

Этапы выделения чистых культур. Идентификация микроорганизмов

РАЗМНОЖЕНИЕ БАКТЕРИЙ НА ЖИДКИХ И ПЛОТНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ.

ФАЗЫ РАЗВИТИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПОПУЛЯЦИИ

- Размножение бактерий определяется *временем генерации*, т. е. периодом, в течение которого осуществляется деление клетки.
- Продолжительность генерации зависит от вида бактерий, возраста, популяции, состава питательной среды, температуры и других факторов.
- В оптимальных условиях время генерации у разных бактерий колеблется довольно в широких пределах: от 20 мин у кишечной палочки до 14 ч у микобактерий туберкулеза, в связи с чем, их колонии образуются через 18—20 ч, либо через 3—5 нед. соответственно.

Кривая роста микроорганизмов



Особенности микробного роста на жидких питательных средах

- 1. Рост бактерий с равномерным помутнением среды.
- 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.
- 4. Поверхностный рост бактерий, характеризующийся появлением на поверхности жидкой питательной среды пленки.

Этапы выделения чистой культуры микроорганизмов

I этап (нативный материал)

- Микроскопия (ориентировочное представление о микрофлоре).
- Посев на плотные питательные среды (получение колоний).

II этап (изолированные колонии)

- Изучение колоний (культуральные свойства бактерий).
- Микроскопическое изучение микробов в окрашенном мазке (морфологические свойства бактерий).
- Посев на скошенный питательный агар для выделения чистой культуры.

III этап (чистая культура)

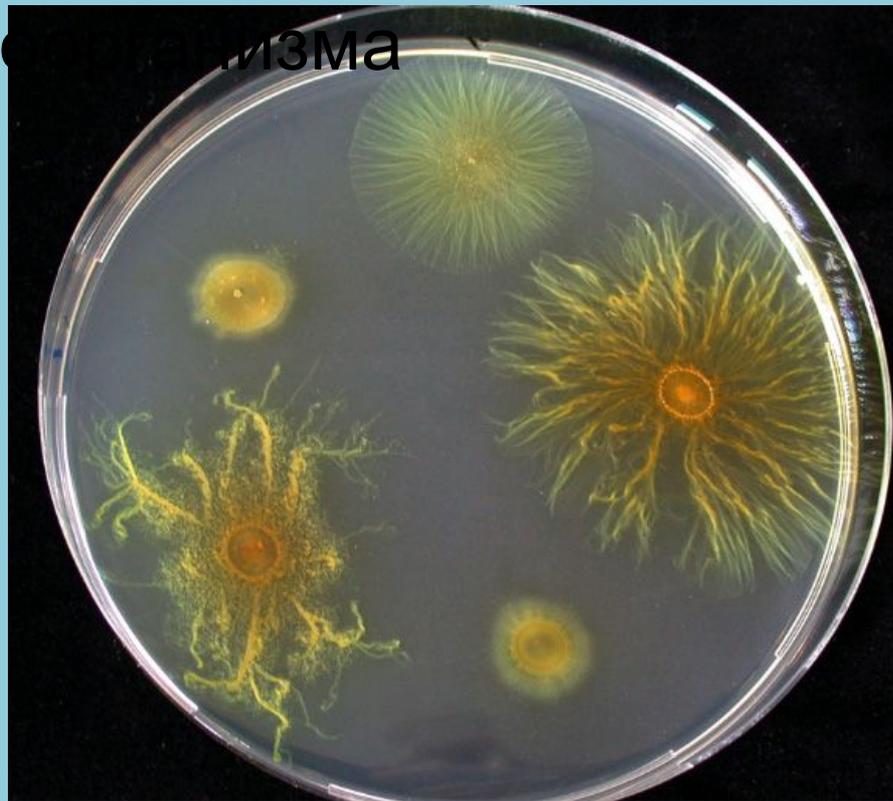
- Определение культуральных, морфологических, биохимических и других свойств для идентификации культуры бактерий

Выделение чистой культуры

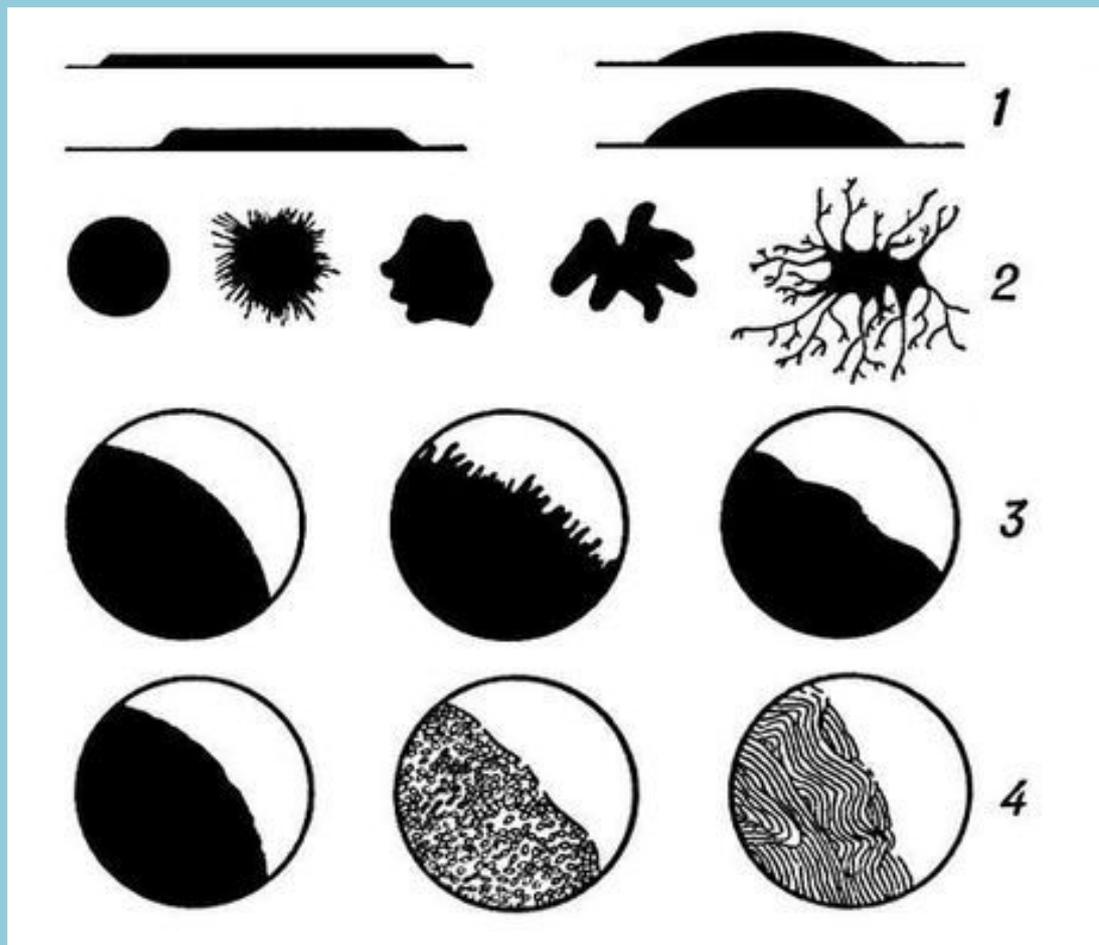
Культуральные свойства:

Характеристика колоний

микроскопизма

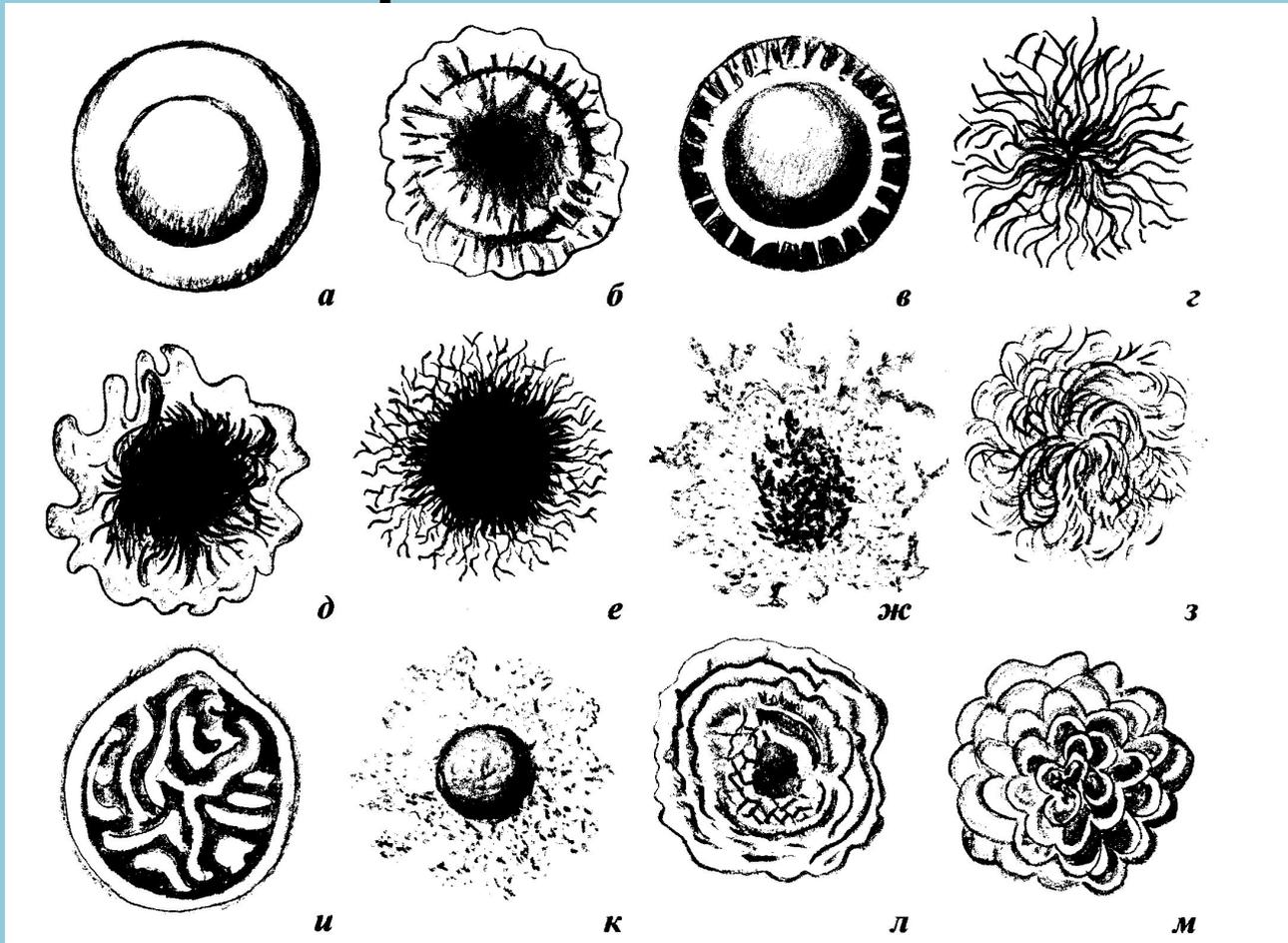


Морфологическое и структурное разнообразие колоний



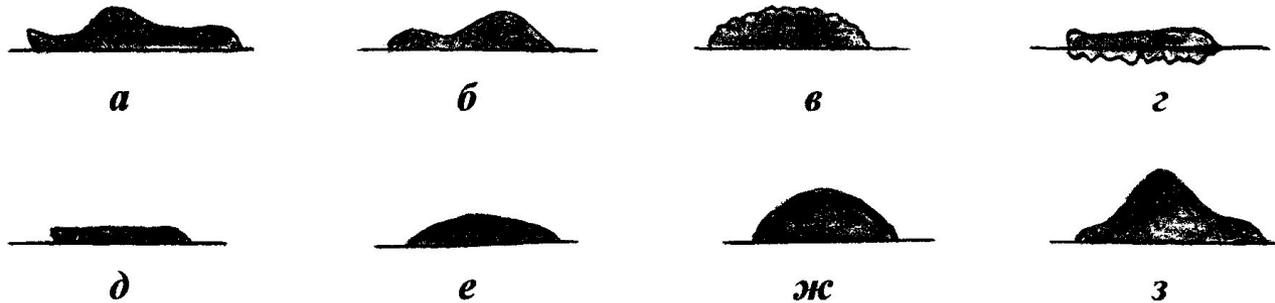
1 — формы выпуклости колоний над поверхностью питательной среды; 2 — очертания колоний; 3 — характер края колоний; 4 — внутренняя структура колоний.

Форма колоний:



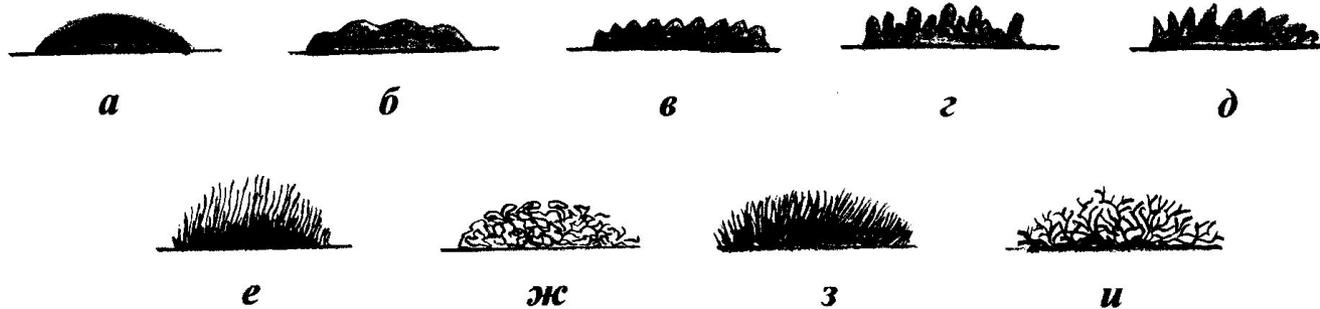
а – круглая; б – круглая с фестончатым краем;
в – круглая с валиком по краю; г; д – ризоидная; е – с ризоидным краем;
ж –амебовидная; з – нитевидная; и – складчатая; к – неправильная;
л – концентрическая; м – сложная

Профиль колоний



- а – изогнутый;
- б – кратерообразный;
- в – бугристый;
- г – растающий в агар;
- д – плоский;
- е – выпуклый;
- ж – каплевидный;
- з – конусовидный

Край колоний



- а - гладкий;
- б – волнистый;
- в – зубчатый;
- г – лопастный;
- д – неправильный;
- е – реснитчатый;
- ж – нитчатый;
- з – ворсинчатый;
- и - ветвистый

Пигменты бактерий

- Колонии многих бактерий могут быть ярко окрашены, что связано с выделением окрашивающего вещества в среду либо окраской самих бактерий. Среди пигментов преобладают **жёлтые**, **оранжевые** и **красные** каротиноидные пигменты.
- Пигменты бактерий — вторичные метаболиты, то есть они не являются веществами, обязательно присутствующими у всех бактерий. Например, даже внутри одного вида *Serratia marcescens* есть пигментообразующие и беспигментные штаммы.
- Способность к пигментообразованию выражена у видов *Sarcina*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* и др. Этот признак генетически детерминирован, поэтому его используют в качестве дифференцирующего критерия.
- **Пигменты:** 1. участвуют в метаболизме бактерий, 2. повышают их устойчивость к химическим веществам, 3. защищают бактерии от действия видимого света и УФ-лучей. Мутанты, лишённые способности к пигментообразованию, быстро погибают на свету. Искусственно окрашенные бактерии (например, метиленовым синим) также проявляют повышенную лабильность к инсоляции. Бактерицидное действие солнечного света проявляется в присутствии кислорода и обусловлено фотоокислением. При этом клеточные пигменты (флавины и цитохромы) действуют как катализаторы.
- Каротиноиды ингибируют этот процесс. У некоторых бактерий образование пигментов происходит только на свету (например, каротиноидов у туберкулёзной палочки).
- Многие пигменты проявляют антибиотические свойства. Между пигментацией и образованием вторичных метаболитов существует такая тесная корреляция, что при наличии пигментов можно с большой долей вероятности ожидать образования антибиотиков и других БАВ.

Пигменты микроорганизмов

Пигмент	Цвет	Микроорганизм
Каротиноиды	Красный, оранжевый, желтый	Микобактерии, сарцины, актиномицеты (защищает от ультрафиолета)
Хиноновые	Желтые	Микобактерии туберкулеза
Меланиновые	Черные, коричневые	бактериоиды
Пирроловые	Ярко-красные	<i>Serratia marcescens</i> , актиномицеты
Фенозиновые	Сине-зеленые, при этом может меняться	Синегнойная палочка (пиоцианин)

Биохимические признаки (свойства) бактерий

- определяются набором ферментов, присущих определенному роду, виду, варианту микроорганизмов
- Выявляют посевами на дифференциально-диагностические среды

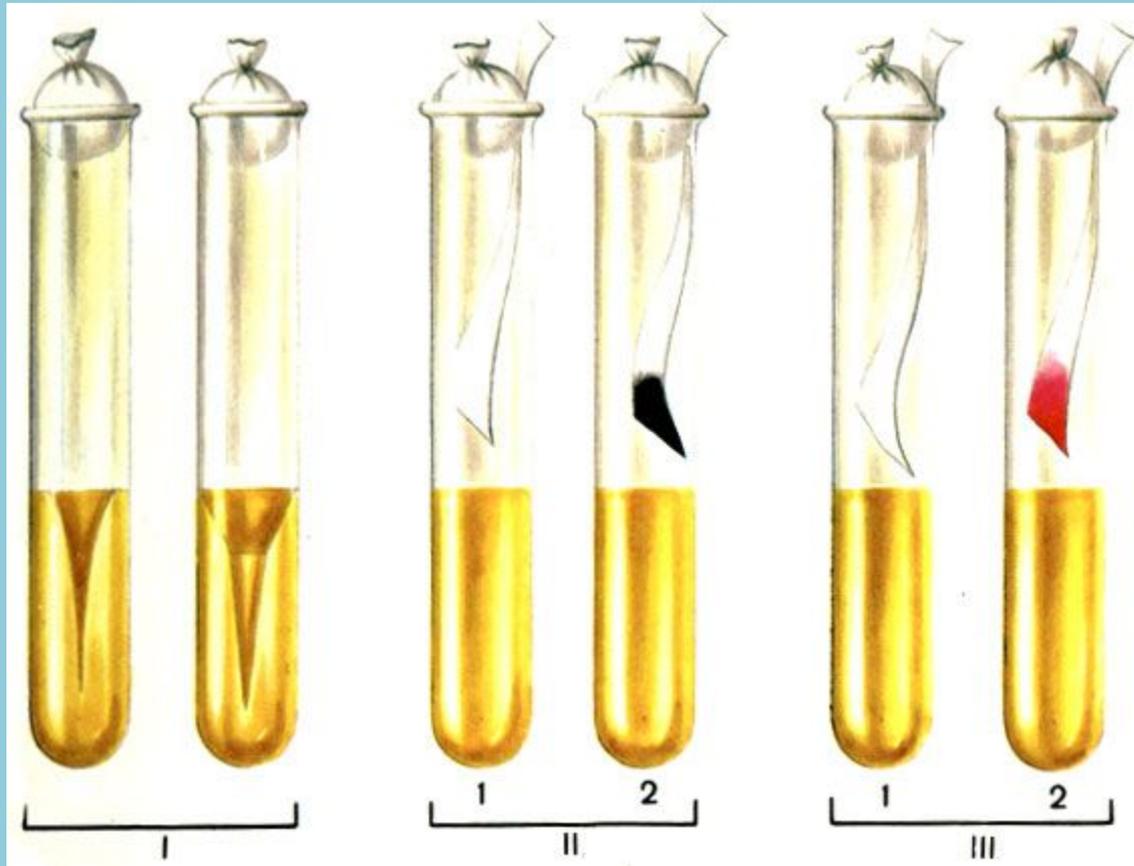
Ферменты бактерий

- Энзимы – специфические белки, которые катализируют химические реакции.
- Классификация ферментов бактерий:
 1. По типу катализируемой реакции – оксиредуктазы, лиазы, трансферазы, гидролазы и т.д.
 2. По локализации – эндоферменты – катализируют реакции внутри клетки. Экзоферменты – выделяются из бактериальной клетки, катализируют расщепление
 3. Генетический контроль образования – конститутивные (в течение всего жизненного цикла, не влияет наличие субстрата), индуцибельные – они образуются в ответ на наличие субстрата
 4. По субстрату – протеолитические – расщепляют белки, сахаролитические – расщепляют углеводы, липолитические – расщепляющие жиры.

Протеазы

- расщепляют белки до аминокислот, мочевины, индола, сероводорода, аммиака. По выделению этих продуктов на средах с белком выявляют наличие протеаз.
- Среды:
- С желатином, разжижение среды
- На свернутой сыворотке по ее разжижению
- На молоке по его просветлению
- Казеин – будет разрушаться, белок свертываться.
- На МПБ по выделению газа индола и сероводорода, которые выявляют с помощью индикаторных бумажек

Протеолитические свойства микроорганизмов



1 - формы разжижения желатина; II - определение сероводорода; III - определение индола: 1 - отрицательный результат; 2 - положительный результат

Бумажные индикаторные системы

- представляют собой полоски или диски хроматографической бумаги, пропитанные соответствующими субстратами и индикаторами и покрытые для стабилизации пленкообразующим полимером — водным раствором поливинил спирта.



Сахаролитические ферменты

- расщепляющие углеводы
- Эти ферменты расщепляют углеводы до альдегидов, кислот, углекислого газа и H_2 .
- Для их определения используют МПБ или МПА, к которым добавляют индикатор кислотообразования + углевод + поплавков для газообразования.
- Пример - среды Гисса. Если свет среды меняется, выделяется газ, значит идет расщепление углеводов (моносахара).
- На этом принципе создаются панели, планшеты, бумажные индикаторные системы и приборы для учета ферментативной активности.
-

Среды Гисса



Escherichia coli

Глюкоза	Лактоза	Мальтоза	Маннит	Сахароза	Пептонная вода	
					индол	H ₂ S
КГ	КГ	КГ	КГ	-	+	-

Salmonella серовара Typhi

Глюкоза	Лактоза	Мальтоза	Маннит	Сахароза	Пептонная вода	
					индол	H ₂ S
К	-	К	К	-	-	+

Липолитические ферменты

- липазы – выявляют на ЖСА – желточно-солевой агар, который содержит желток, разрушение липидов желтка сопровождается помутнением среды



Комплексная система идентификации бактерий



- Микробиологический анализатор Multiskan FC
Позволяет идентифицировать более 500 видов микроорганизмов и патогенных грибов.

Система микробиологической диагностики включает оценку данных, полученных в результате проведения исследований по идентификации микроорганизмов и определению их антибиотикочувствительности *in vitro*, и коррекцию их на основании сведений о природной устойчивости или чувствительности отдельных микроорганизмов или их групп, о распространении среди них приобретенной резистентности, а также сведений о корреляции данных по чувствительности, полученных *in vitro*, клинической эффективности антибактериальных препаратов.

Спасибо за внимание!