

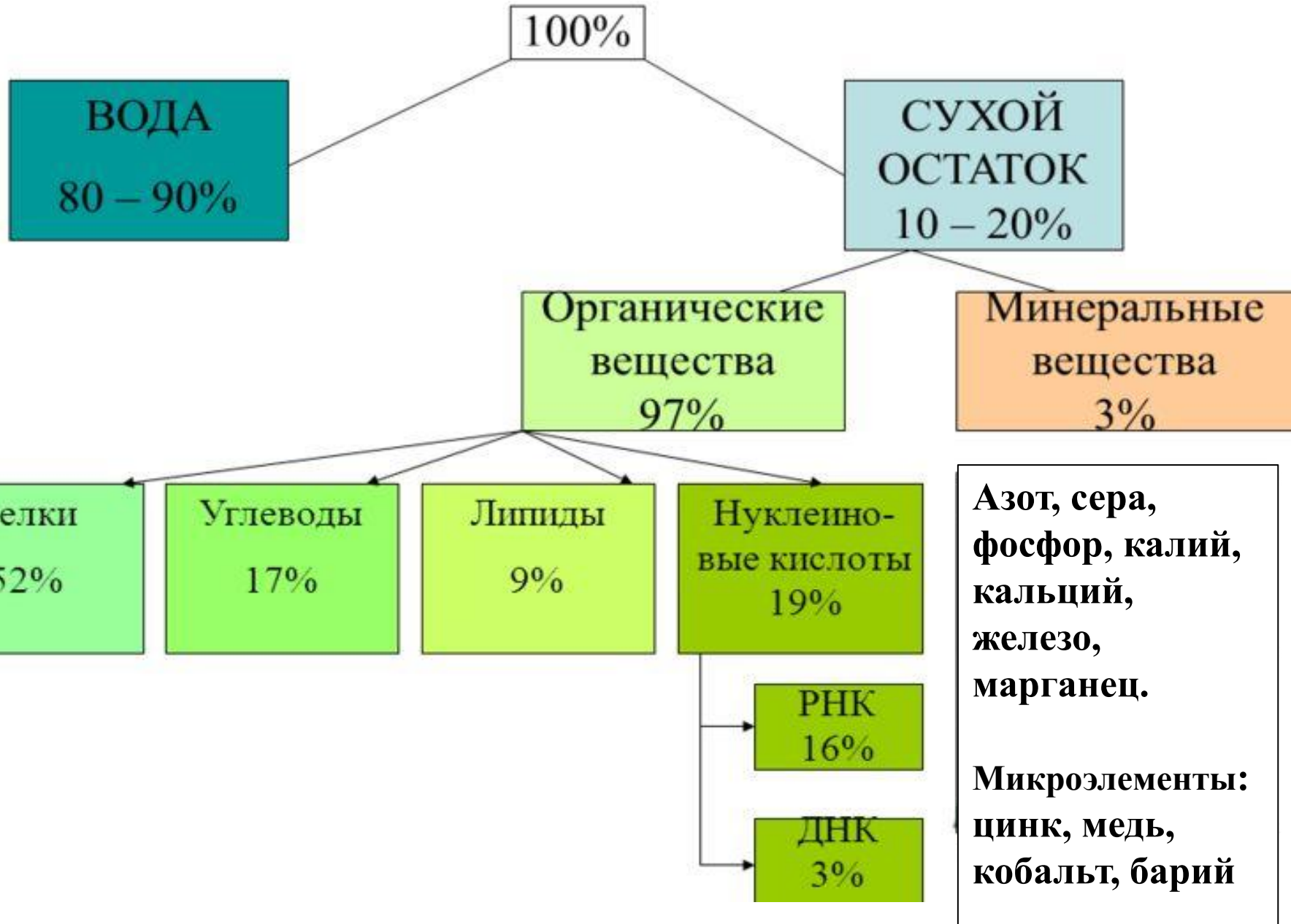
ТЕМА 5

Физиология микроорганизмов. Метаболизм и питание микробов. Питательные среды. Влияние физических и химических факторов на микроорганизмы. Стерилизация и дезинфекция. Дыхание и размножение микроорганизмов. Култивация аэробных и анаэробных бактерий. Бактериологический метод. Выделение чистых культур аэробных и анаэробных бактерий (I день, II день, III день), их идентификация на основе культуральных свойств и ферментативной активности. Современные методы идентификации микроорганизмов.

Физиология микроорганизмов

Физиология изучает все процессы жизнедеятельности микроорганизмов - их метаболизм, питание, дыхание, рост и размножение.

Химический состав бактериальной клетки



Метаболизм представляет собой совокупность противоположных процессов – катаболизма и анаболизма.

- **Катаболизм (энергетический метаболизм)** процесс расщепления крупных молекул на более мелкие при котором происходит высвобождение энергии. Высвобождаемая при этом энергия накапливается в виде макроэргических соединений молекулы АТФ и используется в процессе жизнедеятельности клетки.
- При **анаболизме** осуществляется синтез высокомолекулярных соединений, используемых для образования клеточных структур. Поэтому анаболизм нередко называют **конструктивным метаболизмом**. Процесс протекает с использованием энергии, высвободившейся в результате энергетического метаболизма.

Энергетический метаболизм (биологическое окисление)

- *В зависимости от использования кислорода существует два типа биологического окисления:*
- ***Бродильный метаболизм (брожение)***
- ***Окислительный метаболизм (дыхание)***

Типы питания микроорганизмов

- Микроорганизмы различаются по типам питания в зависимости от усвояемых источников *углерода и азота*.
- В зависимости от источника углерода бактерии подразделяют на аутотрофы и гетеротрофы.

АУТОТРОФЫ

- **Аутоотрофы** (от греч. *autos* - сам, *trophe* – питание) способны синтезировать все необходимые соединения из простых веществ. Используют в качестве источника углерода углекислый газ и или другие карбонаты.
- К ним относятся большинство бактерий обитающих в почве (нитрифицирующие, серобактерии и пр.)
- Организмы для которых источником энергии является свет называются **фототаутоотрофами**.
Хемотаутоотрофы в качестве источника энергии используют органические соединения

ГЕТЕРОТРОФЫ

- **Гетеротрофы** (от греч. *heteros* - другой, *trophe* - питание) используют в качестве источника углерода органические соединения.
 - Источником углерода для них являются гексозы, многоатомные спирты и аминокислоты
 - Организмы для которых источником энергии является свет называются **фотогетеротрофами**.
- Хемогетеротрофы** в качестве источника энергии используют органические соединения

Типы питания микроорганизмов

категория	источник энергии	источник углерода	представитель
фотоавтотрофы	Свет	CO ₂	Цианобактерии, лишайники
фотогетеротрофы	Свет	Органические вещества	Фотосинтезирующие бактерии
хемоавтотрофы	Органические вещества	CO ₂	Серобактерии, железобактерии
хемогетеротрофы	Органические вещества	Органические вещества	Простейшие, грибы, большинство бактерий

Механизмы питания микроорганизмов

Поступление питательных веществ внутрь микробной клетки осуществляется:

- *Пассивным переносом:*
 - **Простая диффузия** (перенос веществ из области высокой концентрации в область низкой)
 - **Облегченная диффузия** (с помощью белков переносчиков – пермеаз и транслоказ)
- *Активным переносом:*

Активный транспорт

 - **Ионный транспорт** (унипорт, симпорт, антипорт)
 - **АТФ-зависимый перенос**
- *Транслокация радикалов (фосфотрансферный путь)*

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

- *Культивирование микроорганизмов в условиях in vitro осуществляется на **питательных средах**. Для того чтобы микроорганизмы росли и развивались, питательные среды должны отвечать следующим требованиям:*
- *Оптимальный состав. В их состав должны входить все необходимые компоненты, которые нужны для развития микробов*
- *Изотоничность*
- *Оптимальный pH среды*
- *Стерильность (необходима для того, чтобы избежать конкурентной борьбы между микробами)*
- *Определенный окислительно-восстановительный потенциал*
- *Стандартизированный состав*
- *Соответствующая вязкость и прозрачность (для лучшего изучения характера микробных колоний)*
- *Проста в приготовлении и экономически выгодна*

Классификация питательных сред

- В современной классификации учитываются **физико-химические свойства, состав и назначение** питательных сред .
- По составу компонентов различают **естественные (натуральные)** и **синтетические** питательные среды



Классификация питательных сред

- В зависимости от консистенции питательные среды могут быть **жидкими, полужидкими и плотными.**
- К жидким питательным средам относятся мясо-пептонный бульон (МПБ), пептонная вода и др.
- Для создания полужидких и плотных питательных сред к ним добавляют агар или желатин.



Классификация питательных сред

- К простым средам относятся – мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар , пептонная вода и пр.
- По составу различают простые и сложные питательные среды
- При добавлении к простым средам крови, сыворотки, углеводов получают **сложные питательные среды**, например: кровяной агар, сахарный и сывороточный бульоны.



Классификация питательных сред

- В зависимости от цели применения различают :
- **Основные (универсальные) питательные среды** применяют для культивирования большинства неприхотливых микроорганизмов. К этим средам можно отнести МПА, МПБ, пептонную воду.
- **Специальные питательные среды** позволяют культивировать микроорганизмы, не размножающиеся на обычных питательных средах. Н-р, для культивирования менингококков и пневмококков не растущих на обычных средах, применяют кровяные и сывороточные среды.
- К специальным средам относятся **среды обогащения**. Эти среды содержат компоненты (факторы роста) , стимулирующие рост соответствующих микроорганизмов, н-р, среда содержащая селенит натрия стимулирует рост сальмонелл

Классификация питательных сред

- *Элективные питательные среды* используют для культивирования определенного вида микроорганизмов. Н-р, щелочной агар служит для выделения холерного вибриона, в таких условиях ингибируется рост других бактерий; среда с высоким содержанием соли (ЖСА) стимулирует рост стафилококков
- *Жидкие элективные среды* также можно использовать в качестве сред обогащения и накопления. При применении таких сред облегчается процесс получения культуры надлежащих микробов из патологического материала. Н-р, для выделения шигелл из испражнений больного дизентерией целесообразно в начале провести инокуляцию материала на селенитовый бульон.

Классификация питательных сред

- **Дифференциально-диагностические среды** позволяют дифференцировать различные микроорганизмы, н-р, на основании их ферментативной активности, и облегчают их идентификацию. К таким средам относятся среда Эндо, Гисса, Клиглера и др.



Комбинированные питательные среды
сочетают в себе селективную среду, и дифференциальную среду. Примером таких сред является среда Плоскирева и висмут-сульфитный агар, используемые для выделения патогенных кишечных бактерий. Обе среды ингибируют рост кишечной палочки

Классификация питательных сред

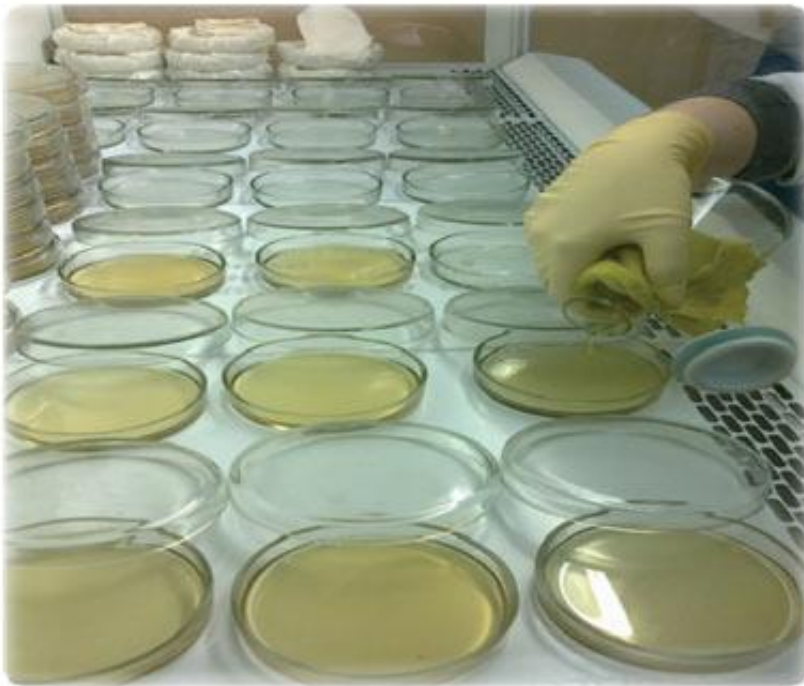
- **Консервирующие транспортные среды** (глицериновая смесь, фосфатный буфер, тиогликолевая среда для анаэробов и др.) применяются для первичной инокуляции и транспортировки патологического материала. Эти среды предупреждают отмирание патогенных микробов и подавляют рост сапрофитов.



Приготовление питательных сред



Приготовление питательных сред



Приготовление питательных сред



Влияние факторов окружающей среды на микроорганизмы

- Факторы окружающей среды оказывают влияние на жизнедеятельность, рост, размножение и гибель микроорганизмов.
- Факторы, влияющие на микроорганизмы подразделяются на **физические, химические и биологические**
- Действие этих факторов может быть различным в зависимости от их природы и особенностей микроорганизмов. Н-р, влияние может быть губительным или благоприятным для роста микробов.

Влияние физических факторов на микроорганизмы

- **Температура.** По отношению к температуре все микроорганизмы делятся на три группы:
- **Психрофильные** (от греч. *psychros*- холод, *phileo*- люблю) микроорганизмы
 - минимальная t — 0°C , оптимальная— $6-20^{\circ}\text{C}$, максимальная— 30°C
- **Мезофильные** (от греч. *mesos*- средний) микроорганизмы
 - минимальная t — 10°C , оптимальная— $34-37^{\circ}\text{C}$, максимальная— 45°C
- **Термофильные** (от греч. *termos* - тепло, жар) или теплолюбивые микроорганизмы развиваются при температуре выше 55°C
 - минимальная t — 30°C , оптимальная— $50-60^{\circ}\text{C}$, максимальная— $70-75^{\circ}\text{C}$

Влияние физических факторов на микроорганизмы

- **Высушивание** приводит к обезвоживанию цитоплазмы, нарушению целостности цитоплазматической мембраны, вследствие чего нарушается питание микробных клеток и наступает их гибель.
- К примеру патогенные нейссерии (менингококки, гонококки), лептоспиры, бледная трепонема и др. погибают при высушивании через несколько минут. Холерный вибрион выдерживает высушивание 2 сут, сальмонеллы тифа - 2 мес, а микобактерии туберкулеза – до 3 мес.
- Для хранения культур микроорганизмов, вакцин и других биологических препаратов широко применяют метод **лиофильной сушки**. Сущность метода состоит в том, что предварительно микроорганизмы или препараты подвергают замораживанию, а затем их высушивают в условиях вакуума. При этом микробные клетки переходят в состояние анабиоза и сохраняют свои биологические свойства в течение нескольких месяцев или лет.

Влияние физических факторов на микроорганизмы

- **Лучевая энергия.** В природе микроорганизмы постоянно подвергаются воздействию **солнечной радиации**. Прямые солнечные лучи вызывают гибель многих микроорганизмов в течение нескольких часов.
- Губительное действие солнечного света обусловлено активностью **ультрафиолетовых лучей (УФ-лучи)** с длиной волны 254-300 нм. Они инактивируют ферменты клетки и повреждают ДНК. Патогенные бактерии более чувствительны к действию УФ-лучей, чем сапрофиты.
- Другие виды лучистой энергии - **рентгеновские лучи, α -, β -, γ -лучи** оказывают губительное действие на микроорганизмы только в больших дозах, порядка 440-280 Дж/кг. Гибель микробов обусловлена разрушением ядерных структур и клеточной ДНК. Малые дозы излучений стимулируют рост микробных клеток.
- Бактерицидное действие **ионизирующего излучения** используется для консервирования некоторых пищевых продуктов, **стерилизации** биологических препаратов (сывороток, вакцин и др.)

Влияние физических факторов на микроорганизмы

- *Ультразвук* это звуковые волны частотой выше 20 000 Герц . Одним из основных эффектов влияния ультразвука на микроорганизмы является **эффект кавитации** (от лат. cavitum - полость).
- *Ультразвук* вызывает значительное поражение микробной клетки. Под действием ультразвука газы, находящиеся в жидкой среде цитоплазмы, активируются, внутри клетки возникает высокое давление (до 10000 атм.) и образуются кавитационные полости. Это приводит к разрыву клеточной оболочки и гибели клетки.
- Ультразвук используют для стерилизации пищевых продуктов (молока, фруктовых соков), питьевой воды.
- **Высокое давление** . Высокое атмосферное давление не губительно для большинства микроорганизмов. В природе встречаются даже бактерии, живущие в морях и океанах на глубине 1000-10000 м под давлением от 100 до 900 атм. Некоторые виды бактерий выдерживают давление до 3000-5000 атм, а бактериальные споры - даже 20000 атм.
- Примечательно, что воздействие **насыщенного водяного пара при давлении выше атмосферного** приводит к гибели как вегетативных, так и споровых форм микроорганизмов. Этот способ **стерилизации паром под давлением** производят в автоклаве

СТЕРИЛИЗАЦИЯ

- **Стерилизация** – это полное освобождение объектов окружающей среды от микроорганизмов и их спор
- Стерилизацию производят различными способами:
- **физическими** (воздействие высокой температуры, УФ-лучей);
- **химическими** (использование различных дезинфектантов, антисептиков и антибиотиков);
- **механическими** (использование бактериальных фильтров)

Стерилизация физическими методами

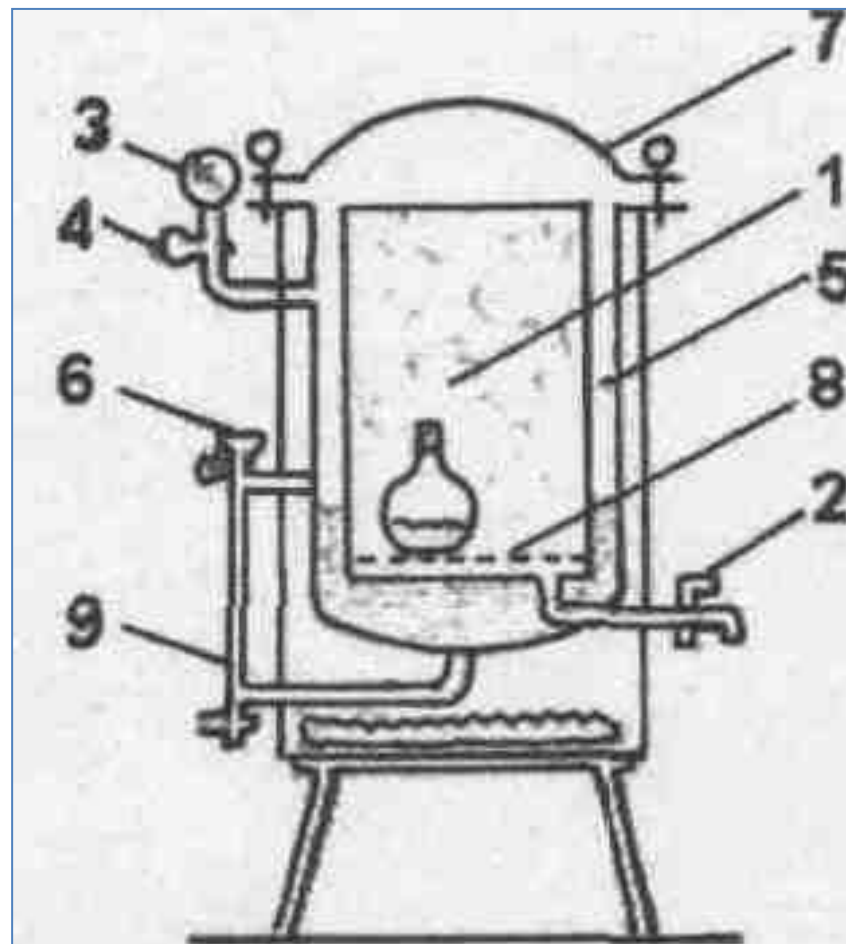
(тепловая стерилизация)

- **Стерилизация кипячением и прокаливание** можно считать самыми простыми и доступными методами тепловой стерилизации
- Для тепловой стерилизации применяют в основном **сухой жар и пар под давлением.**
- **Стерилизацию сухим жаром** или горячим воздухом осуществляют в печах Пастера (сушильных сухожаровых шкафах) при 165-170⁰С в течение 1 часа. Метод позволяет уничтожать не только вегетативные клетки, но и споры микроорганизмов.
- **Стерилизацию паром под давлением** производят в **паровых стерилизаторах** (автоклавах), способ основан на воздействии на стерилизуемые материалы насыщенного водяного пара при давлении выше атмосферного. При рабочем режиме в 2 атм. при 121⁰С в течение 30 мин. погибают как вегетативные, так и споровые формы микроорганизмов. **Пастеризацию** условно можно считать стерилизацией. В результате часовой экспозиции при 65⁰-70⁰С уничтожаются вегетативные формы микроорганизмов в пищевых продуктах (молоко, соки, вино, пиво и др.)

ВОЗДУШНЫЙ СТЕРИЛИЗАТОР



Принцип работы автоклава



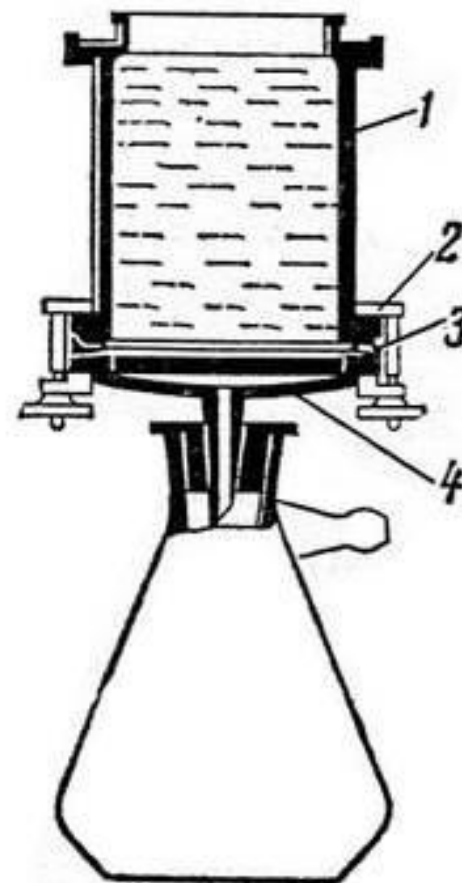
Физическая стерилизация

(лучевая стерилизация)

- *Используется для стерилизации термолабильных материалов.*
- *Применение **УФ-излучения** для стерилизации ограничено его низкой проникаемостью и высокой поглотительной активностью воды и стекла*
- ***Рентгеновское и гамма излучение.** Работа с ними требует строго соблюдения правил безопасности. Применяют для стерилизации бактериологических препаратов (сывороток, вакцин и пр.) одноразовых шприцев, чашек Петри, шовных материалов и пр.*
- ***Микроволновое излучение.** Основано на эффекте быстрого повышения температуры, применяют для повторной стерилизации длительно хранящихся сред.*

Механическая стерилизация

- **Стерилизацию через бактериальные фильтры** применяют в тех случаях, когда стерилизуемые предметы изменяются при нагревании.
- В микробиологической практике используют **асбестовые фильтры Зейтца**, **мембранные фильтры** из нитроцеллюлозы, изготовленные из каолина с примесью песка и кварца **фильтры (свечи) Шамберлана** и **фильтры** из инфузорной земли **Беркефельда**.
- Методом фильтрования стерилизуют питательные среды, содержащие белок, сыворотки, некоторые антибиотики, а также отделяют бактерии от вирусов, фагов и экзотоксинов



Химическая стерилизация

- *Химическая стерилизация проводится с применением губительных для микроорганизмов антимикробных препаратов-дезинфектантов и антисептиков, а также антибиотиков с избирательным действием и синтетических противомикробных препаратов*
- *С этой целью также используют токсичные газы, н-р, оксид этилена.*

Контроль за качеством стерилизации

- **Химический контроль** – используются вещества с известной температурой плавления (сера - 119°C , бензойная кислота – $120\text{-}122^{\circ}\text{C}$, бензонафтол - 110°C , манноза и карбамид- $132\text{-}133^{\circ}\text{C}$) и индикаторные бумажки температурного режима. Оценка контроля осуществляется на основании изменений происходящих с указанными веществами, которые помещают в автоклав вместе со стерилизуемым материалом.
- **Биологический контроль** – проводится с применением биотестов (бумажные полоски с нанесенными на поверхность споровыми бактериями устойчивыми к температуре). Оценка контроля осуществляется на основании гибели споровых бактерий на поверхности бумажек, которые помещают в автоклав вместе со стерилизуемым материалом.

Влияние химических факторов на микроорганизмы

- *Дезинфекция (обеззараживание) это уничтожение патогенных микроорганизмов в различных объектах окружающей среды. Химические вещества, используемые для уничтожения микроорганизмов называются дезинфицирующими.*
- *Вещества, характеризующиеся выраженным антимикробным эффектом, но не обладающие токсичностью для макроорганизма, называются **антисептическими средствами** и применяются для гибели или подавления роста микробов, контактирующих с поверхностью кожи, слизистых оболочек и ран.*
- ***Антисептика** - комплекс мер, направленных на уничтожение микроорганизмов в ране, целом организме или на объектах внешней среды, с применением различных обеззараживающих химических веществ.*
- *Антисептика включает комплекс мероприятий, направленных на уничтожение микробов в патологическом очаге, ране или другом объекте.*
- ***Асептика** –комплекс профилактических мероприятий, препятствующих микробному загрязнению различных объектов (раны, операционного поля, кожи и слизистых и т. д.).*

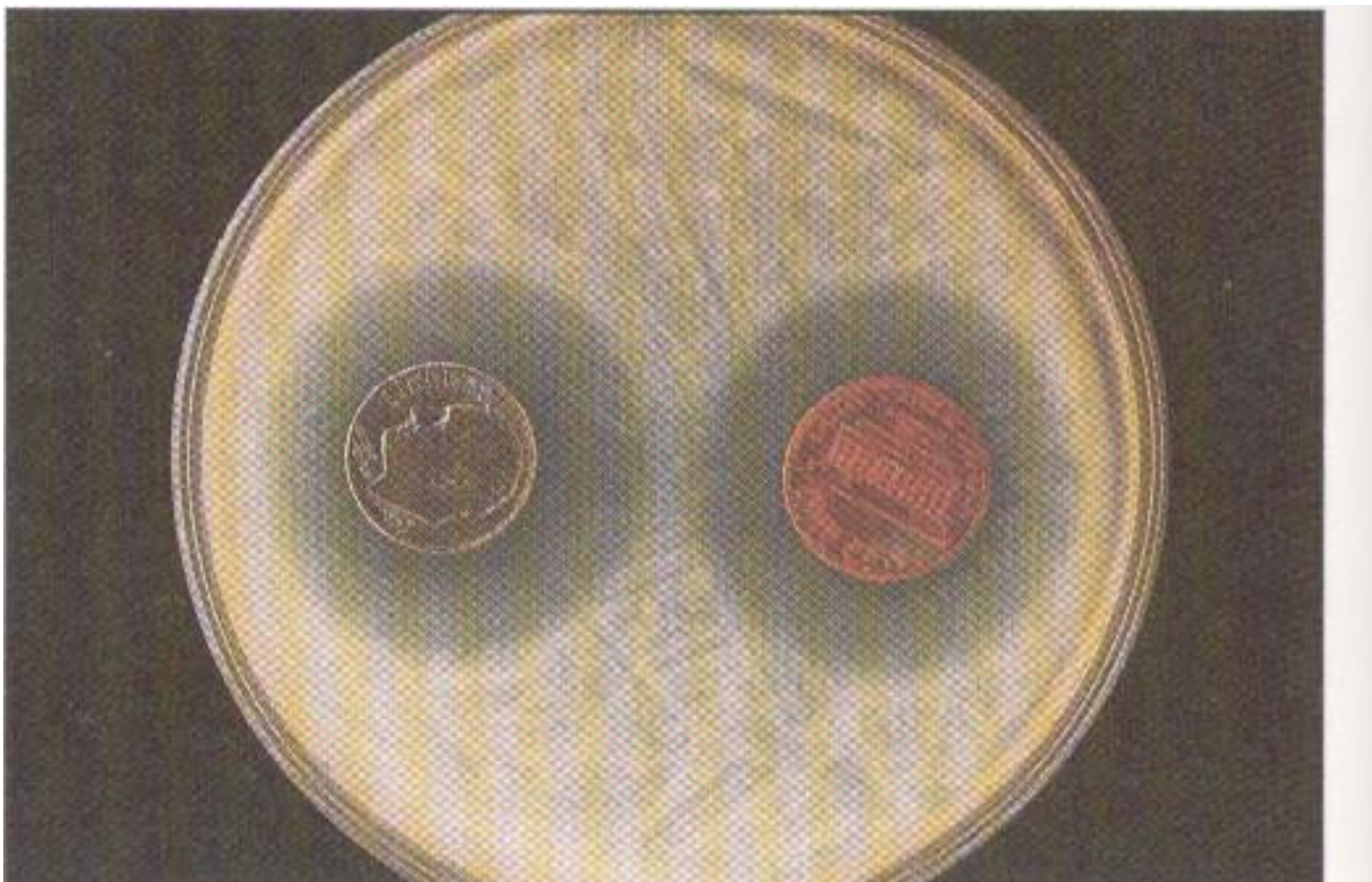
Aseptika i antiseptika



Дезинфектанты и антисептики

- **Поверхностно-активные вещества** -жирные кислоты, мыла и прочие детергенты (декамин, хлоргексидин и пр.)
- **Фенол, крезол и их производные** (трикрезол, фенол-резорцин, фенилсалицилат)
- **Окислители** (перекись водорода, перманганат калия, и др)
- **Галогены** – препараты йода (спиртовой раствор йода, раствор Люголя, йодоформ, йодиол), препараты хлора (хлорная известь, хлорамин, пантоцид)
- **Спирты** (этиловый и пр.)
- **Кислоты, и их соли** (борная, салициловая, бензойная, уксусная кислоты) и **щелочи** (соли аммония, квасцы);
- **Альдегиды** (формальдегид - применяют в виде 40% раствора (формалин), гексаметилентетрамин– уротропин, глутаральдегид и пр.)
- **Соли тяжелых металлов** (ртуть, свинец, цинк, золото и др.)
- **Красители** (бриллиантовый зеленый, риванол, этакридина лактат, метиленовый синий и др.)

Антимикробная активность солей тяжелых металлов (серебро и медь)



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*

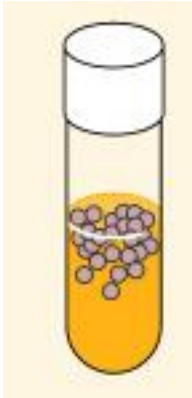
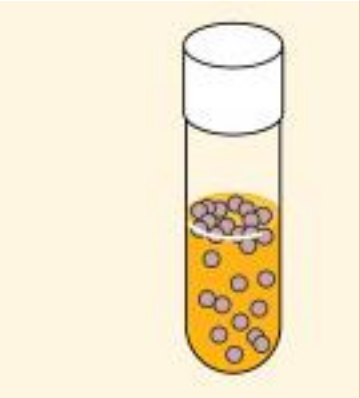
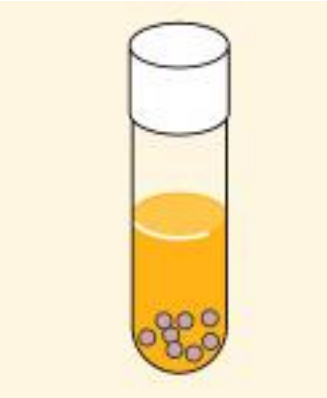
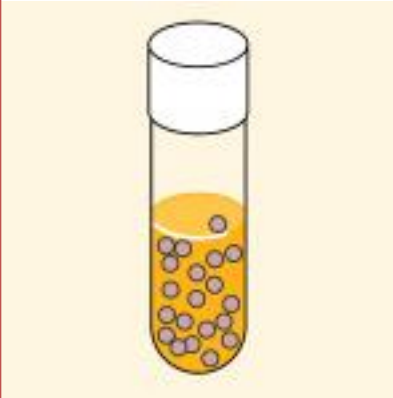
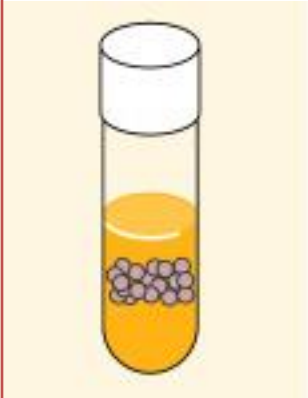
Облигатные анаэробы

- *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

Характер роста микроорганизмов с различным типом дыхания на питательном бульоне

Облигатные аэробы	Факультативные анаэробы	Облигатные анаэробы	Аэротолерантные анаэробы	Микроаэрофилы
				

Рост и размножение микроорганизмов

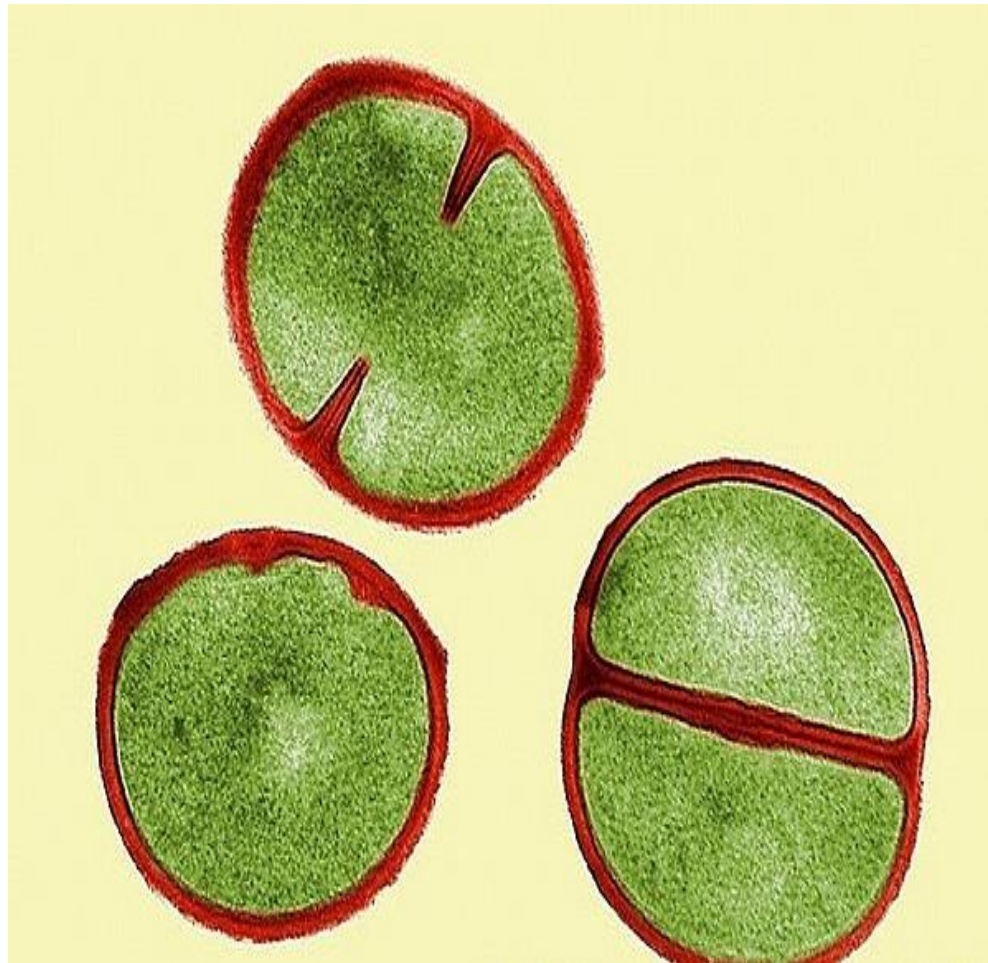
Рост – это согласованное увеличение всех компонентов клетки.

Размножение большинства бактерий происходит путем простого – бинарного деления.

Впячивание мезосом приводит к образованию поперечных перегородок.

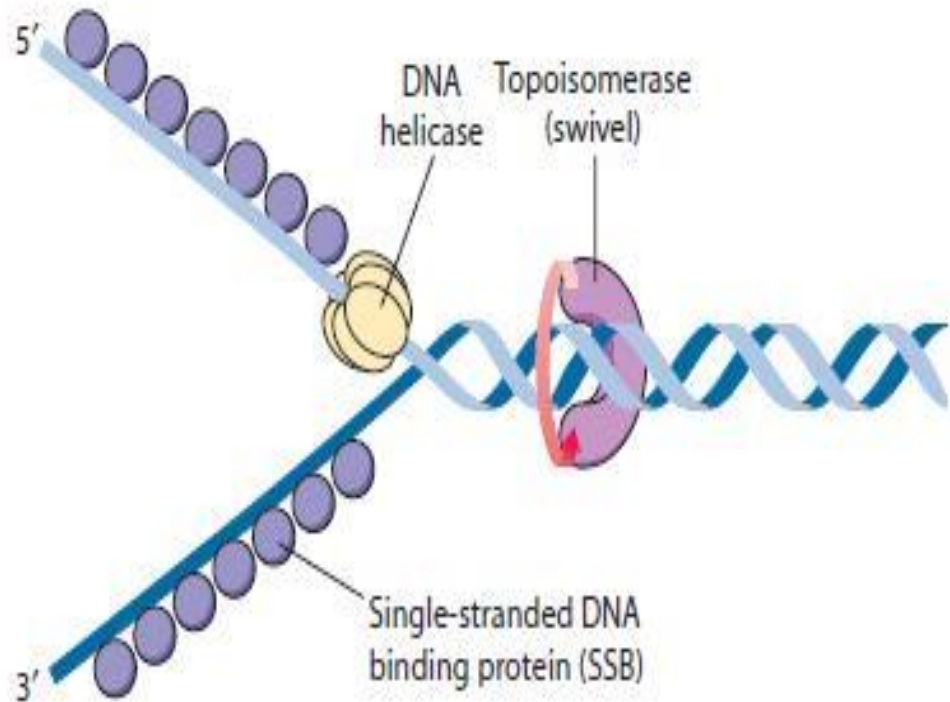
Палочковидные бактерии размножаются поперечным путем, кокки - делением в разных плоскостях.

Дочерние клетки одинакового размера называются изоморфными, клетки разного размера – гетероморфными.



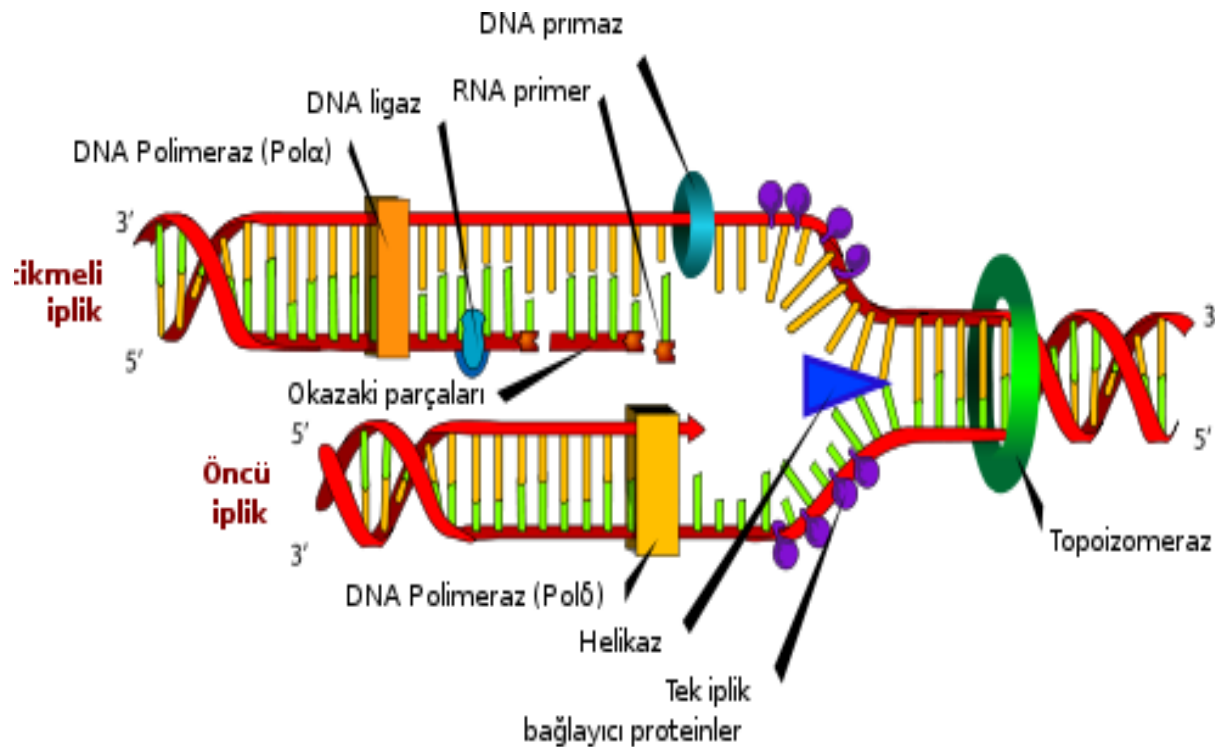
Деление бактериальной клетки

Размножение бактерий



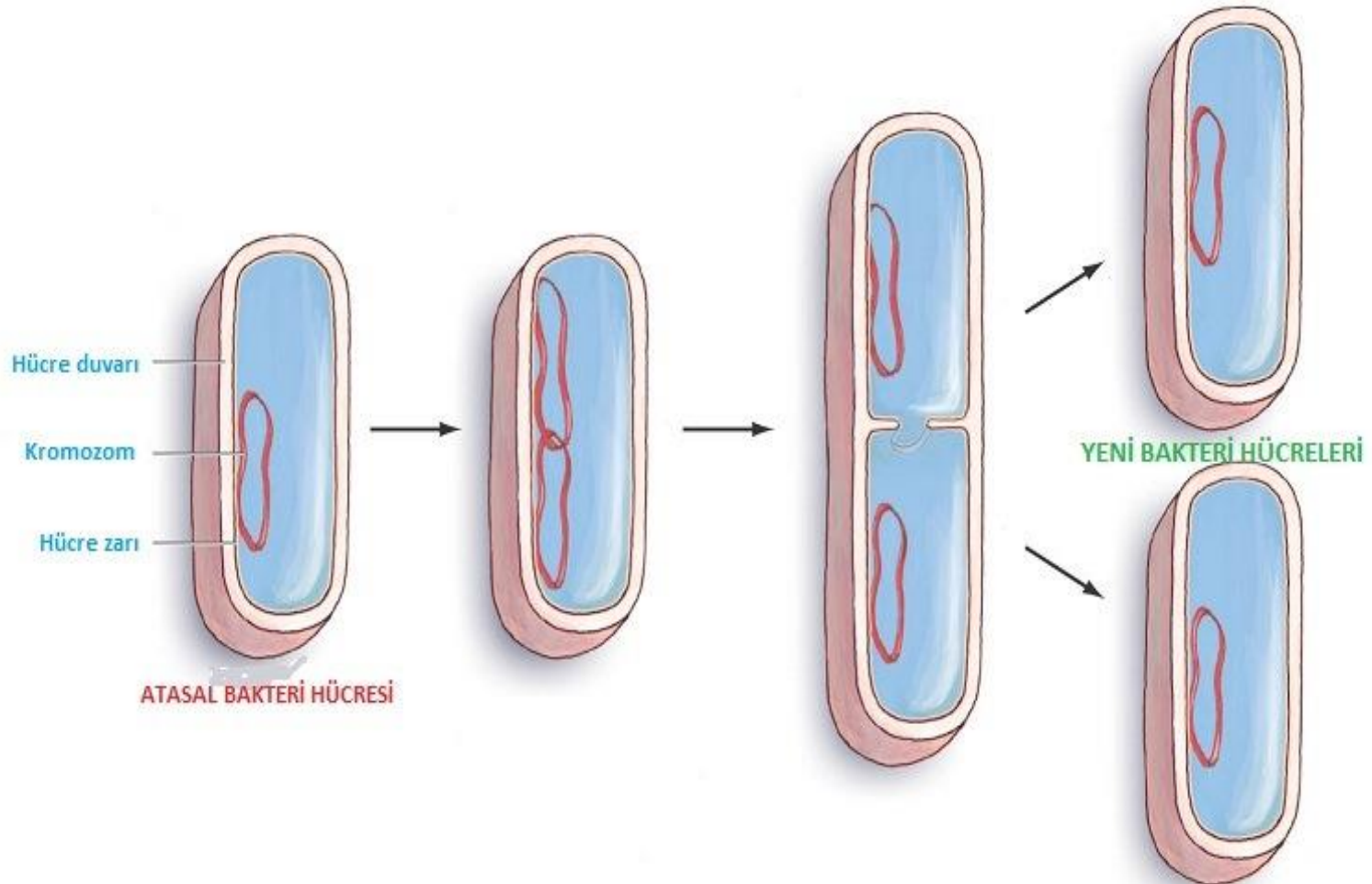
Репликация ДНК начинается с разделения цепей ферментом хеликаза.

Размножение бактерий



Синтез новых цепей ДНК осуществляется по принципу комплементарности с участием фермента ДНК-полимеразы

Размножение бактерий



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.

При размножении бактерий путем бинарного деления их численность увеличивается в геометрической прогрессии

Generation Number	Number of Cells	Log₁₀ of Number of Cells
0	1	0
5 (2^5) =	32	1.51
10 (2^{10}) =	1,024	3.01
15 (2^{15}) =	32,768	4.52
16 (2^{16}) =	65,536	4.82
17 (2^{17}) =	131,072	5.12
18 (2^{18}) =	262,144	5.42
19 (2^{19}) =	524,288	5.72
20 (2^{20}) =	1,048,576	6.02

(b)

Размножение бактерий

- Поскольку деление бактериальной клетки приводит к образованию двух особей, их число растет в геометрической прогрессии: $2^0 - 2^1 - 2^2 - 2^3 \dots 2^n$, таким образом после деления клетки n -ое количество раз, количество вновь образовавшихся клеток будет составлять 2^n
- 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.
- Графическое изображение этих фаз называется ***кривой роста***

Фазы размножения

- ◎ **Начальная фаза** – охватывает промежуток времени между посевом бактерий и началом размножения. В этой фазе усиливаются процессы обмена, увеличиваются размеры клеток, и они начинают 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.

Кривая роста

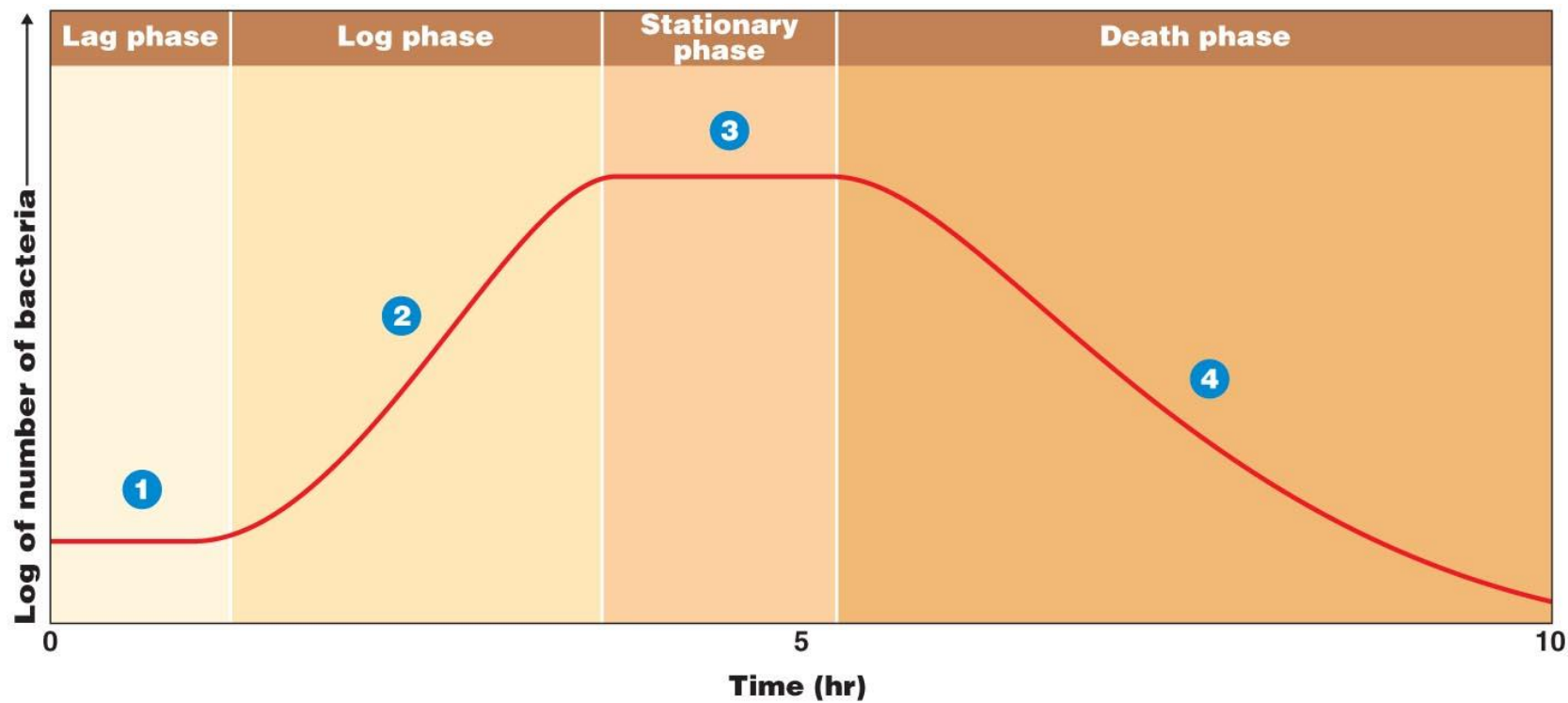


Figure 6.15

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 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

Ламинарный бокс

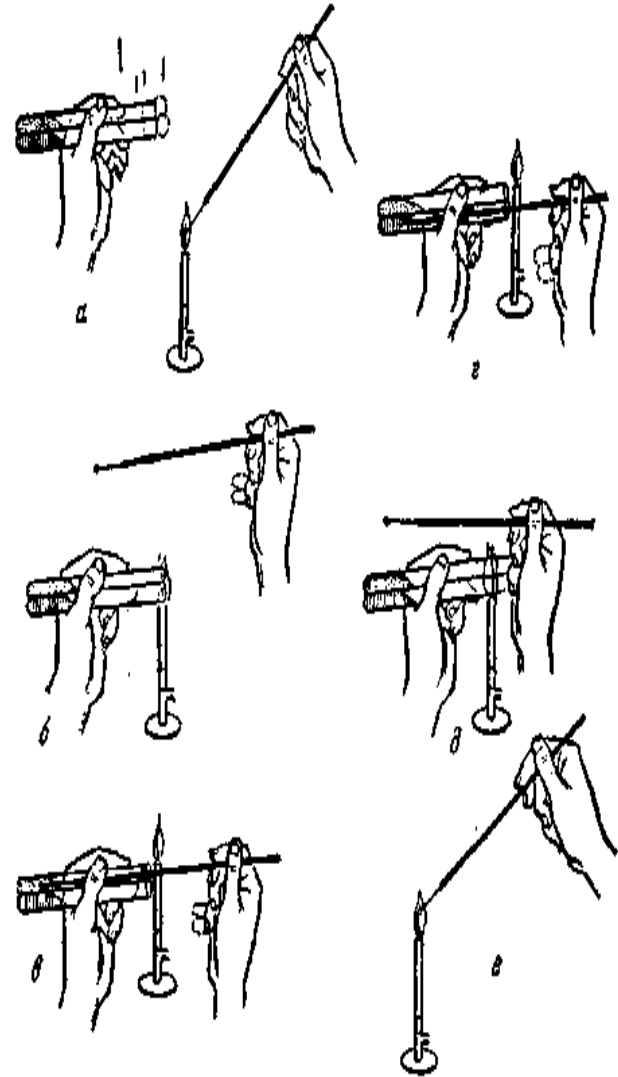


Инокуляция в питательные среды (посев)

- 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.***

Посев на поверхность скошенного агара в пробирке

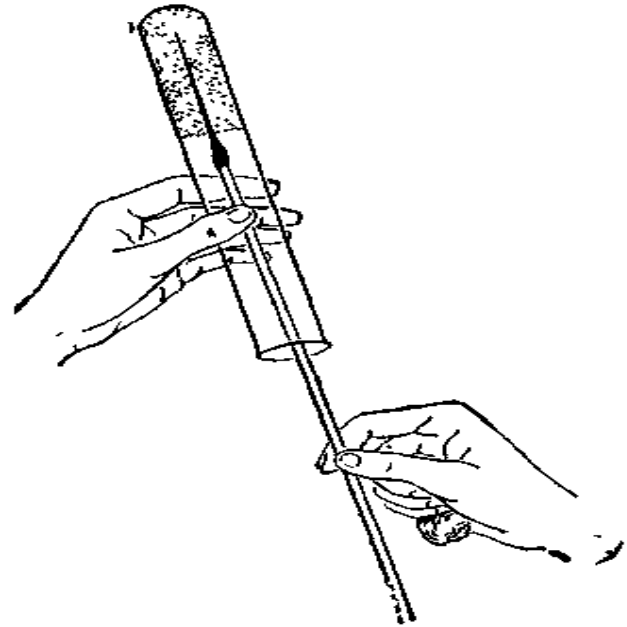
При пересеве бактерий на стерильный скошенный агар, обе пробирки берут в левую руку, и держат так, чтобы скошенная часть агара находилась на поверхности и посев осуществлялся под контролем глаза. Петлю находящуюся в правой руке стерилизуют в пламени и дают ей остыть. Пробки из пробирок вынимают правой 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.

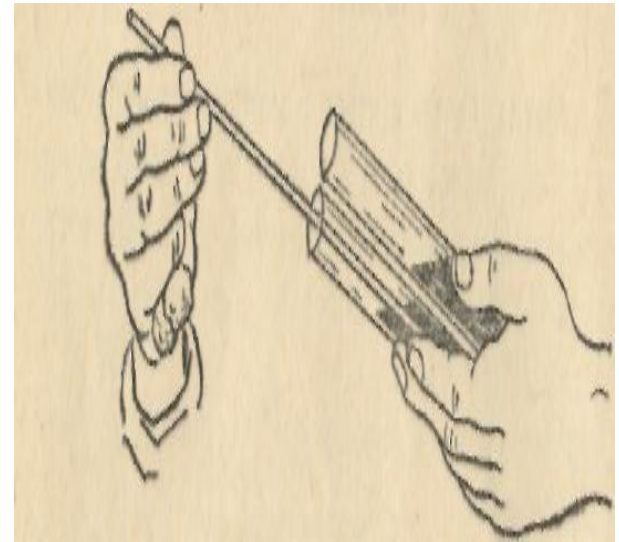
Бактериологическую иглу прожигают в пламени, охлаждают, забирают ею инокулируемый материал и вкалывают с находящимся на ней материалом до дна пробирки. Пробку фламбируют в огне, закрывают пробирку и помещают в термостат.



Инокуляция в питательный бульон

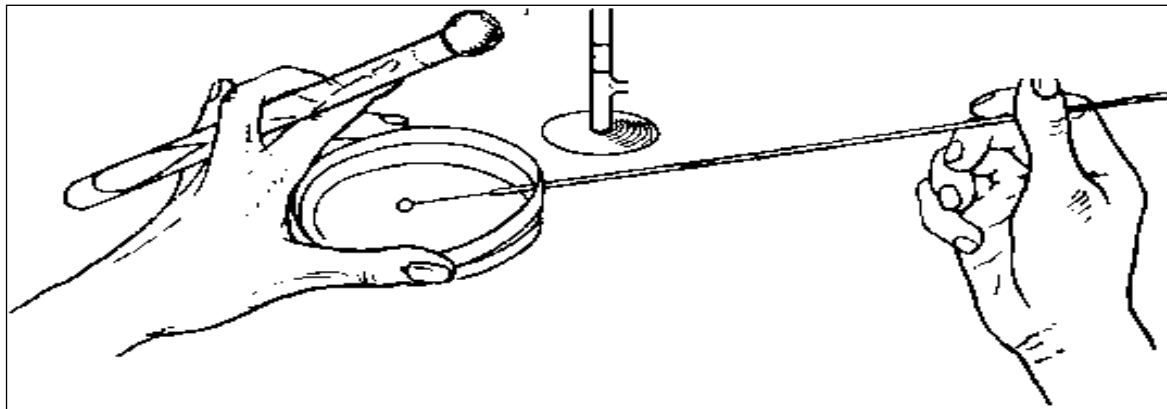
Петлей или пипеткой отбирают материал из пробирки с выросшей культурой и переносят в пробирку со **стерильным жидким бульоном**. При этом петлю слегка погружают в пробирку с питательным бульоном и растирают посевной материал по стенке пробирки, после чего его смывают средой.

Выполненные посевы помещают в термостат в вертикальном положении.

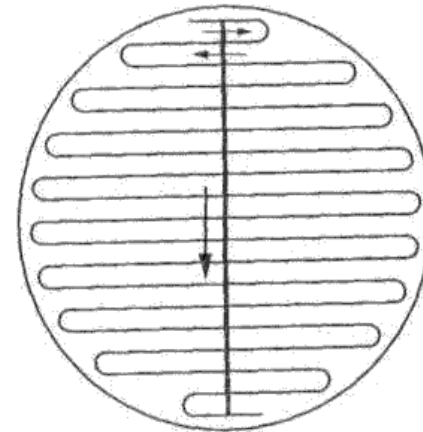
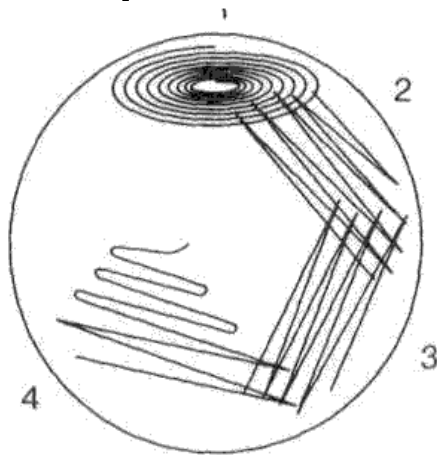


Инокуляция петлей на поверхность питательной среды в чашке Петри

- 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.

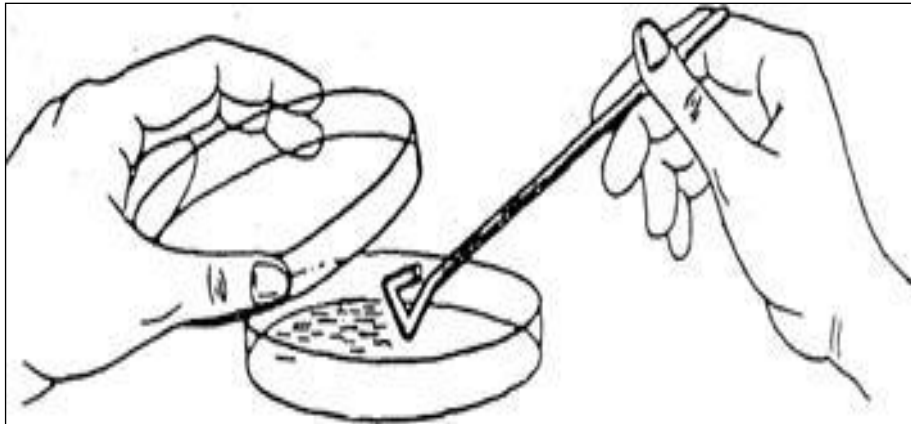


- В зависимости от цели культивирования возможны различные варианты инокуляции на поверхность плотной питательной среды
- Н-р, для выделения чистой культуры используется метод инокуляции в 4 сектора на чашку Петри
- Для оценки бактериурии (определения количества бактерий) при бактериологическом исследовании 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 в 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* - $6-20^{\circ}\text{C}$, *мезофильных* - $34-37^{\circ}\text{C}$. *Термофильные бактерии* способны размножаться при более высоких температурах, даже при $70-75^{\circ}\text{C}$.
- ◎ Большинство патогенных для человека бактерий являются *мезофилами*.

Время культивирования

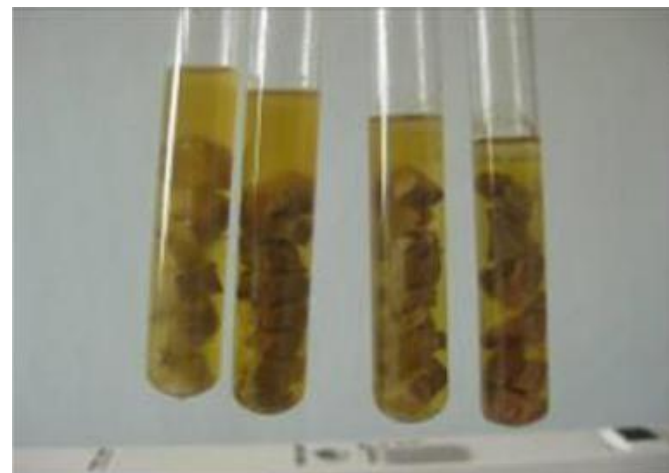
- ◎ **Время культивирования** зависит от вида микроорганизмов. Большинство бактерий культивируют до получения видимого роста.
- ◎ Для культивирования большинства бактерий в оптимальных условиях достаточно 18-24 ч, тогда как для ряда бактерий требуются более длительные сроки культивирования.
- ◎ Н-р, 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 CO_2 -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 глюкозой, экстрактивными продуктами печени животных и содержащего кусочки вываренной печени в качестве поглотителя свободного кислорода.



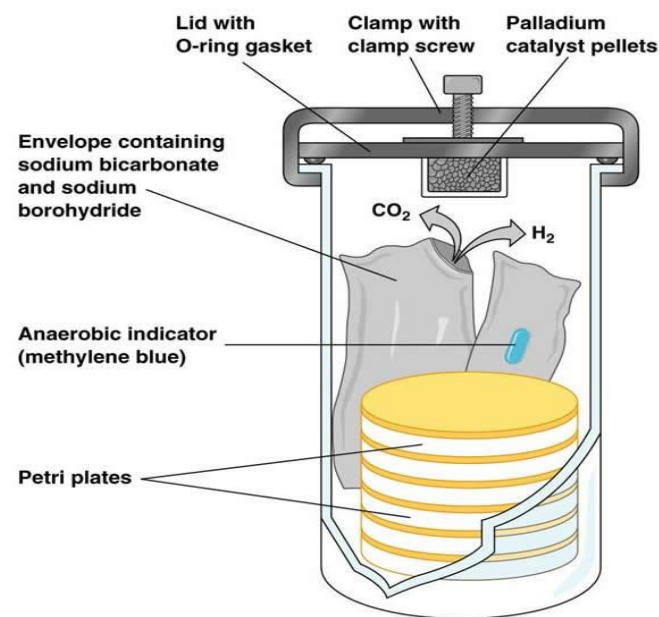
Культивирование анаэробов

Для культивирования
анаэробных бактерий
используют
анаэроостаты

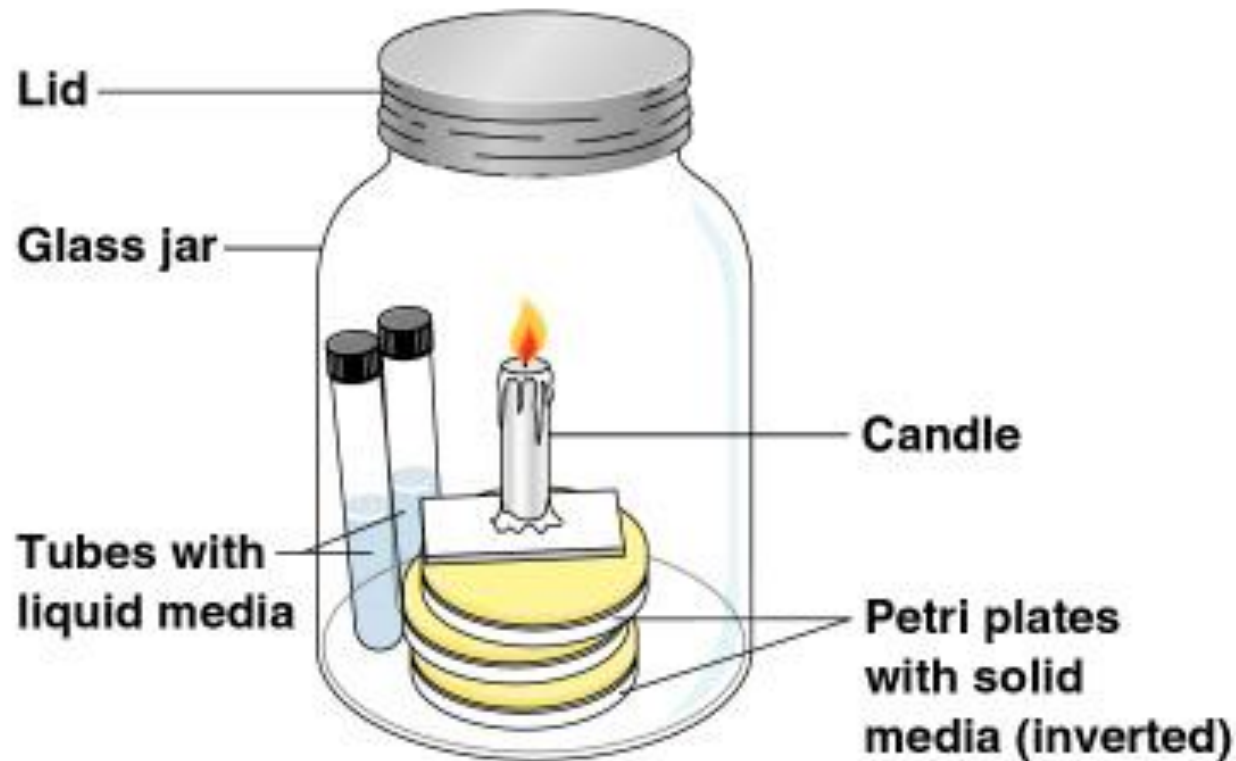


Культивирование анаэробов

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.



Культивирование микроаэрофилов и капнофилов в эксикаторе с горящей свечой



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**.

Методы получения чистой культуры аэробных бактерий

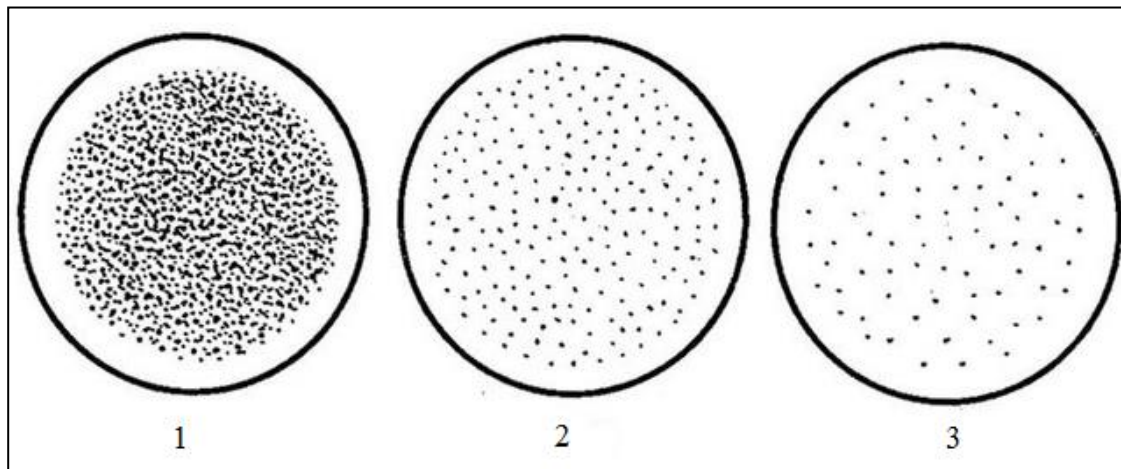
- Для получения чистой культуры бактерий можно использовать различные методы
- Наиболее часто используются методы, основанные на механическом разобщении микроорганизмов на поверхности или внутри питательной среды. Принцип этих методов основан на механическом разделении исследуемого материала в глубине 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 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

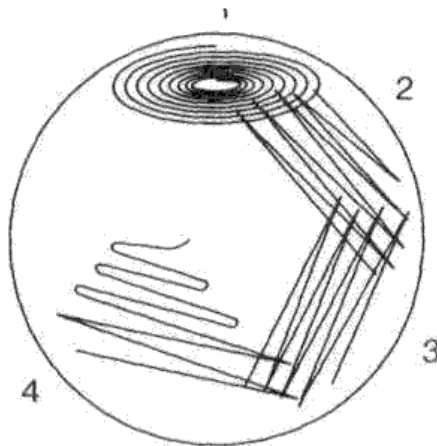


Метод инокуляции в секторы

- В настоящее время с целью получения чистой культуры применяется метод посева на 4 сектора. Исследуемый материал вносят 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

Метод инокуляции в секторы

- 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 Цейслера.** 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

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

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 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**

Получение чистой культуры

этап II

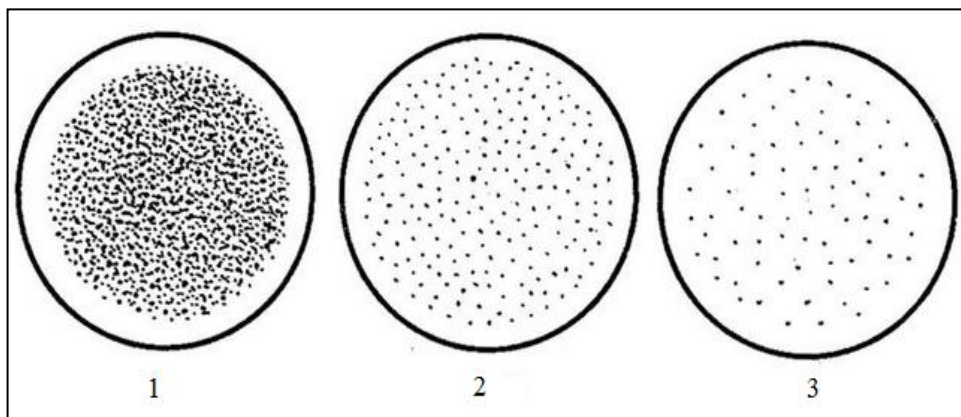
- II этап получения чистой культуры начинается с изучения культуральных свойств выросших на среде бактерий
- На II день чашки Петри достают из термостата и приступают к **изучению культуральных свойств** бактерий.
- Наблюдается последовательное разобщение микроорганизмов на средах в чашках, в которые 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**

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*



www.shutterstock.com · 1622283991

Морфология колоний

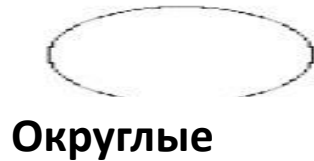
- При изучении морфологии колонии учитываются следующие признаки:

-Размеры

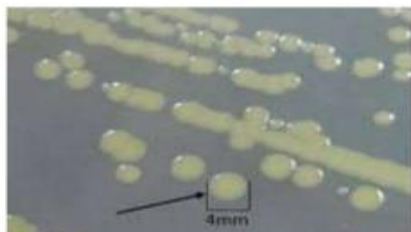
- Форма
- Цвет
- Структура
- Высота
- Края

Колонии различной формы на поверхности агара

Формы колоний



Формы колоний



Округлые



Точечные



Ризоидные

Края колоний



Плоские



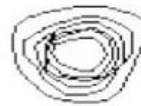
Волнистые



Изрезанные



Нитевидные

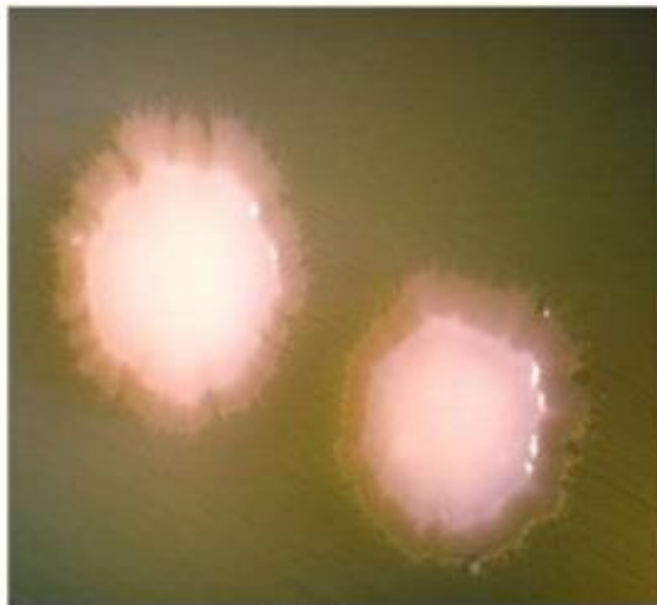


Закрученные

Края колоний



Волнистые



Нитевидные

Поверхность колоний на питательной среде



плоская



приподня
тая



грибовид
ная



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



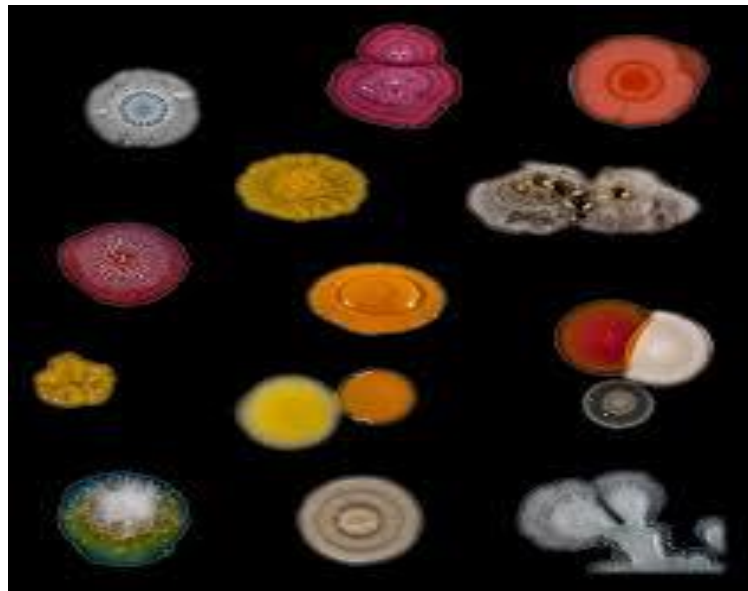
Вязкие



Слизистые

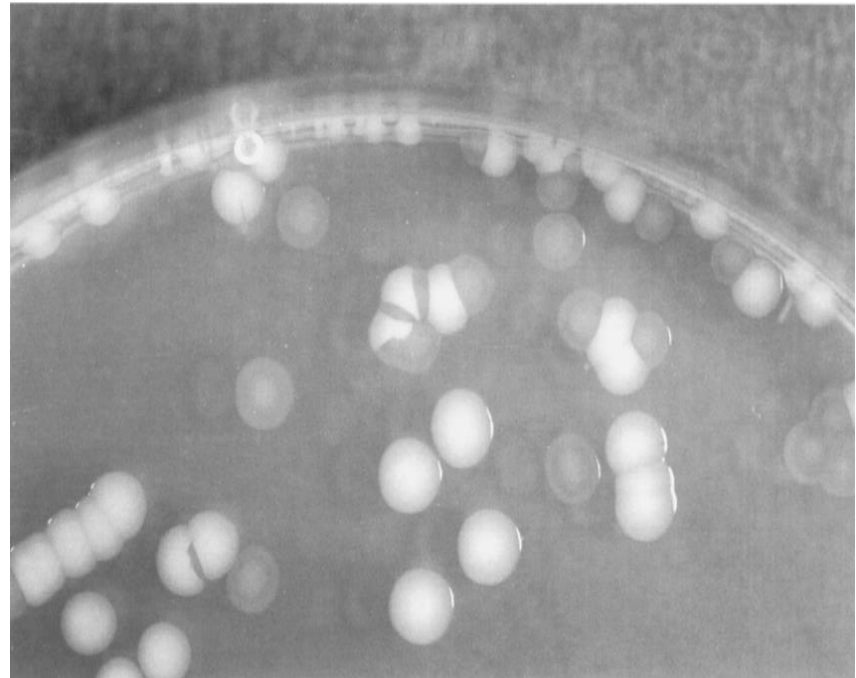
Цвет колоний

- В процессе роста на питательных средах некоторые бактерии продуцируют пигменты

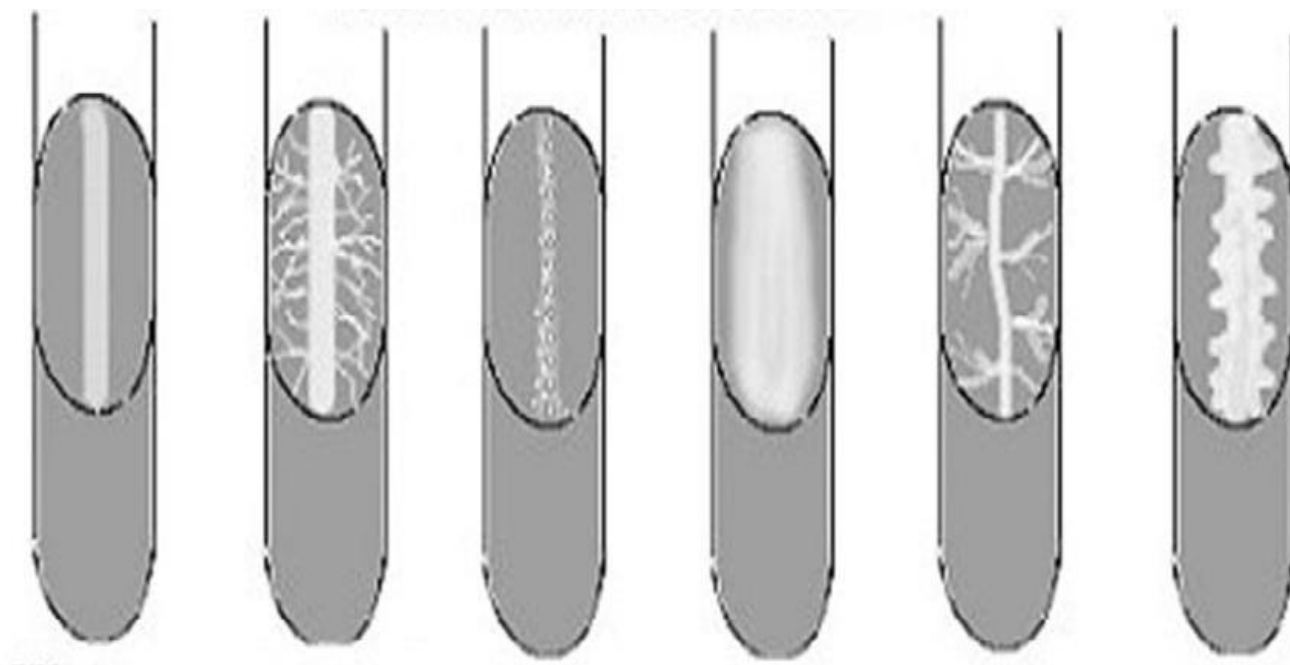


Прозрачность колоний

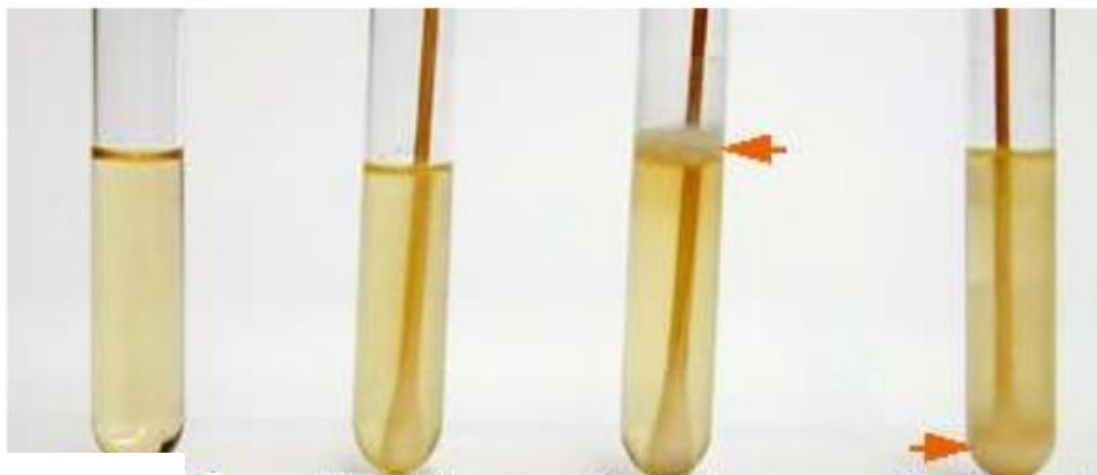
- По степени прозрачности различают
 - прозрачные
 - полупрозрачные
 - мутные
- КОЛОНИИ**



Рост культуры на скошенном агаре



Культуральные признаки бактерий на жидких питательных средах



Контроль

**Диффузный
рост**

**Поверхностный
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 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= 5см

Если в одном квадрате будет 10, то:

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

Определение общего количества клеток в 1 мл жидкости

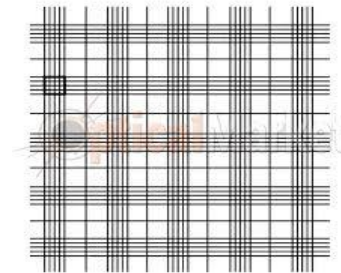
1. Подсчет клеток под
микроскопом в «счетной камере»
(Горяева, Тома—Цейса,
Нейбауэра)

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

Вирусы, риккетсии и хламидии – как облигатные внутриклеточные паразиты

- Вирусы, риккетсии и хламидии являющиеся облигатными внутриклеточными паразитами размножаются только внутри клетки хозяина и не культивируются на искусственных питательных средах
- **Размножение риккетсий** происходит путем бинарного деления внутри клетки хозяина (в ядре и цитоплазме)
- **Размножение хламидий** происходит внутри клетки хозяина и характеризуется уникальным циклом развития
- **Размножение вирусов** внутри клетки хозяина происходит путем репродукции.