

## Занятие 6

### Культивирование аэробных и анаэробных бактерий. Бактериологический метод. Выделение чистых культур аэробных и анаэробных бактерий (I, II и III дни). Современные методы идентификации микроорганизмов.

#### **План занятия:**

1. Понятия «культивирование микроорганизмов», «культура», «клон», «колония», «штамм».
2. Принципы культивирования бактерий
3. Методы посева аэробных и анаэробных бактерий на питательные среды.
4. Культуральный метод: сущность и значение, условия культивирования (температура, аэрация и время культивирования).
5. Методы получения чистых культур аэробных микроорганизмов (методы Дригальского, Щукевича, посев штрихом, применение элективных сред).
6. Культивирование и методы получения чистых культур анаэробных бактерий (методы Цейслера и Вейнберга).
7. Культуральные свойства бактерий – макроскопическое и микроскопическое изучение колоний (размер, форма, прозрачность, консистенция, расположение, поверхность, края и структура).
8. Продукты жизнедеятельности микроорганизмов: ферменты и пигменты, ароматические вещества и их значение.
9. Классификация бактериальных ферментов, роль ферментов в идентификации бактерий.
10. Сахаролитические ферменты и их определение (среды Гисса и Клиглера).
11. Протеолитические ферменты и их определение (рост на желатине, сыворотке и молоке, определение индола, аммиака и сероводорода), окислительно-восстановительные ферменты (оксидаза, каталаза, декарбоксилаза).
12. Ферменты агрессии и их определение (гиалуронидаза, лецитиназа, фибринолизин, плазмокоагулаза).
13. Современные методы идентификации (микротест-системы, анализатор Vitek и пр.)

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 случаях 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 (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.

- ⊙ 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**.

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.

**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 вносят в пробирку с расплавленным до 40°C 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 чашках.

**Метод инокуляции в секторы** В настоящее время с целью получения чистой культуры применяется метод посева на 4 сектора. Исследуемый материал вносят петлей 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 петлей, 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).

### **Методы получения чистой культуры анаэробных бактерий**

**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.

**Метод Цейсслера.** Исследуемый материал инокулируют в секторы на поверхности плотной среды. Инкубируют в анаэробных условиях при 37°C 24-72ч.

Выросшие на поверхности питательной среды колонии пересевают на среду Китта-Тароцци или другие среды для анаэробов для выделения чистой культуры/

**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 разобщение 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. На данном этапе получения чистой культуры производится посев изолированных колоний на другие питательные среды, и их последующая инкубация в течение 1-2 дней.

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

На плотных питательных средах бактерии образуют скопление клеток — колонии, которые принято считать потомками одной клетки. Колонии различаются формой, размерами, поверхностью, прозрачностью, консистенцией и окраской. Колонии с гладкой блестящей поверхностью принято называть колониями в S-форме (от англ. smooth — гладкий). Колонии с матовой шероховатой поверхностью называют R-формами (от англ. rough — шероховатый). Окраска колоний определяется способностью бактерий синтезировать пигменты.

Пигменты различаются по цвету, химическому составу и растворимости.

Среди продуцируемых бактериями пигментов встречаются:

- каротиноиды — жирорастворимые пигменты красного, желтого и оран-жевого цветов. Они встречаются у представителей рода *Mycobacterium*, *Micrococcus*;

- пирроловые — к ним относится спирторастворимый пигмент продигио- зан, встречающийся у *Serratia marcescens*;
- фенозиновые — к этой группе относится водорастворимый пигмент *Pseudomonas aeruginosa* пиоцианин, выделяясь в питательную среду, окрашивает ее;
- меланины — нерастворимые пигменты черного и коричневого цветов (у бактерий рода *Porphyromonas*).

Пигменты предохраняют бактериальную клетку от УФ-лучей, обезвреживают токсичные кислородные радикалы, обладают антибиотическими свойствами, принимают участие в реакциях, сопутствующих фотосинтезу в фототрофных бактериях.

Вид, форма, цвет и другие особенности колоний, а также характер роста на плотных питательных средах определяются как культуральные свойства бактерий и учитываются при их идентификации.

**Размеры колоний** крупные (< 4-5), средние (2-4 мм), мелкие (1-2 мм), точечные (>1 мм).

**Консистенция колоний** плотные, мягкие, вязкие, слизистые

**По степени прозрачности различают**

-прозрачные

-полупрозрачные

-мутные

**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 1см<sup>2</sup>. Общее количество колоний в одном квадрате вычисляют по формуле

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

$$r - \text{радиус чашки} = 5 \text{ см}$$

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

Для определения концентрации микроорганизмов может использован 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.

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

С целью идентификации бактерий определяют сахаролитические, протеолитические и др. ферменты.

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.

Изучение способности микроорганизмов ферментировать углеводы (сахаролитических свойств). 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. 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 поплавочек, который всплывает в случае образования газа при расщеплении углеводов.

В полужидких средах Гисса газообразование определяют по образованию пузырьков.

Для определения сахаролитической активности выделенную чистую культуру вносят петлей в пробирки с «пестрым» рядом и инкубируют при 37°C 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 поплавочков. 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 «пестрый» вид.

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

Наличие протеолитических ферментов определяют при посеве бактериальной культуры уколом в столбик 10-20% желатина. Инокуляты инкубируют при температуре 20-22 °C 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°C.

Определение способности продуцировать индол проводят методом Эрлиха, Мореля и Ковача.

Определение образования 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.

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. Определенные виды бактерий вырабатывают либо цитохромоксидазу, либо индофеноксидазу (железосодержащий гемопротейн), которые катализируют перенос электронов на кислород. Исследуемую культуру помещают на полоску или диск индикаторной бумаги. При положительном результате наблюдается появление синей или лиловой окраски в течение 10-30 сек.

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 (EMB-агар) и пр.

Современные автоматизированные системы идентификации микроорганизмов

API система, Анализатор Vitek 2 Compact, Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация MALDI-TOF