

**Культивирование бактерий.
Выделение чистых культур.**

НЕКОТОРЫЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

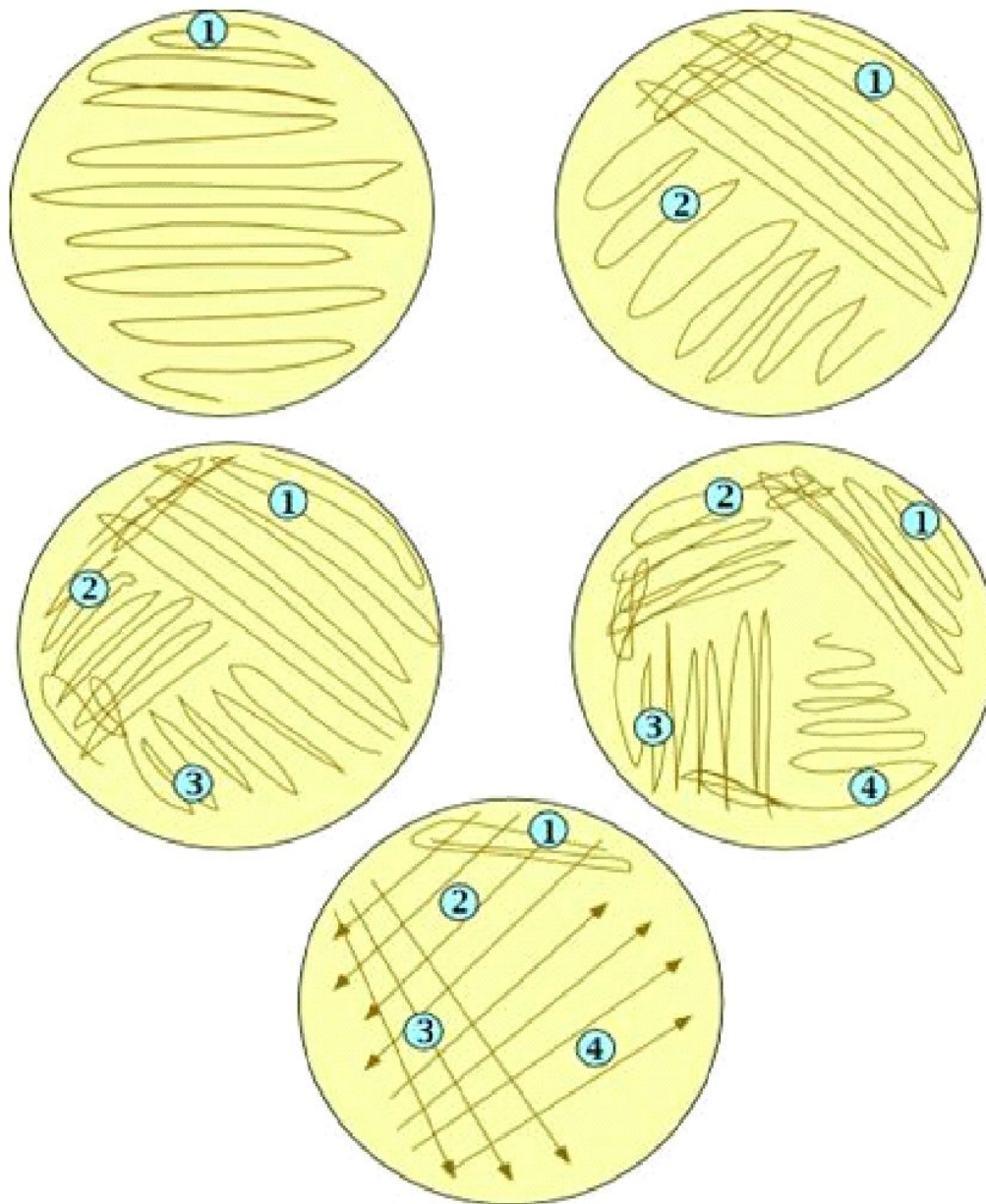
Чистой культурой называют такую культуру, которая содержит микроорганизмы **одного вида**. Выделение чистых культур бактерий - обязательный этап всякого бактериологического исследования. Чистая культура необходима для изучения морфологических, культуральных, биохимических и антигенных свойств, по совокупности которых определяется видовая принадлежность исследуемого микроорганизма.

Метод Коха («пластинчатые разводки») - последовательное разведение исследуемого материала в расплавленном агаре (температура 48-50 ° C), с последующим разливом в чашки Петри, где агар застывает. Высевы делают, как правило, из трех-четырех последних разведений, где бактерий становится мало и, в дальнейшем, при росте на чашках Петри появляются изолированные колонии, образующиеся из одной исходной материнской клетки. Из изолированных колоний в глубине агара получают чистую культуру бактерий пересевом на свежие среды.

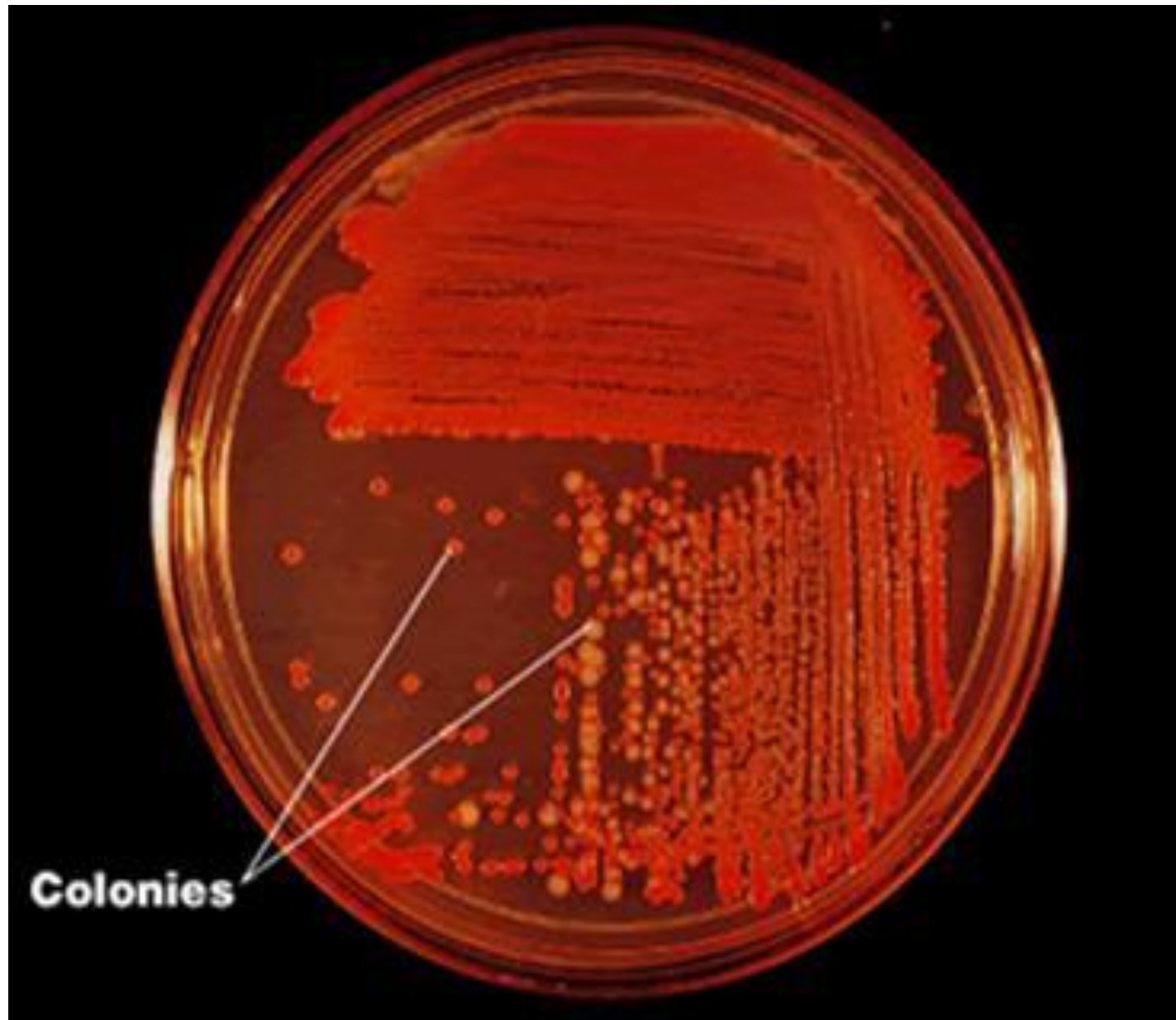
Посев истощающим штрихом

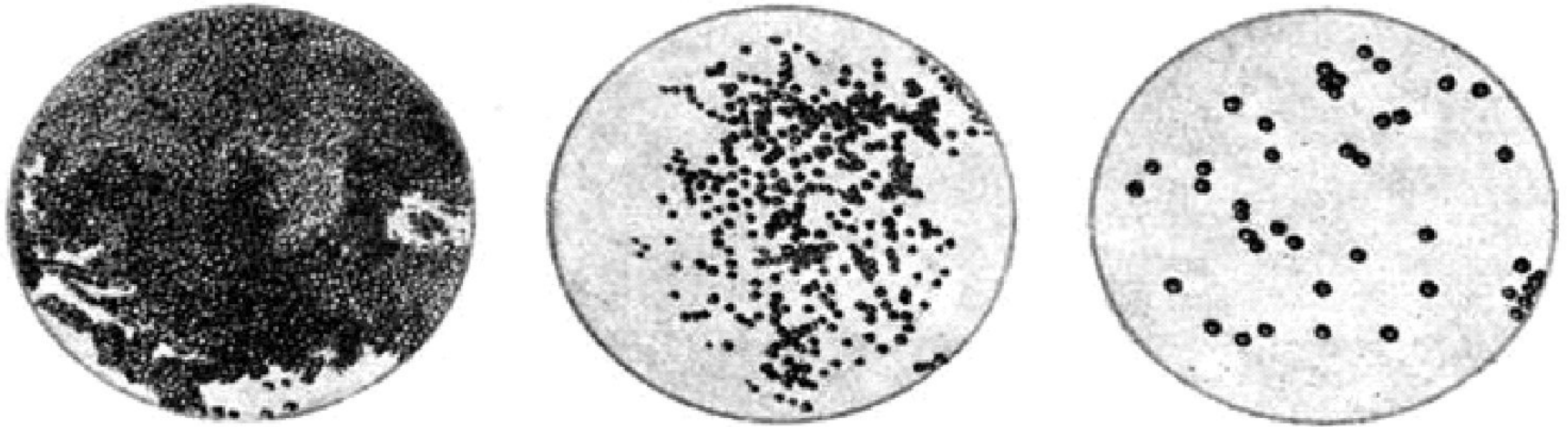
Область применения:
для выделения чистых культур из материалов, содержащих обильную смешанную микрофлору.

Материал отбирают петлей и на поверхности плотной среды проводят штрихи в таком порядке, как указано на рисунке. Перед каждым новым нанесением петлю стерилизуют в пламени горелки.



Посев истощающим штрихом:





Колонии по методу Дригальского

Исследуемый материал разводят в пробирке стерильным физиологическим раствором или бульоном.

Одну каплю материала вносят в первую чашку и стерильным стеклянным шпателем распределяют по поверхности среды.

Затем этим же шпателем (не прожигая его в пламени горелки) делают такой же посев во второй и третьей чашках. С каждым посевом бактерий на шпателе остается все меньше и меньше, и при посеве на третью чашку бактерии будут распределяться по поверхности питательной среды отдельно друг от друга.

- **Посев на элективные среды:** в ряде случаев ЧИСТУЮ КУЛЬТУРУ можно получить, подавив размножение части микробов факторами, к которым выделяемый вид устойчив. С этой целью используют антимикробные препараты, химические вещества и бактериофаги. В питательную среду вносят соответствующее вещество или фаг в строго определенной концентрации, препятствующей размножению сопутствующих бактерий, но не оказывающей выраженного ингибирующего действия на исследуемый микроорганизм.
- **Обработка исследуемого материала кислотой или щелочью:** например, микобактерии туберкулеза безразличны к действию концентрированных растворов минеральных кислот, в отличие от остальных микробов, содержащихся в мокроте.

Прогревание исследуемого материала при 80 °С в течение 20 мин:

для выделения спорообразующих бактерий и уничтожения неспорообразующих.

Споры бактерий при этом сохраняются и при посеве прогретого материала на питательную среду прорастают. Если материал содержал только один вид спорообразующих бактерий, таким образом можно получить чистую культуру. Если материал содержал споры разных бактерий, дальнейшее выделение осуществляют стандартными методами.

Метод мембранной фильтрации:

Жидкий образец или раствор образца в стерильной среде фильтруют в асептических условиях через мембранный фильтр с диаметром пор 0.45-0.8 м. Содержащиеся в образце микроорганизмы задерживаются на фильтре, после чего этот фильтр помещают в чашку Петри на питательную среду (которая пропитывает фильтр снизу и поступает к микробам) и инкубируют при определенной температуре. Удержанные на фильтре микроорганизмы вырастают в колонии, хорошо видимые глазом.

Достоинства метода мембранной фильтрации:

- точная количественная оценка микробной загрязненности образца,
- возможность анализировать образцы, содержащие антибиотики или бактериостатические компоненты,
- возможность анализировать образцы большого объема.

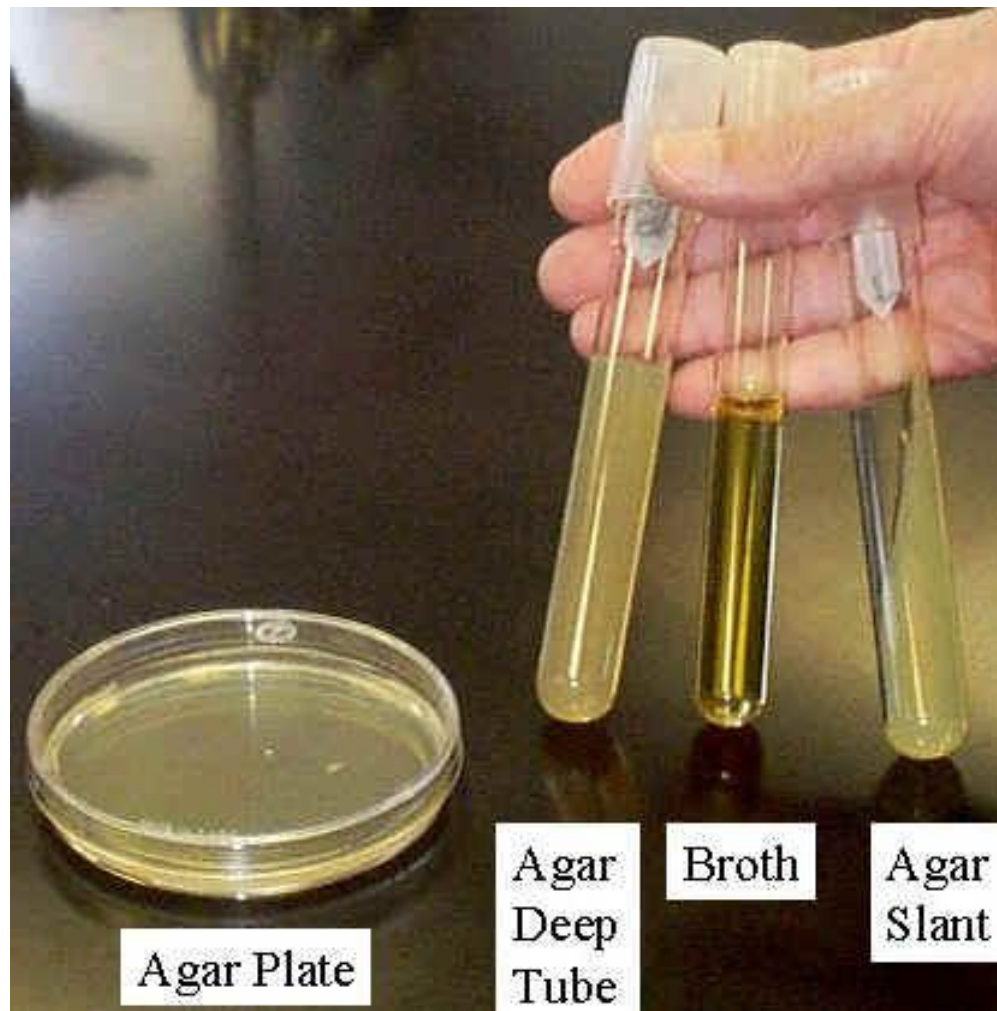
Заражение лабораторных животных:

Отдельные животные проявляют высокую чувствительность к разным микроорганизмам. Например, при любом способе введения *Streptococcus pneumoniae* белым мышам у них развивается генерализованная пневмококковая инфекция. Аналогичная картина наблюдается при заражении гвинейских свиней возбудителями туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis*).

Достоинство метода: использование даже незначительном исходном содержании возбудителя в исследуемом образце.

Метод Шукевича

- применяется для получения чистой культуры протей и других микроорганизмов, обладающих «ползущим» ростом.
- Посев исследуемого материала производят в конденсационную воду у основания скошенного агара.
- Подвижные микробы (протей) способны подниматься вверх по скошенному агару, неподвижные формы остаются расти внизу на месте посева. Пересекая верхние края культуры, можно получить чистую культуру.



Метод Вейнберга: для выделения чистых культур облигатных анаэробов. Разведения исследуемого материала проводят в расплавленной и охлажденной до 45-50 ° С агаризированной питательной среде. Делают 6-10 последовательных разведений, затем среду в пробирках быстро охлаждают и заливают поверхность слоем смеси парафина и вазелинового масла, чтобы помешать проникновению воздуха в толщу питательной среды.

Метод Хангейта - когда хотят получить изолированные колонии бактерий с особенно высокой чувствительностью к кислороду (строгие анаэробы) используют метод вращающихся пробирок Хангейта. Для этого расплавленную агаризированную среду засевают бактериями при постоянном токе через пробирку инертного газа, освобожденного от примеси кислорода. Затем пробирку закрывают резиновой пробкой и помещают горизонтально в зажим, вращающий пробирку, среда при этом равномерно распределяется по стенкам пробирки и застывает тонким слоем. Применение тонкого слоя в пробирке, заполненной газовой смесью, позволяет получить изолированные колонии, хорошо видимые невооруженным глазом.

Выделение отдельных клеток с помощью **микроманипулятора**.

Микроманипулятор - прибор, позволяющий с помощью специальной микропипетки или микропетли извлекать одну клетку из суспензии. Эту операцию контролируют под микроскопом.

Культуральные свойства бактерий

К культуральным или макроморфологическим свойствам относятся характерные особенности роста микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах.

На поверхности плотных питательных сред в зависимости от посева микроорганизмы могут расти в виде колоний, штриха или сплошного газона.

При получении микробного газона **характер роста бактерий** может быть сухим, влажным, "ползучим", складчатым, пигментированным.

Рост микробов на плотной питательной среде.

Для характеристики колоний используют следующие признаки:

- **1. Размер колонии.** (точечные (диаметр менее 1 мм), мелкие (диаметр 1-2 мм), средние (диаметр 2-4 мм) и крупные (диаметр 4-6 мм и более).
- **2. Форма колонии.** Бывает правильной (круглая), неправильной (амебовидная), ризоидной (корневидная, напоминающая переплетающиеся корни деревьев).
- **3. Контуры края.** Различают ровные края в виде четко выраженной линии и неровные края (фестончатый, волнистый, эрозированный или зазубренный, бахромчатый).
- **4. Рельеф колонии** Различают каплеобразные и куполообразные колонии правильной круглой формы, плоско-выпуклые колонии, конусообразные колонии, колонии с приподнятой серединой, колонии с вдавленным центром, плоские колонии.
- **5. Поверхность колонии.** Изучают при помощи лупы или под микроскопом при малом увеличении. Поверхность колонии бывает матовая или блестящая с глянцем, сухая или влажная, гладкая или шероховатая. Гладкие колонии обозначают буквой S (smooth - гладкий), шероховатые - буквой R (rough - шероховатый).
- **6. Цвет колонии.** Определяется пигментом, который продуцирует культура микробов. Преобладающее большинство патогенных бактерий пигмента не образует, вследствие чего колонии их бесцветны или молочно-мутного цвета. Пигментообразующие виды микробов дают колонии различных цветов: кремовые, желтые, золотисто-оранжевые, синие, красные, сиреневые, черные и др.
- **7. Структура колоний.** Определяется в проходящем свете при слабом увеличении микроскопа, суженной диафрагме или при несколько опущенном конденсоре. По структуре различают гиалиновые колонии, зернистые колонии, нитевидные или волокнистые колонии.
- **8. Консистенция колоний.** Исследуют посредством прикосновения или взятия из нее части материала бактериологической петлей. По характеру консистенции колонии

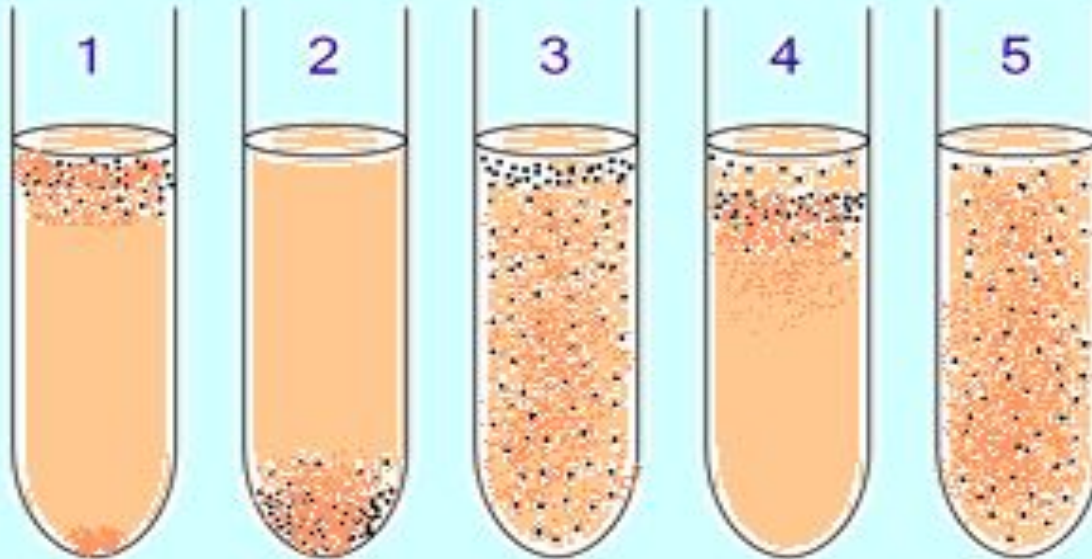


Пигментные микроорганизмы

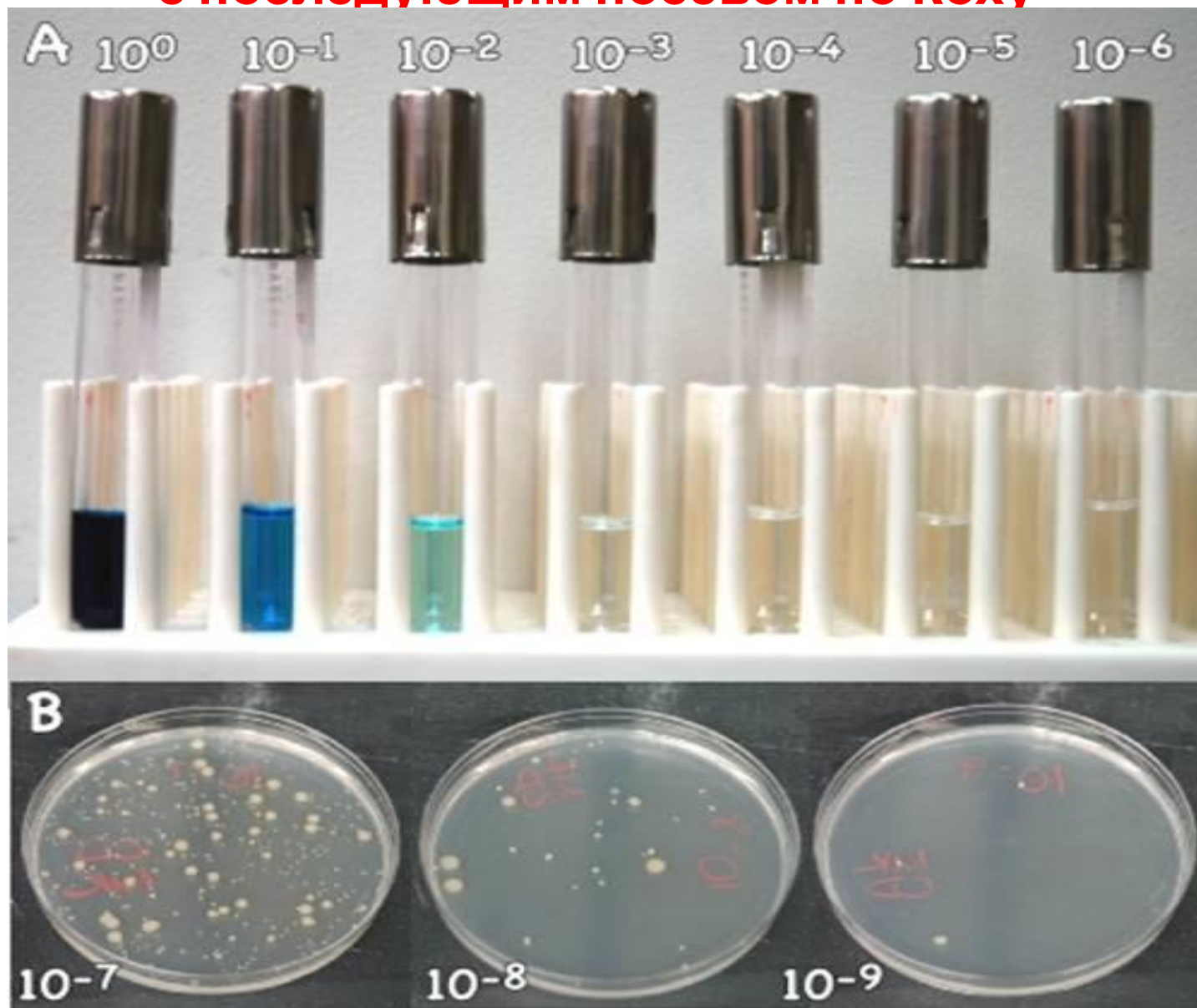
- *Некоторые виды микроорганизмов способны образовывать красящие вещества — пигменты красные, синие, желтые, фиолетовые и др. Цвет пигмента определяется по окраске колоний на плотной питательной среде, а иногда и по цвету жидкой питательной среды.*
- **Красный пигмент** вырабатывают некоторые бактерии, актиномицеты и дрожжи. Особый интерес представляет *Chromobacterium (Bact.) prodigiosum*, названная «чудесной палочкой», чаще всего растущая на крахмалистых продуктах и на стенах сырых помещений в виде кроваво-красных пятен (колоний).
- Красный пигмент образуют некоторые виды галофильных бактерий, например *Serratia salinaria* (серрация салинария) — синоним *Pseudomonas salinaria* — была впервые описана канадскими учеными (Гаррисон и Кеннеди, 1922 г.) и обстоятельно изучена советскими исследователями (Б. И. Курочкин, К. Г. Емельянчик). Микроб обнаружен в соли некоторых озер Советского Союза, а также в соли зарубежных стран. Галофильные бактерии обуславливают покраснение рапы, соленых озер, соленой рыбы, засоленных кож, шкур и кишок (Курочкин) и нередко наносят колоссальные убытки.
- **Синий пигмент** продуцируется синегнойной палочкой (*Pseudomonas pyocyanea*), которая нередко обнаруживается в загрязненных ранах и окрашивает гной в синевато-зеленый цвет.
- Микроб *Pseudomonas synchyanea* вызывает порок молока, окрашивая его в синий цвет.
- **Желтый пигмент** вырабатывается **стафилококками и сарцинами**.
- **Черный и бурый** пигменты продуцируют некоторые виды **грибов и дрожжей**.

Особенности микробного роста на жидких питательных средах.

- 1 и 4. Поверхностный рост бактерий, характеризующийся появлением на поверхности жидкой питательной среды пленки или скопления под поверхностью.
- 2. Придонный рост бактерий, характеризующийся образованием осадка на дне пробирки с жидкой питательной средой.
- 3. Пристеночный рост бактерий, выражающийся в образовании рыхлых хлопьев, прикрепленных к внутренней поверхности стенок сосуда.
- 5. Рост бактерий с равномерным помутнением среды.
- **Рост на полужидкой питательной среде** характеризуется помутнением всей толщи среды или образованием сосульки цилинд



Определение количества микроорганизмов в исследуемом материале методом серийных разведений с последующим посевом по Коху



Подсчет выросших колоний в разведениях

- Количество выросших колоний подсчитывают на каждой чашке, поместив ее вверх дном на темном фоне, пользуясь лупой с увеличением в 4 - 10 раз. Каждую подсчитанную колонию отмечают на дне чашки чернилами. При подсчете колоний рекомендуется пользоваться счетчиками.
- При большом числе колоний и равномерном их распределении дно чашки Петри делят на четыре и более одинаковых секторов, подсчитывают число колоний на двух-трех секторах (но не менее чем на 1/3 поверхности чашки), находят среднее арифметическое число колоний и умножают на общее количество секторов всей чашки. Таким образом находят общее количество колоний, выросших на одной чашке.
- **Общее количество бактерий в 1 куб. см или 1 г продукта (X) в единицах вычисляют по формуле:**

$$X = n \times 10^m,$$

где n - количество колоний, подсчитанных на чашке Петри;

- m - число десятикратных разведений.
- За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое, полученное по всем чашкам.

Рост культуры бактерий на жидкой питательной среде

Концентрация клеток в единице объема

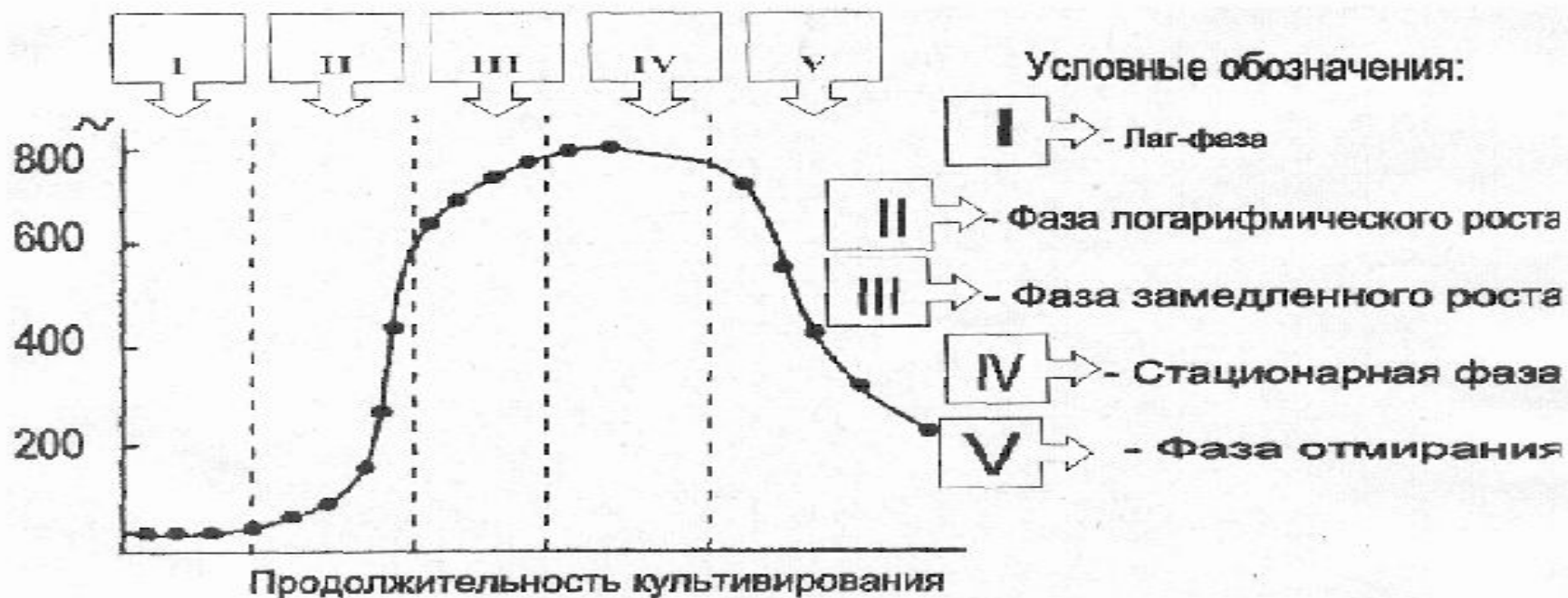


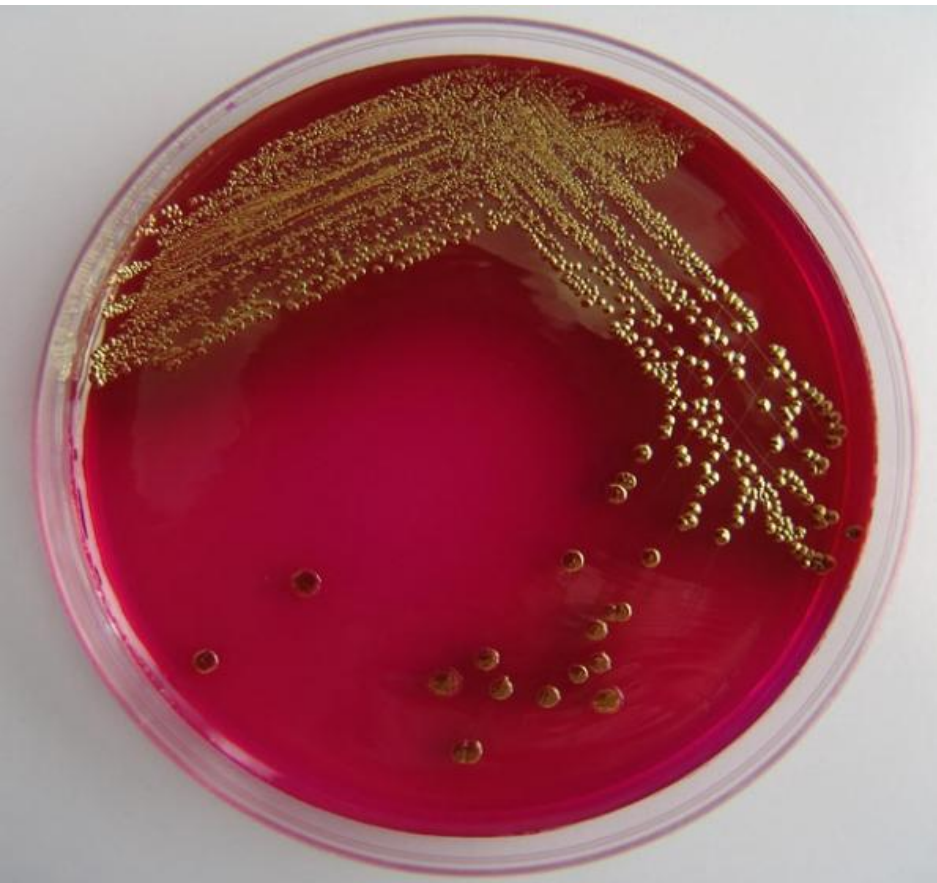
Рисунок 6- Фазы жизненного цикла микроорганизмов

Фазы роста культуры бактерий на жидкой питательной среде

- После внесения в среду бактерии адаптируются к её условиям и размножаются сравнительно медленно (лаг-фаза). Лаг-фаза роста бактерий соответствует периоду физиологического приспособления, включающего индукцию ферментов, синтез и сборку рибосом.
- Экспоненциальная фаза роста бактерий (логарифмическая) характеризуется максимальной скоростью клеточного деления. Время генерации (то есть время, необходимое для удвоения количества бактерий) на оптимальной среде может быть коротким (у кишечной палочки 20 мин), либо продолжительным (у *Mycobacterium tuberculosis* 6 ч). В этой фазе в среде происходит максимальное накопление метаболитов бактерий (например, токсинов, бактериоцинов).
- Стационарная фаза роста бактерий. В течение этого периода доступность важнейших питательных веществ становится лимитирующим фактором. Устанавливается равновесие между клеточным ростом и делением и процессом отмирания клеток.
- Фаза отмирания (спада, лизиса) включает период логарифмической гибели, переходящий в период уменьшения скорости отмирания бактерий. Причины гибели бактерий в нормальных питательных средах до конца не ясны. Понятны случаи, когда в среде накапливаются кислоты (при росте *Escherichia*, *Lactobacillus*). Иногда бактерии разрушаются под действием собственных ферментов (аутолиз). Скорость отмирания широко варьирует в зависимости от условий обитания и особенностей микроорганизма (например, энтеробактерии отмирают медленно, а бациллы — быстро).

Этапы выделения чистых культур микроорганизмов

- В первый день (1 этап исследования) в стерильную посуду (пробирка, колба, флакон) забирают патологический материал. Изучают его внешний вид, консистенцию, цвет и другие признаки, готовят мазок, красят и исследуют под микроскопом. В некоторых случаях (острая гонорея, чума) на этом этапе можно поставить предварительный диагноз, а кроме того, подобрать среды, на которые будет засеиваться материал.
- **Засев** проводят бактериологической петлей (применяется чаще всего), с помощью шпателя методом Дригальского, ватно-марлевым тампоном. Чашки закрывают, переворачивают вверх дном, подписывают специальным карандашом и ставят в термостат при оптимальной температуре (37 °С) на 18-24 ч.. *Цель этапа – получить изолированные колонии микроорганизмов.*



Рост на среде

Эндо

Сальмонеллы и шигеллы на среде Эндо образуют бесцветные колонии, кишечная палочка и другие разлагающие лактозу микроорганизмы — малиново-красные колонии с металлическим блеском или без него

Тест на каталазу



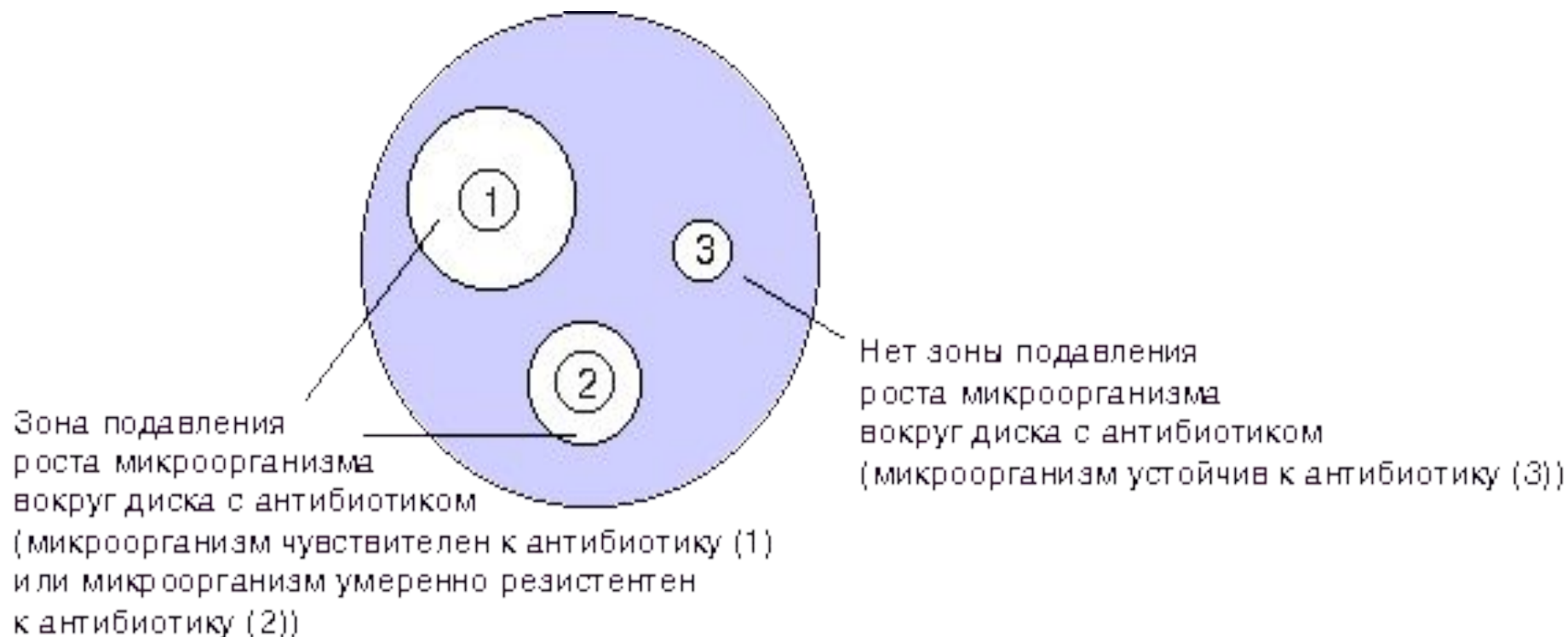
Каталаза— фермент, который катализирует разложение образующегося в процессе биологического окисления токсичного пероксида водорода на воду и молекулярный кислород.

- В пробирку вносят 4-5 капель 3% раствора перекиси водорода. Деревянной палочкой (зубочисткой) снимают с агара колонию и опускают в реактив. При положительном результате появятся пузырьки газа.

Тест на цитохромоксидазу

- Цитохром с-оксидаза (цитохромоксидаза), фермент класса оксидоредуктаз.
- Функция цитохромоксидазы — восстановление кислорода с помощью электронов цитохрома-с и транспорт протонов сквозь клеточную мембрану. Энергия, полученная в этом процессе, используется для создания трансмембранного протонного градиента
- На чашку Петри с выросшей культурой наливают 1% раствор тетраметил-парафенилендиамина гидрохлорида. Культура, обладающая оксидазой, окрашивается в пурпурно-красный цвет.
- Цель проведения теста: дифференциальная диагностика с псевдомонадами (также грамотрицательные палочки, но оксидаза-положительные.)

Определение чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом.



Методы определения чувствительности к антибиотикам

Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам делятся на 2 группы: диффузионные и методы разведения.

Диффузионные методы:

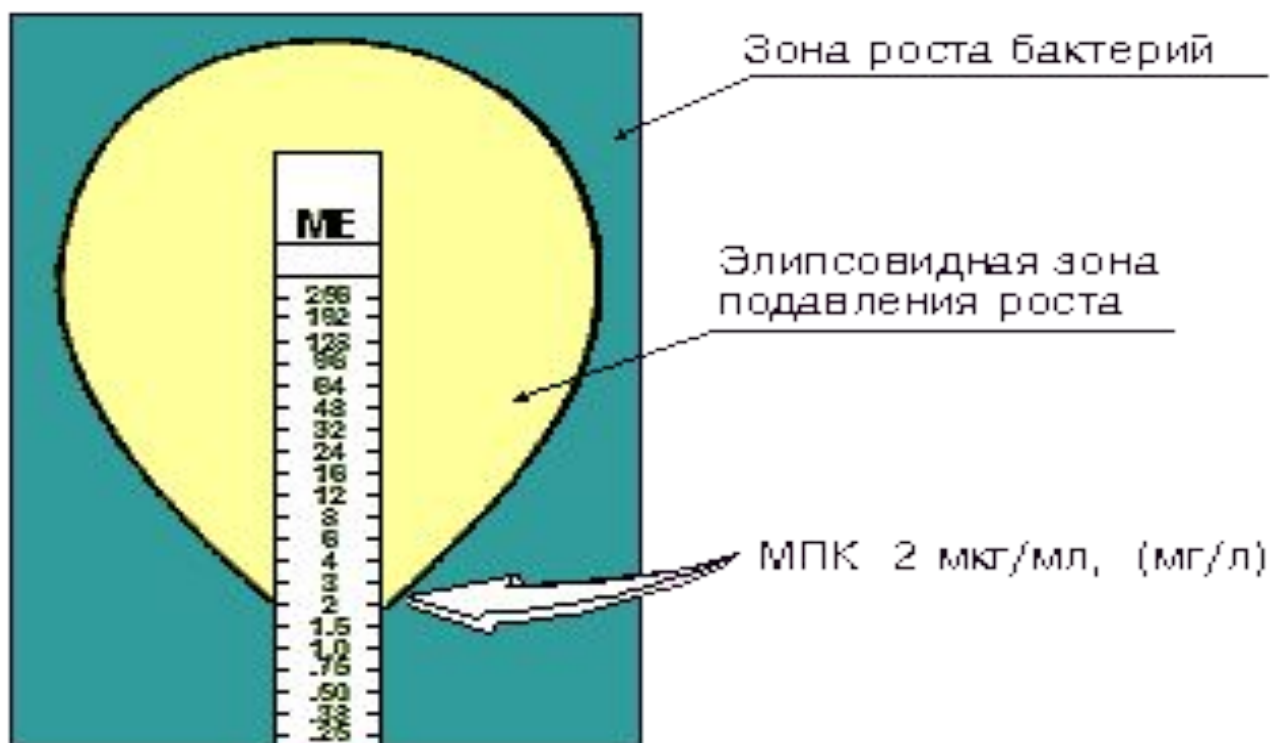
- с использованием дисков с антибиотиками
- с помощью Е-тестов

Методы разведения:

- в жидкой питательной среде (бульоне)
- разведение в агаре

При определении чувствительности диско-диффузионным методом на поверхность агара в чашке Петри наносят бактериальную суспензию определенной плотности (обычно эквивалентную стандарту мутности 0,5 по McFarland) и затем помещают диски, содержащие определенное количество антибиотика. Диффузия антибиотика в агар приводит к формированию зоны подавления роста микроорганизмов вокруг дисков. После инкубации чашек в термостате при температуре 35°-37°С в течение ночи учитывают результат путем измерения диаметра зоны вокруг диска в миллиметрах.

Определение чувствительности микроорганизма с помощью Е-теста проводится аналогично тестированию диско-диффузионным методом. Отличие состоит в том, что вместо диска с антибиотиком используют полоску Е-теста, содержащую градиент концентраций антибиотика от максимальной к минимальной. В месте пересечения эллипсовидной зоны подавления роста с полоской Е-теста получают значение минимальной подавляющей концентрации (МПК).



• **Методы разведения** основаны на использовании двойных последовательных разведений концентраций антибиотика от максимальной к минимальной (например от 128 мкг/мл, 64 мкг/мл, и т.д. до 0,5 мкг/мл, 0,25 мкг/мл и 0,125 мкг/мл). При этом антибиотик в различных концентрациях вносят в жидкую питательную среду (бульон) или в агар. Затем бактериальную суспензию определенной плотности, соответствующую стандарту мутности 0,5 по McFarland, помещают в бульон с антибиотиком или на поверхность агара в чашке. После инкубации в течение ночи при температуре 35°-37°С проводят учет полученных результатов. Наличие роста микроорганизма в бульоне (помутнение бульона) или на поверхности агара свидетельствует о том, что данная концентрация антибиотика недостаточна, чтобы подавить его жизнеспособность. По мере увеличения концентрации антибиотика рост микроорганизма ухудшается. Первую наименьшую концентрацию антибиотика (из серии последовательных разведений), где визуально не определяется бактериальный рост принято считать **минимальной подавляющей концентрацией (МПК)**. Измеряется МПК в мг/л или мкг/мл.

• Минимальная подавляющая концентрация (МПК) - наименьшая концентрация антибиотика (мг/л или мкг/мл), которая *in vitro* полностью подавляет видимый рост бактерий

