomerieux VITEK-2*



*Antimikrob həssaslıq testi – (striplər)  
antimicrobial susceptibility testing-  
AST testi*

*Növlərin identifikasiyası (İD) kartları*