**Занятие 10**

**Дыхание и размножение микроорганизмов. Культивирование аэробных и анаэробных бактерий. Бактериологический метод. Выделение чистых культур аэробных и анаэробных бактерий (I день)**

**Энергетический метаболизм (биологическое окисление).** В зависимости от использования кислорода существует два типа биологического окисления:

* **Бродильный метаболизм (брожение)**
* **Окислительный метаболизм (дыхание)**

**Дыхание микроорганизмов.** Дыхание, или биологическое окисление это процесс получения энергии в сложных биохимических реакциях. Полученная энергия необходима микробной клетке для ее жизнедеятельности**.** При дыхании происходят процессы окисления и восстановления: окисление - отдача донорами (молекулами или атомами) водорода или электронов; восстановление - присоединение водорода или электронов к акцептору. В зависимости от того, что является конечным акцептором электронов, различают аэробное и анаэробное дыхание

**Типы дыхания микроорганизмов.** По отношению к кислороду, и использованию его в процессах получения энергии микроорганизмы делятся на:

* **Облигатные аэробы**

*- микроаэрофилы- требуют для роста низкие концентрации кислорода (5-10%)*

 *- капнофилы- требуют для своей жизнедеятельности высокие концентрации углекислого газа*

* **Облигатные анаэробы**

 ***-*** *строгие анаэробы- молекулярный кислород для них токсичен*

 *- аэротолерантные анаэробы- могут существовать в атмосфере*

 *кислорода*

* **Факультативные анаэробы** –способны расти и размножаться как при наличии, так и при отсутствии кислорода

**Рост и размножение микроорганизмов. Рост** – это согласованное увеличение всех компонентов клетки. Размножение большинства бактерий происходит путем простого – бинарного деления. Впячивание мезосом приводит к образованию поперечных перегородок. Палочковидные бактерии размножаются поперечным путем, кокки - делением в разных плоскостях. Дочерние клетки одинакового размера называются изоморфными, клетки разного размера – гетероморфными.

**Время генерации.** Размножение большинства бактерий с происходит высокой скоростью. Для оценки скорости размножения бактерий используется понятие ***время генерации,*** отображающее время, необходимое для удвоения бактериальной клетки, которое варьирует от вида бактерий. Высокую скорость размножения бактерий и других микроорганизмов обеспечивают ***оптимальные условия культивирования.*** Время генерации большинства бактерий составляет 15-30 минут, а у микобактерий туберкулеза оно равняется 20-24 часам.

**Размножение бактерий.** Поскольку деление бактериальной клетки приводит к образованию двух особей, их число растет в геометрической прогрессии: 20 – 21 – 22 - 23 …. 2n, таким образом после деления клетки n-ое количество раз, количество вновь образовавшихся клеток будет составлять 2n**.** Размножение бактерий   происходит до тех пор, пока содержание какого-нибудь из необходимых им компонентов питательной среды не достигнет минимума, после чего рост прекращается и если на протяжении всего времени в среду культивирования не добавлять питательные вещества и не удалять из нее продукты обмена, то можно получить ***статическую (периодическую культуру).***

**Фазы размножения бактерий в периодической культуре.** Периодическая культура ведет себя многоклеточный организм**.** Размножение бактерий в периодической культуре подчиняется определенной закономерности и состоит из нескольких фаз: начальная (lag) фаза, экспоненциальная (логарифмическая) фаза, стационарная и фаза отмирания.

**Фазы размножения**

* **Начальная фаза** – охватывает промежуток времени между посевом бактерий и началом размножения. В этой фазе усиливаются процессы обмена, увеличиваются размеры клеток, и они начинаются делиться.
* **Экспоненциальная или логарифмическая фаза** характеризуется максимальной скоростью деления. В этой фазе бактериальные клетки проявляют наибольшую биохимическую и биологическую активность.
* **Стационарная фаза** характеризуется уменьшением концентрации питательных веществ, накоплением токсических продуктов обмена, снижением скорости роста.
* **Фаза отмирания** (спада, лизиса) наступает вследствие накопления токсических продуктов обмена и включает прогрессирующее уменьшение количества жизнеспособных клеток и их гибель.

**Принципы культивации микроорганизмов.** Все микроорганизмы за исключением облигатных паразитов (риккетсии, хламидии и вирусы) возможно ***культивировать на искусственных питательных средах с целью получения чистой культуры в лабораторных условиях*.** Получение чистой культуры микроорганизмов в результате их культивирования позволяет изучить их химический состав, морфологические и биологические свойства, а также получить из них биопрепараты и вакцины

**Культивация микроорганизмов.** Для получения культуры возбудителей и изучения их особенностей и свойств их необходимо культивировать. С целью культивирования микроорганизмов исследуемый материал инокулируют (засевают) на соответствующие питательные среды. Инокуляцию проводят, строго соблюдая правила асептики. В некоторых случая используют ламинарные боксы.

***Ламинарный бокс*** представляет собой шкаф для работы с биологическими объектами в стерильных условиях. Оборудован осветителями, ультрафиолетовыми лампами и системой подачи стерильного воздуха

**Культуральный метод, сущность и значение.** Культуральный (бактериологический) метод основывается на выделении чистых культур возбудителей из исследуемого материала, и их последующей идентификации на основании морфологических, тинкториальных, культуральных, биохимических, токсигенных и антигенных свойств.

**Культура и чистая культура.** Популяция микроорганизмов, культивируемых на питательных средах, называется ***культурой.*** Для изучения особенностей микроорганизмов, определения их систематического положения необходимо выделить отдельные виды микроорганизмов, получить их чистую культуру и идентифицировать ее. Культура, состоящая из одного вида микроорганизмов, называется ***чистая культура.***

**Инокуляция в питательные среды (посев).** Первый этап культивирования бактерий состоит в их инокуляции (посеве) в питательные среды. Посев на бактерий на питательные среды проводят разными путями. ***Инокуляцию*** исследуемого материала в питательную среду проводят при помощи ***бактериологической петли.***

**Инокуляция в питательный бульон.**

* Петлей или пипеткой отбирают материал из пробирки с выросшей культурой и переносят в пробирку со ***стерильным жидким бульоном.*** При этом петлю слегка погружают в пробирку с питательным бульоном и растирают посевной материал по стенке пробирки, после чего его смывают средой.
* Выполненные посевы помещают в термостат в вертикальном положении.

**Посев на поверхность скошенного агара в пробирке.** При пересеве бактерий на стерильный скошенный агар, обе про­бирки берут в левую руку, и держат так, чтобы скошенная часть агара находилась на поверхности и посев осуществлялся под контролем глаза.  Петлю, находящуюся в правой руке, стерилизуют в пламе­ни и дают ей остыть. Пробки из про­бирок вынимают правой рукой V и IV пальцами. Петлю держат, как писчее перо. После вынима­ния пробки пробирки держат в наклон­ном положении. Петлю с находящимся на ней пересеваемым материалом вводят в пробирку со стерильным агаром до дна, опускают на поверхность питательной среды и скользящими движениями наносят штрих снизу вверх, от одной стенки пробирки к другой. Пробирки с посевами культивируют 18-20 при 37°C

**Инокуляция бактериологической иглой.**

* Пробирки со столбиком агара держат вверх дном в левой руке. После снятия пробки горлышко пробирки фламбируют огнем.
* Бактериологическую иглу прожигают в пламе­ни, охлаждают, забирают ею инокулируемый материал и вкалывают с находящимся на ней мате­риалом до дна пробирки. Пробку фламбируют в огне, закрывают пробирку и помещают в термостат.

**Инокуляция петлей на поверхность питательной среды в чашке Петри**

* Крышку чашки Петри перед посевом исследуемого материала или культуры бактерий приоткрывают только после того, как инокулируемые материалы были взяты бактериологической петлей! Чашки с питательной средой должны находиться на рабочем столе крышкой сверху.  Крышку приоткрывают кончиками пальцев левой руки настолько, чтобы в об­разовавшуюся щель свободно проходили петля или шпатель. Небольшое количество исследуемого материала втирают бактериальной петлей в поверхность питательной среды параллельными штрихами.
* В зависимости от цели культивирования возможны различные варианты инокуляции на поверхность плотной питательной среды
* Н-р, для выделения чистой культуры используется метод инокуляции в 4 сектора на чашку Петри
* Для оценки бактериурии (определения количества бактерий) при бактериологическим исследовании мочи используют метод секторных посевов

**Инокуляция шпателем на поверхность питательной среды.** Инокуляцию микроорганизмов в питательную среду в чашки можно производить с использованием стерильного шпателя. Данный метод используют для получения сплошного роста на поверхности среды в чашке. Для этого в чашку вносят каплю инокулируемого материала и стерильным шпателем втирают его в по­верхность питательной среды.

**Инкубация.** После инокуляции образцы с микроорганизмами инкубируют с термостате при определенной температуре (обычно при 37°C) в течение необходимого времени (обычно 1-2 дня).

**Условия культивирования.** Для культивирования микроорганизмов на питательных средах необходимо соблюдение оптимальных условий

* В первую очередь эти условия обеспечиваются оптимальной температурой, временем и атмосферой культивирования.

Температура культивирования. В зависимости от *температуры культивирования* все микроорганизмы делятся на психрофилы, мезофилы и термофилы

* Оптимальная температура культивирования для *психрофильных бактерий* - 6-200C, мезофильных - 34-370C. *Термофильные бактерии* способны размножаться при более высоких температурах, даже при 70-750C .
* Большинство патогенных для человека бактерий являются мезофилами.

**Время культивирования.** *Время культивирования* зависит от вида микроорганизмов. Большинство бактерий культивируют до получения видимого роста. Для культивирования большинства бактерий в оптимальных условиях достаточно 18-24 ч, тогда как для ряда бактерий требуются более длительные сроки культивирования. Н-р, для культивирования возбудителя коклюша требуется от 2 до 5 суток, а для культивирования возбудителя туберкулеза 3-4 недели. В отсутствии оптимальных условий время культивирования может затянуться.

**Атмосфера культивирования.** Известно, что для размножения аэробов требуется кислород. Поэтому аэробы хорошо растут на поверхности плотной питательной среды или в верхнем слое жидкой.

* ***Микроаэрофилы*** культивируют при низкой концентрации кислорода (1-5%). С этой целью используют CO2-инкубаторы или эксикаторы
* ***Факультативные анаэробы*** культивируются как в аэробных так и анаэробных условиях.
* ***Облигатные анаэробы*** культивируются в условиях отсутствия кислорода

**Культивирование анаэробов.** Для культивирования анаэробов используются *специальные питательные среды* с добавлением веществ, редуцирующих содержащийся в среде кислород. Н-р, среда Китта-Тароцци - жидкая питательная среда для культивирования анаэробных микроорганизмов, состоящая из мясопептонного бульона, обогащенного экстрактивными продуктами печени животных и содержащего кусочки вываренной печени в качестве поглотителя свободного кислорода.Для культивирования анаэробных бактерий используют *анаэростаты*

Система *Gaspak* используется для создания анаэробных условий. Содержит пакет с реагентами - поглотителями кислорода (цитратная кислота, карбонат натрия, борогидрат натрия) и герметически закрывающуюся стеклянную камеру. При добавлении воды происходит активация реагентов в газпаках, после чего происходит химическое связывание кислорода. Таким образом в камере создается анаэробная атмосфера. Данный метод часто применим для культивирования аэротолерантных микроорганизмов.

**Методы получения чистой культуры аэробных бактерий.** Для получения чистой культуры бактерий можно использовать различные методы

* Наиболее часто используются методы, основанные на механическом разобщении микроорганизмов на поверхности или внутри питательной среды. Принцип этих методов основан на механическом разделении исследуемого материала в глубине или на поверхности питательной среды, с целью получения роста микроорганизмов в виде изолированных колоний. Считается, что одна колония развивается из одной микробной клетки. И поскольку колония состоит из микроорганизмов одного вида, ее можно рассматривать как чистую культуру.
* Метод разобщения микробных клеток в плотных питательных средах (метод Коха). Данный метод является одним из старых методов, применяемых для получения чистой культуры. Исследуемый материал последовательно разводят в стерильном физиологическом растворе затем по одной капле из каждого разведения вносится в пробирку с расплавленным до 400C агаром и перемешивается. Содержимое каждой пробирки переносится в чашку Петри и инкубируется в термостате. После инкубации рост изолированных колоний обычно наблюдается на чашке Петри, в которую добавляли материал из последнего разведения
* **Метод разобщения микробных клеток на поверхности плотной питательной среды(метод Дригальского).** Суть метода заключается в последовательном распределении исследуемого материала ( инокулят) в несколько чашек Петри с питательной средой при помощи стеклянного шпателя или петли. Посев исследуемого материала осуществляют на три чашки с МПА. Для этого, на середину первой чашки пипеткой или бактериологической петлей вносят исследуемый материал, который затем распределяют стеклянным шпателем. Не стерилизуя, шпатель переносят во вторую, а затем в третью чашку проводя распределение оставшегося на его поверхности материала.После инкубации наблюдается последовательное уменьшение количества микроорганизмов на поверхности питательной среды в чашка
* **Метод инокуляции в секторы.** В настоящее время с целью получения чистой культуры применяется метод посева на 4 сектора. Исследуемый материал вносят петлёй в чашки Петри с питательным агаром и распределяют его штрихами. Дно чашки условно разделяют на 4 сектора. Первоначально материал засевают на первый сектор и проводят параллельные линии по всему сектору. Далее, прожженной петлёй, не изменяя её положения по отношению к агару, производят штриховые посевы из 1-го сектора во 2-ой, таким же образом из 2 сектора в 3-ий и аналогично в 4 сектор. После инкубации наблюдается последовательное уменьшение количества микроорганизмов на питательной среде, и обычно в последнем секторе микроорганизмы растут в виде изолированных колоний. Используя метод инокуляции в 4 сектора на чашке Петри можно также получить предварительную информацию о количестве микроорганизмов в исследуемом материале . Так, рост определённых микроорганизмов только в 1-ом секторе оценивается как (+), в 1-ом и 2-ом как (++), в 1-ом, 2-ом и 3-ем секторах – как (+++), и соответственно как (++++) при росте во всех 4-ех секторах. При учете результатов бактериологического исследования , в материале, количество которого трудно установить (н-р, материал взятый тампоном) количество микроорганизмов указывается в плюсах (+), в материале количество которого можно установить (н-р, моча, мокрота) определяют колониеобразующие единицы в мл (КОЕ/мл ).

**Получение клонов.** Извлечение одной микробной клетки при помощи микроманипуляторной иглы под микроскопом и инокуляция ее на стерильную питательную среду.

* Культура выросшая из одной микробной клетки называется *клон.*
* Этот метод наиболее часто применяется в генетических исследованиях.
* Клон определенного микроорганизма считается его идеальной чистой культурой.

**Методы основанные на принципе использования биологических особенностей микроорганизмов.**

* Получение чистой культуры подвижных бактерий
* Получение чистой культуры спорообразующих бактерий
* Получение чистой культуры на селективных питательных средах
* Получение чистой культуры путем заражения чувствительных лабораторных животных
* Методы, основанные на принципе использования биологических свойств микроорганизмов

**Методы получения чистой культуры анаэробных бактерий**

* *Метод Цейсслера*. Исследуемый материал инокулируют в секторы на поверхности плотной среды. Инкубируют в анаэробных условиях при 37 градусах 24-72ч.Выросшие на поверхности питательной среды колонии пересевают на среду Китта-Тароцци или другие среды для анаэробов для выделения чистой культуры
* *Метод Вейнберга*. Несколько капель исследуемого материала вносят в пробирку с 0,9% изотоническим раствором. Перемешивают и переносят в пробирку с охлажденным до 45-50 градусов сахарным агаром, разлитым в пробирки высоким столбиком. После перемешивания содержимое пробирки засевают еще в две пробирки с сахарным агаром и быстро охлаждают под струей воды. Выросшие в глубине питательной среды через 24-72ч. колонии пересевают на среду Китта-Тароцци или другие среды для анаэробов с целью выделения чистой культуры