ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

- ДЛЯ ЛЕЧЕБНОГО И ПЕДИАТРИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА

- К.М.Н. ДОЦЕНТ КАФЕДРЫ МИКРОБИОЛОГИИ СОКОВНИНА С.В.

План лекции

- *Химический состав бактерий*
- *Питание бактерий*
- *Дыхание бактерий*
- *Рост и размножение бактерий*
- Питательные среды, их классификация.

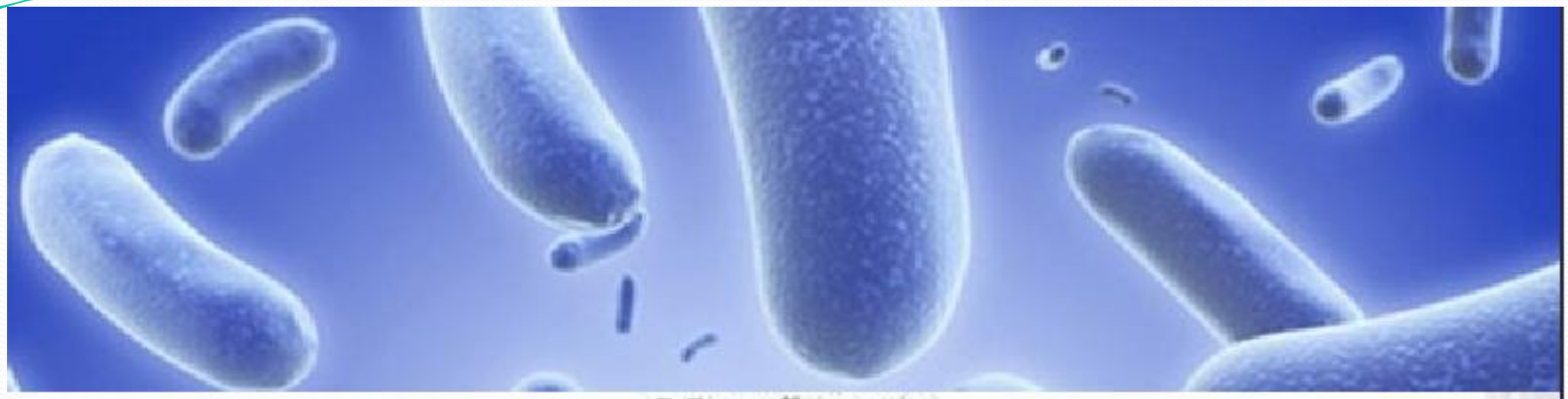
Физиология бактерий

- Физиология бактерий включает метаболизм бактерий, т.е. питание, получение энергии, рост и размножения бактерий, а также их взаимодействие с окружающей средой.
- Метаболизм бактерий лежит в основе разработки методов их культивирования, получения чистых культур и их идентификации.
- Выяснение физиологии патогенных и условно-патогенных бактерий важно для изучения патогенеза вызываемых ими инфекционных болезней, постановки микробиологического диагноза, лечения и профилактики инфекционных заболеваний, а также для использования бактерий в биотехнологических процессах с целью получения биологически активных веществ.

Физиология микроорганизмов

Изучает процессы питания, дыхания, рост и размножение микроорганизмов.

- Ассимиляция (анаболизм) – усвоение питательных веществ и использование их для синтеза клеточных структур.
- Диссимиляция (катаболизм)- разложение и окисление питательных веществ с выделением энергии.
- *Все процессы совершаются с участием ферментов.*



Метаболизм

Катаболизм (диссимиляция) → **Распад** → **Большие молекулы** → **небольшие** → **Энергия освобождается**

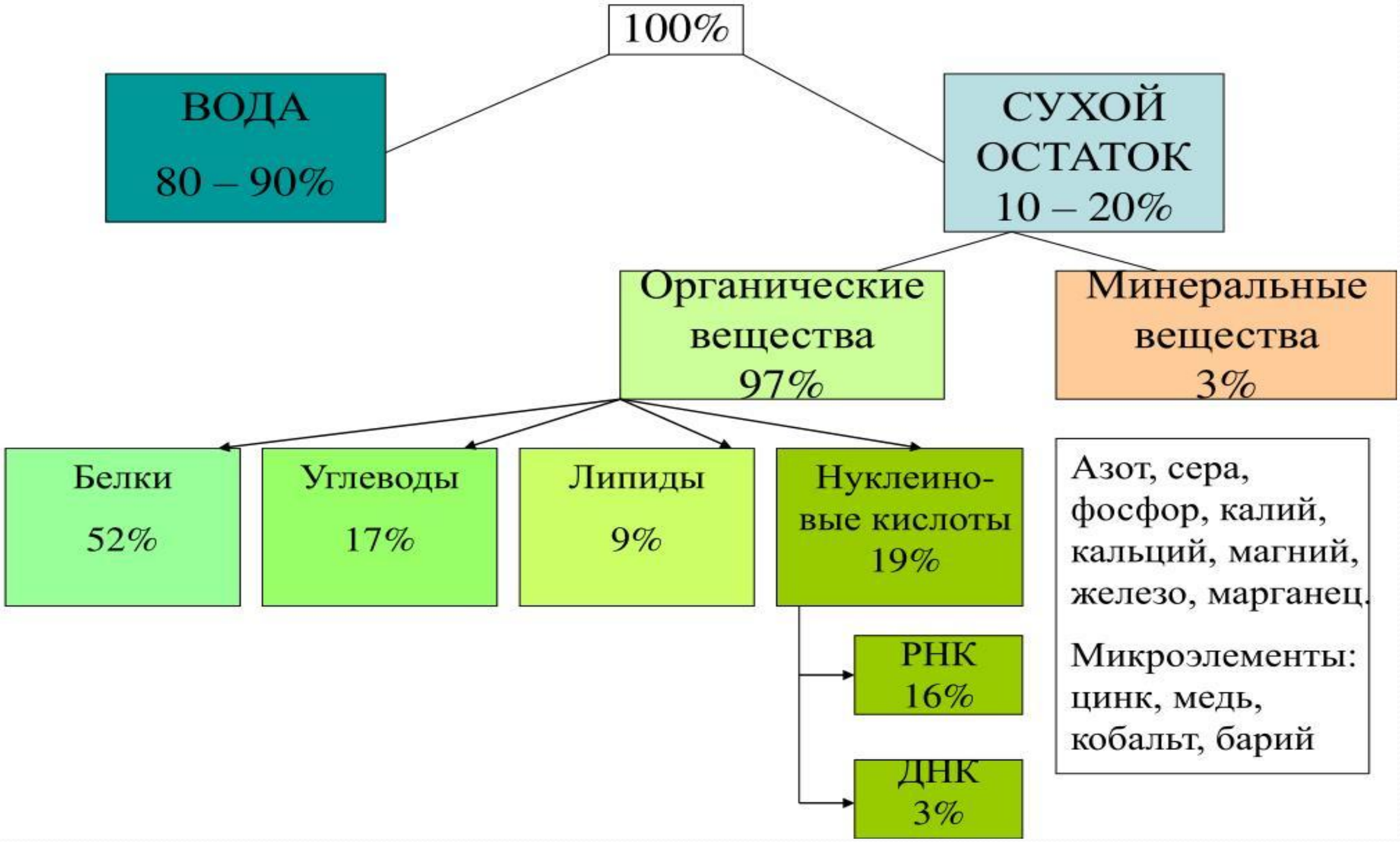
Анаболизм (ассимиляция) → **Биосинтез** → **Небольшие молекулы** → **большие** → **Энергия требуется**

Оба процесса находятся в тесном взаимодействии и взаимозависимости, неотделимы один от другого, обусловливают рост, развитие и размножение организма.

Физиология бактерий.

Бактерии различаются по химическому составу, типу питания, способам получения энергии и размножения, обладают высокой приспособляемостью и устойчивостью ко многим факторам окружающей среды.

Химический состав бактериальной клетки



Химический состав бактерий

- **Вода** – осн. компонент, 80% ее массы.
- **Белки** – (40-60% сухой массы) определяют главные биол. свойства бактерий. МО содержат более 2000 разл.белков, находящихся в структурных компонентах и участвующих в процессах метаболизма.
- **Углеводы** –простые вещества (моно- и дисахариды) и комплексн.соед-ми. Полисахариды (ПС) входят в состав капсул. Внутриклеточные ПС (крахмал, гликоген) являются запасными питат. веществами.
- **Липиды** - входят в состав ЦПМ, КС. Могут выполнять в цитоплазме роль запасных питательных веществ. Это фосфолипиды, жирные кислоты и глицериды. Макс. кол-во липидов(до 40%), содержат микобактерии tbc.
- **Минеральные вещества** – макро - P, K, Na, S, Fe, Ca, Mg; микро – Zn, Cu, Co, Ba, Mn. Участвуют в регуляции осмот. давления, pH, ОВ -потенциала, активируют ферменты, сами входят в состав ферментов, витаминов и структурных элементов бактериальной клетки (БК).

Питание микроорганизмов

1. Расщепление пищеварительных субстратов
2. Транспорт веществ в бактериальную клетку
3. Стадия переваривания в цитоплазме
4. Распределение по органеллам
5. Усвоение питательных веществ
6. Транспорт веществ из бактериальной клетки

Особенности питания бактерий:

- нет специальных органов пищеварения;
- усвоение питательных веществ всей поверхностью клетки;
- быстрота энергетических процессов;
- высокая приспособляемость к меняющимся условиям питания;
- расщепление сложных органических веществ, главным образом, вне клетки;
- разнообразие использования органических и неорганических веществ.

У БАКТЕРИЙ НАБЛЮДАЮТСЯ РАЗНЫЕ СПОСОБЫ ПИТАНИЯ

АВТОТРОФЫ

СОЗДАЮТ ОРГАНИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА ИЗ НЕОРГАНИЧЕСКИХ

ГЕТЕРОТРОФЫ

ИСПОЛЬЗУЮТ ГОТОВЫЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА

ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИЕ

ВЫДЕЛЯЮТ КИСЛОРОД В АТМОСФЕРУ
ИСПОЛЬЗУЮТ СОЛНЕЧНУЮ ЭНЕРГИЮ

ХЕМОСИНТЕЗИРУЮЩИЕ

ВЫДЕЛЯЮТ КИСЛОРОД В АТМОСФЕРУ
ИСПОЛЬЗУЮТ ЭНЕРГИЮ ХИМИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ НЕОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

БАКТЕРИИ–СИМБИОНТЫ

ЖИВУТ СОВМЕСТНО С ДРУГИМИ ОРГАНИЗМАМИ И ЧАСТО ПРИНОСЯТ ИМ ОЩУТИМУЮ ПОЛЬЗУ

САПРОФИТЫ

БАКТЕРИИ ГНИЕНИЯ, БРОЖЕНИЯ (ИЗВЛЕКАЮТ ПИТАТЕЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА ИЗ МЕРТВЫХ ТЕЛ)

ПАРАЗИТЫ

ПИТАЮТСЯ ВЕЩЕСТВАМИ ИЗВЛЕЧЕННЫМИ ИЗ ЖИВЫХ ТЕЛ

По способу питания

БАКТЕРИИ

Автотрофы

Гетеротрофы

Сапрофиты –

(от греч. «сапрос» - гнилой)

Довольствуются органическими веществами отмерших организмов или выделениями живых организмов

Симбионты –

(от греч. «симбионтос» - сожительствующий)

Живут совместно с другими организмами и часто приносят им ощутимую пользу

Паразиты –

(от греч. «паразитос» - нахлебник)

Питаются органическими веществами живых организмов

Типы питания микроорганизмов

По типу питания разделяют в зависимости от:

- ***источника энергии***

✓ ***фототрофы*** – микроорганизмы, которые в качестве источника энергии *используют энергию солнечного света;*

✓ ***хемотрофы*** – микроорганизмы, которые в качестве источника энергии *используют разнообразные органические и неорганические вещества*, т.е. источниками энергии служат процессы окисления химических соединений.

- ***источника электронов*** (природы окисляемого субстрата):

✓ ***литотрофы*** – *окисляют неорганические вещества* и за счет этого получают энергию;

✓ ***органотрофы*** – *окисляют органические вещества* и за счет этого получают энергию.

Типы питания бактерий

Факторы роста (ФР) микроорганизмы синтезировать не могут, их добавляют в питательные среды. К ФР относят аминокислоты, необходимые для построения белков, пурины и пиримидины, необходимые для образования нуклеиновых кислот, витамины, входящие в состав некоторых ферментов.

Для обозначения отношения МО к ФР используют термины **ауксотрофы и прототрофы**.

Ауксотрофы нуждаются в 1 или нескольких ФР.

Прототрофы могут сами синтезировать необходимые для роста соединения.

Механизм питания

Поступление различных веществ в бак.клетку зависит

- 1. от величины и растворимости их молекул в липидах и воде
- 2. pH среды
- 3. концентрации веществ
- 4. различных факторов проницаемости мембран и др.

Пути проникновения питательных веществ в бактериальную клетку

- Без затраты энергии (диффузия)
  - простая
  - облегченная
- С затратой энергии
  - активный транспорт = без химической модификации переносимых молекул
  - транслокация химических групп = с химической модификацией переносимых молекул

} пермеазы

Процессы питания бактерий

- Питательные вещества поступают по 3 механизмам:
- 1. ***Пассивная диффузия*** – по градиенту концентраций, без затрат энергии
  a. Скорость пассивной диффузии зависит от величины градиента концентраций
  b. Отсутствует субстратная специфичность
  c. Не требует затрат энергии

Процессы питания бактерий

- ***Облегченная диффузия*** –
  - Участие белков–переносчиков (пермеазы)
  - Субстратная специфичность
  - Диффузия происходит только по градиенту концентраций
  - Не требует затрат энергии

Процесс питания бактерий

- ***Активный транспорт*** –
  - Против градиента концентраций
  - Требуется энергии
  - Могут быть задействованы специальные белки (не идентичные пермеазам)

Ферменты

Ферменты — белки, участвующие в процессах анаболизма (синтеза) и катаболизма (распада), т.е. в метаболизме. Ферменты распознают соответствующие им метаболиты (субстраты), вступают с ними во взаимодействие и ускоряют химические реакции.

Фермент – это белковая молекула, которая ускоряет протекание биохимических реакций в организме человека. Синонимом понятия фермент является термин **энзим**.

ФЕРМЕНТЫ БАКТЕРИЙ

(по составу)

Простые

(трипсин, пепсин)

Сложные

(Цитохромоксидаза, пероксидаза)

(по действию)

Экзоферменты

(выделяются во внешнюю среду – факторы агрессии)

Эндоферменты

(необходимы для внутренних процессов жизнедеятельности клетки)

Ферменты бактерий.

- *Эндоферменты* - катализируют метаболизм, проходящий внутри клетки. Это, например, окислительно-восстановительные ферменты цитоплазматической мембраны, участвующие в дыхании и делении клетки; ферменты, обеспечивающие питание клетки, и др. Ферменты, связанные с делением и аутолизом клетки, обнаруживаются в клеточной стенке.
- *Экзоферменты* выделяются клеткой в окружающую среду, расщепляя макромолекулы питательных субстратов до простых соединений, усваиваемых клеткой в качестве источников энергии, углерода и др. Некоторые экзоферменты (пенициллиназа и др.) инактивируют антибиотики, выполняя защитную функцию. Другие разрушают ткань и клетки, обусловливая широкое распространение в инфицированной ткани микроорганизмов и их токсинов. Это ферменты агрессии - гиалуронидаза, коллагеназа, дезоксирибонуклеаза, нейраминидаза, лецитовителлаза и др. Их относят к факторам патогенности микрорганизма..

Ферменты бактерий.

В соответствии с особенностями генетического контроля

- *Конститутивные,* синтез которых происходит в течение всего клеточного цикла.
- *Индуцибельные,* синтез которых индуцируется соответствующим субстратом. Например, β-галактозидаза кишечной палочкой на среде с глюкозой практически не образуется, но ее синтез резко увеличивается при выращивании на среде с лактозой или другим β-галактозидозом.
- *Репрессибельные,* синтез которых подавляется в результате избыточного накопления продукта реакции, катализируемой данным ферментом (ферментами).

Классификация ферментов

На Международном биохимическом съезде было принято, что ферменты должны классифицироваться по типу реакции, катализируемой ими.

В названии фермента обязательно присутствует название субстрата, т. е. того соединения, на которое воздействует данный фермент, и окончание *-аза*. (Аргиназа катализирует гидролиз аргинина и т.д.)

По этому принципу все ферменты были разделены на 6 признаков.

6 классов ферментов

1. **оксидоредуктазы — окислительно-восстановительные ферменты (дегидрогеназы, оксидазы и др.);**
2. **трансферазы, переносящие отд.радикалы и атомы от одних соединений к другим;**
3. **гидролазы, ускоряющие реакции гидролиза, т.е. расщепления веществ на более простые с присоединением молекул воды (эстеразы, фосфатазы, глюкозидазы);**
4. **лиазы, отщепляющие от субстратов химические группы негидролитическим путем (карбоксилазы и др.);**
5. **изомеразы, превращающие органические соединения в их изомеры (фосфогексоизомераза и др.);**
6. **лигазы, или синтетазы, ускоряющие синтез сложных соединений из более простых (аспарагинсинтетаза, глю-аминсинтетаза и др.)**

Биохимические свойства бактерий

- определяются составом ферментов:
- ***сахаролитические*** –расщепление углеводов;
- ***протеолитические*** – расщепление белков,
- ***липолитические*** – расщепление жиров,

Биохимическая идентификация бактерий

- Способность бактерий расщеплять белки (протеолитические ферменты МО) – на средах с желатином (разжижжение среды), молоком(просветление), сывороткой и пептоном (образование индола, сероводорода, аммиака и др).
- Способность бактерий разлагать сахара и многоатомные спирты с образованием кислоты – на средах Гиса, содержащих углевод(какой-либо конкретный

«Пестрый ряд» (среды Гисса).

- **Состав:** к 1 % пептонной воде добавляют 0,5 % раствор определенного углевода (глюкоза, лактоза, мальтоза, маннит и др.) и индикатор Андреде (кислый фуксин в 1 N растворе NaOH), разливают по пробиркам. В пробирки помещают поплавок (трубка длиной около 3 см, один конец которой запаян) для улавливания газообразных продуктов, образующихся при разложении углеводов. Среда при pH 7,2—7,4 бесцветна. При разложении углеводов она приобретает красный цвет.
- **Идентификация бактерий по биохимическим признакам с помощью сред "пестрого ряда"**. **Короткий** "пестрый ряд" включает жидкие среды Гисса с моно- и дисахаридами: глюкозой, лактозой, сахарозой, мальтозой и с 6-атомным спиртом — маннитом. В **длинный "пестрый ряд"** наряду с перечисленными углеводами вводят среды с разнообразными моносахаридами (арабиноза, ксилоза, рамноза, галактоза и др.) и спиртами (глицерин, дульцит, инозит и др.).
- *Чистую культуру исследуемого микроорганизма засевают петлей в среды "пестрого ряда".* Посевы инкубируют при 37 °С в течение 18—24 ч или больше. В том случае, если бактерии ферментируют углевод до образования кислых продуктов, наблюдается изменение цвета среды; при разложении углевода до кислоты и газообразных продуктов наряду с изменением цвета появляется пузырек газа в поплавке. Если используют среды с полужидким агаром, то образование газа регистрируется по разрыву столбика. При отсутствии ферментации цвет среды не меняется.
- Поскольку бактерии ферментируют не все, а только определенные для каждого вида углеводы, входящие в состав сред Гисса, наблюдается довольно пестрая картина, поэтому набор сред с углеводами и цветным индикатором называют "пестрым рядом".

Биохимическая активность

Escherichia coli

Escherichia coli ферментирует с образованием **кислоты и газа** глюкозу (1), манит (2), лактозу (3), не разлагает мочевину

Сахаролитические свойства (среда Рапопорта)

Жидкая среда Рапопорта (только энтеробактерии) применяется для определения продуктов ферментации углеводов.

Изменение цвета среды после инкубации говорит о наличии кислоты, а поднятие поплавка на поверхность – о наличии газа.

Поплавок на поверхности среды

Вывод: данная культура ферментирует углеводы до кислоты и газа.

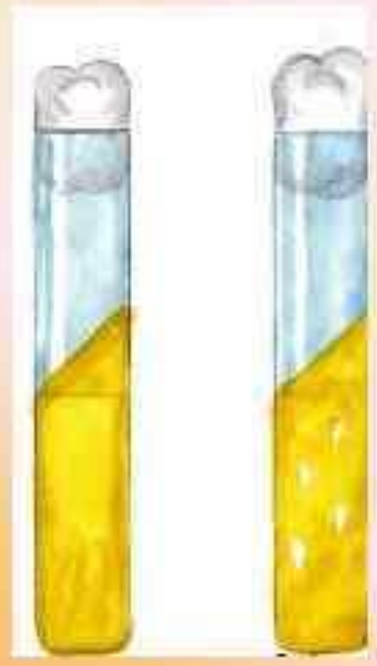
Среда Олькеницкого -

плотная комбинированная среда.

Трехсахарная, содержащая лактозу, сахарозу (в скошенной части) и глюкозу (в столбике), позволяющая определить сахаролитическую активность.

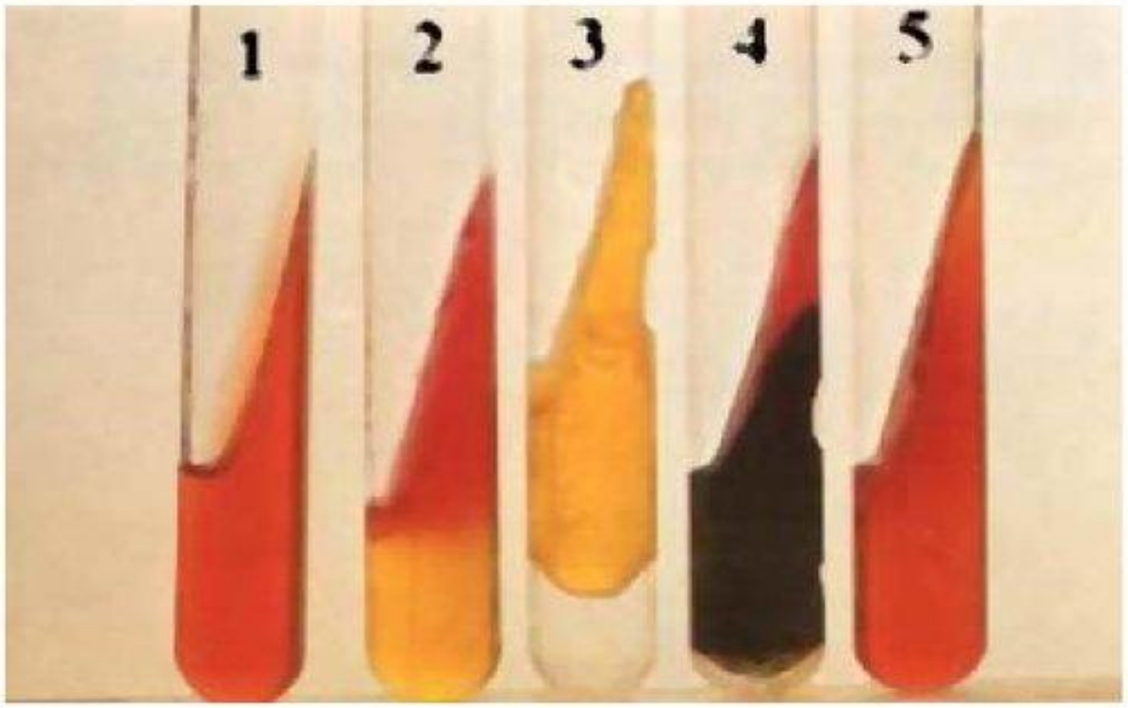
Лактоза, сахароза

Глюкоза

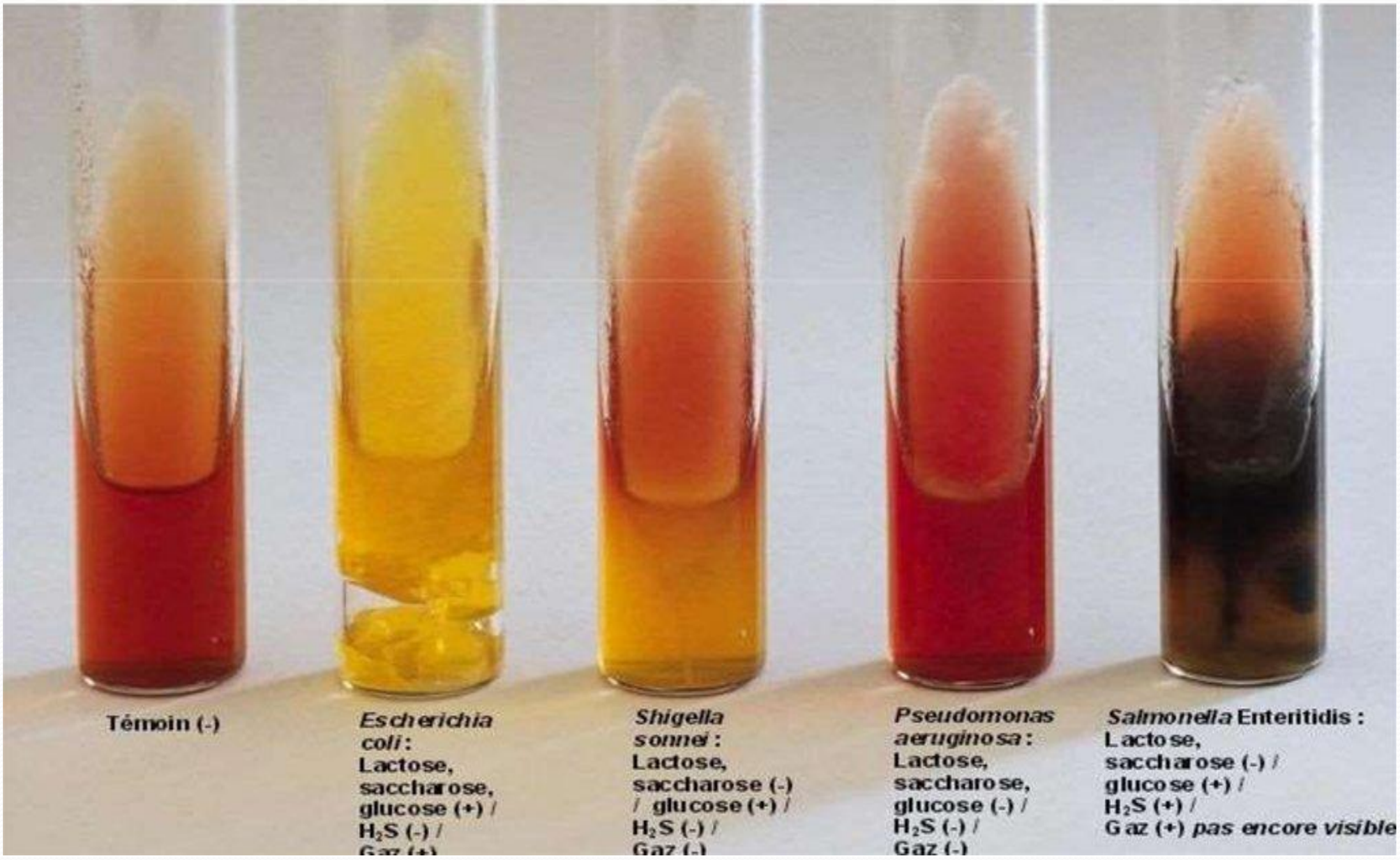


Рост микроорганизмов на среде Олькеницкого.

- 1 - незасеянная среда;
- 2 - микроорганизмы разлагают глюкозу до кислоты;
- 3 - микроорганизмы разлагают глюкозу и лактозу до кислоты и газа;
- 4 - микроорганизмы образуют сероводород;
- 5 - рост микроорганизмов, которые не разлагают сахара.



Трехсахарный агар с мочевиной



Изучение биохимических свойств бактерий (на примере энтеробактерий): I этап

- Питательные среды, методы

  Дифференциально-диагностические среды:
  – Эндо
  – Левина
  – Плоскирева

- Принцип действия

  утилизация содержащейся в среде лактозы

  ⇓

  сдвиг pH в кислую сторону

  ⇓

  изменение цвета колонии

Среды с комбинированными свойствами

- ***Среда Эндо*** – является одной из сред для выделения представителей семейства *Enterobacteriaceae*, к которому относятся бактерии родов *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*.
- **Состав**: мясопептонный агар, ***лактоза,фуксин,сульфит натрия (Na2SO3),***
- Принцип действия: фуксин обесцвечивается сульфитом натрия и образуется бесцветная фуксинсернистая кислота (реактив Шиффа)- селективный компонент, подавляет рост грамположительных микроорганизмов.
- Лактоза в составе среды может сбраживаться многими представителями *Enterobacteriaceae* до муравьиной кислоты,которая реагирует с реактивом Шиффа, что приводит к высвобождению фуксина, в результате чего колонии и среда вокруг них окрашиваются в малиново-красный цвет с металлическим блеском или без него.
- Исходный цвет среды – бледно-розовый
- лактозо-негативные (не сбраживающие лактозу) бактерии образуют на ней прозрачные колонии,
- лактозо-позитивные - пурпурные с металлическим блеском.

Лактозо-негативные

Лактозо-позитивные

Среда Эндо

Состав:

- **питательный агар,**
- **лактоза,**
- **основной фуксин.**

Среда имеет розовый оттенок.

Колонии бактерий, ферментирующих лактозу, окрашиваются в темно-красный цвет;

колонии бактерий, не ферментирующих лактозу, остаются бесцветными.

Среда Левина

Состав:

- **питательный агар,**
- **лактоза,**
- **эозин и метиленовый синий.**

Среда имеет коричневатый оттенок.

Колонии бактерий, ферментирующих лактозу, окрашиваются в темно-синий цвет;

колонии бактерий, не ферментирующих лактозу, остаются бесцветными.

Среда Плоскирева

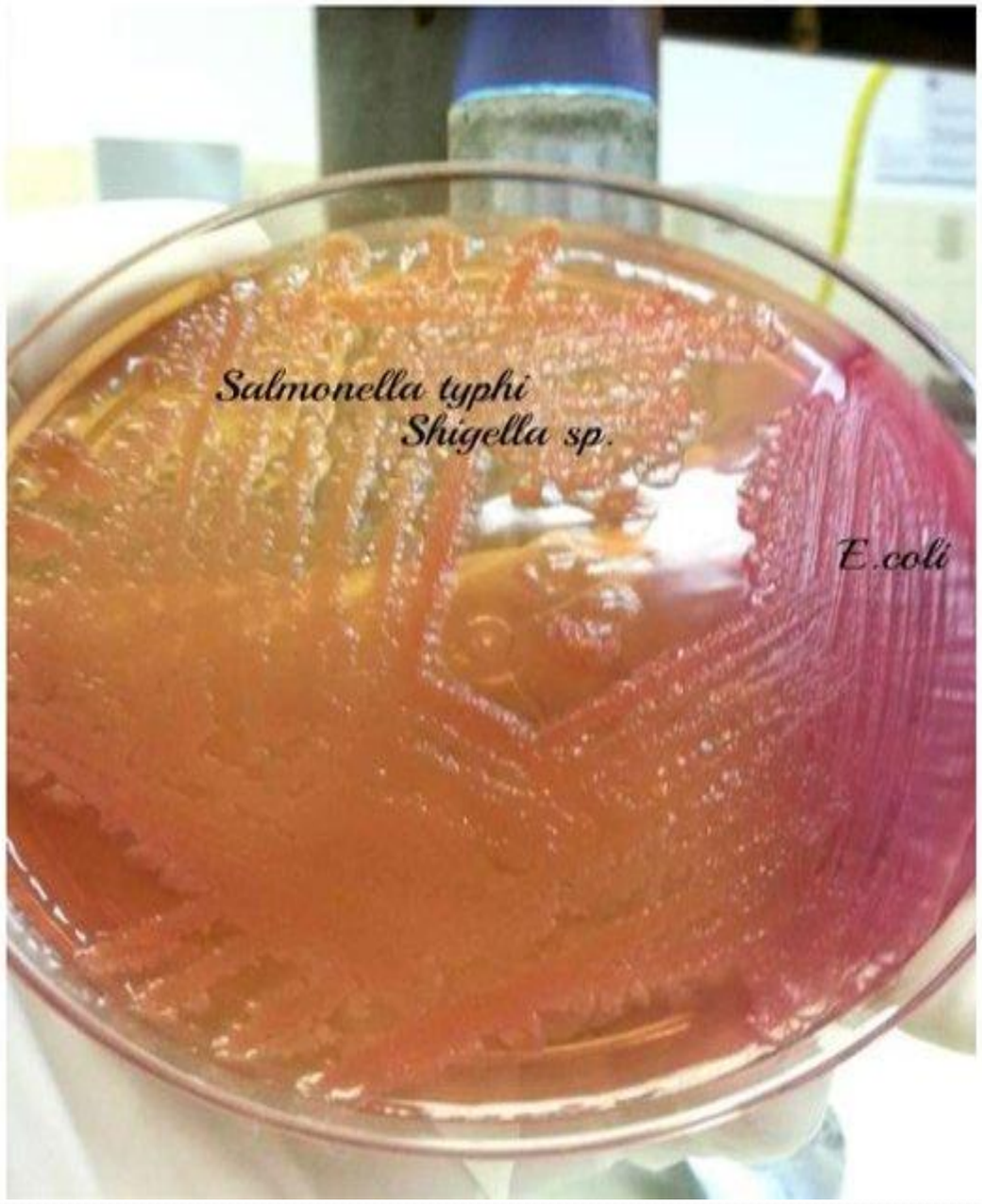
❖ селективная среда для выделения шигелл и сальмонелл.

❖ В состав среды Плоскирева входят ингибирующие вещества (желчные соли, бриллиантовый зеленый, йод), вследствие чего она должна полностью подавлять рост грамположительной флоры, значительно задерживать (первые 24 ч) рост эшерихий и другой сопутствующей микрофлоры, подавлять роение протея.

❖Дифференцирующие свойства агара Плоскирева основаны на изменении pH в кислую сторону при росте лактозоферментирующих бактерий, которые образуют колонии брусничного цвета (индикатор нейтральный красный).

❖Лактозоотрицательные бактерии вырастают в виде бесцветных или слабоокрашенных колоний.

Рост колоний на среде Плоскирева



Протеолитические свойства

определяют по:

- разжижению желатина и
- продуктам разложения белка в МПБ
  - индола, сероводорода, аммиака

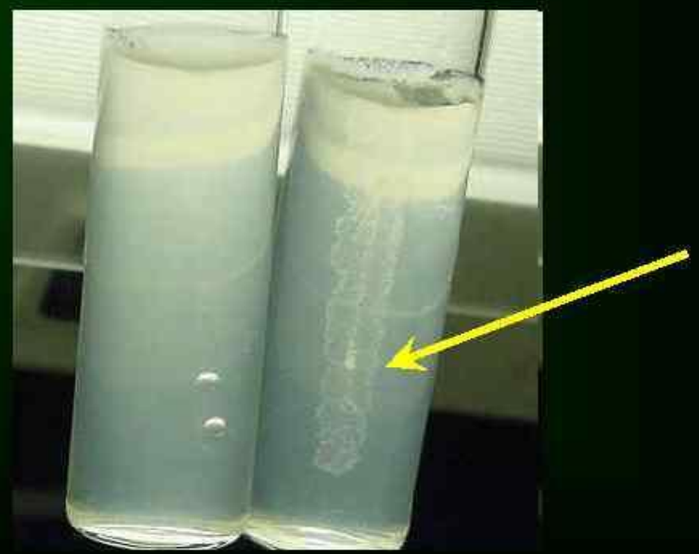
- делают посев «уколом» в столбик желатина
- и в МПБ с индикаторами продуктов расщепления белка

Определение протеолитических ферментов

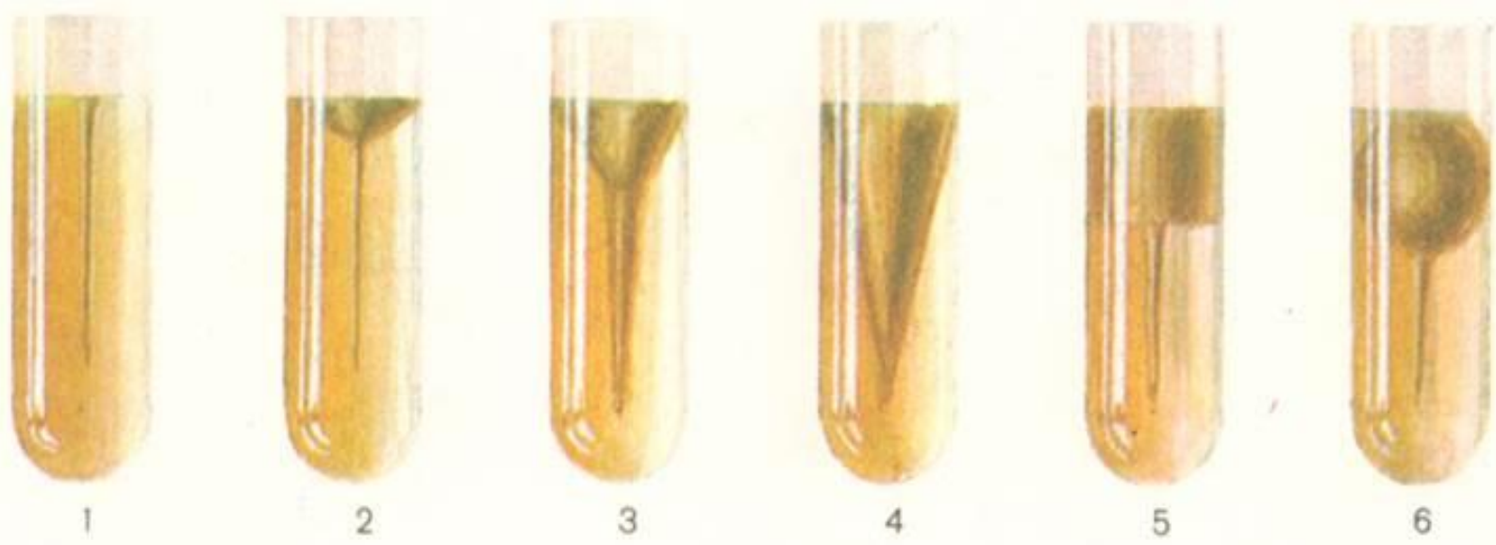
- **Учет результатов:**
- 1. При наличии протеолитических ферментов *бактерии разжижают желатин, образуя «воронку» или «елочку».*

- 2. При образовании газообразных продуктов разложения пептона *бумажки меняют цвет*:
- бумажка на аммиак – синеет,
- бумажка на сероводород - чернеет,
- бумажка на индол – розовеет.

ПОСЕВ УКОЛОМ В СТОЛБИК ЖЕЛАТИНА ВЫЯВЛЯЕТ РОСТ В ВИДЕ ОПРОКИНУТОЙ «ЁЛОЧКИ» (ВЫЯВЛЕНИЕ НПОДВИЖНОСТИ БАЦИЛЛ)



Желатиназная активность



Определение протеолитических свойств микробов.

Методика определения аммиака. Аммиак в среде с бактериальной культурой определяют при помощи реактива Несслера. Для этого в фарфоровую чашку пипеткой вносят каплю культуры, выращенной на мясо-пептонном бульоне, и каплю реактива Несслера.

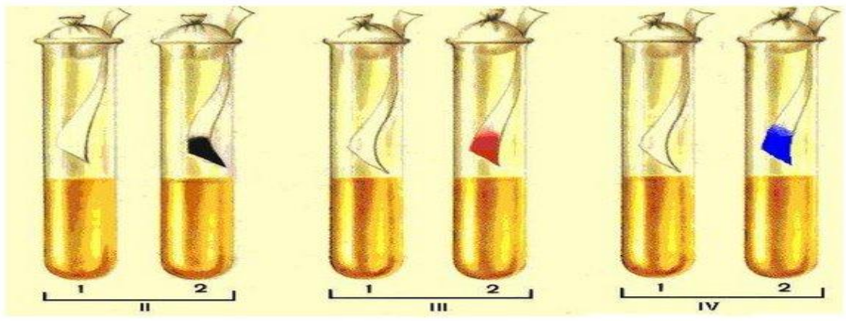
При наличии аммиака смесь окрашивается в желтый или коричневый цвет. Коричневое окрашивание указывает на большое содержание продукта гнилостного распада.

^ *Методика определения сероводорода.* Над культурой исследуемых микробов помещают полоску фильтровальной бумаги, смоченную раствором уксуснокислого свинца (бумага закрепляется между пробкой и стенкой пробирки). Пробирки помещают до трех суток в термостат. Почернение бумаги происходит при содержании сероводорода, который превращает уксуснокислый свинец в сернокислый.

^ *Методика определения индола.* Определение по методу Морелли осуществляют с помощью полоски фильтровальной бумаги, обработанной горячим насыщенным 12 %-ным водным раствором щавелевой кислоты и высушенной в термостате. Бумагу закрепляют между пробкой и стенкой пробирки. Пробирки с исследуемой культурой помещают в термостат на трое суток. Порозовение нижней части индикаторной бумаги указывает на наличие индола.

Определение протеолитической активности бактерий

- Выявление образования сероводорода (под цифрой II), образования индола (III), образования аммиака (IV) – с помощью фильтровальной бумаги, пропитанной соответствующим раствором.



Рост анаэробов в молоке:

сворачивание молока с образованием крупноячеистого сгустка с пузырьками газа ("штормовая реакция")

Факторы вирулентности

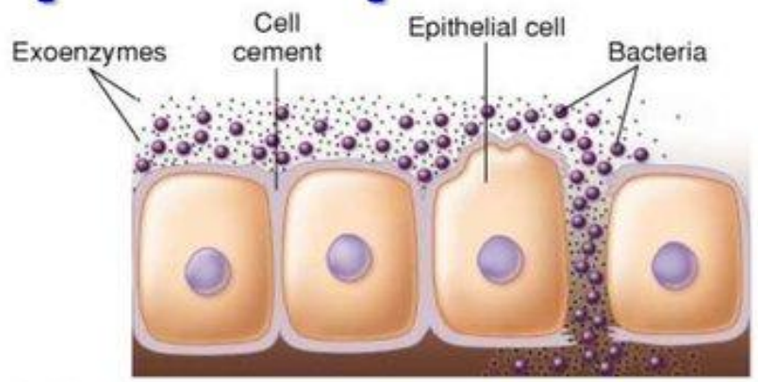
- адгезия - способность микроорганизмов прикрепляться (адсорбироваться) на клетках
- колонизация - размножаться на их поверхности
- инвазия - проникать в клетки или в подлежащие ткани
- агрессия - противостоять факторам неспецифической резистентности и иммунной защиты организма

Факторы патогенности микроорганизмов.

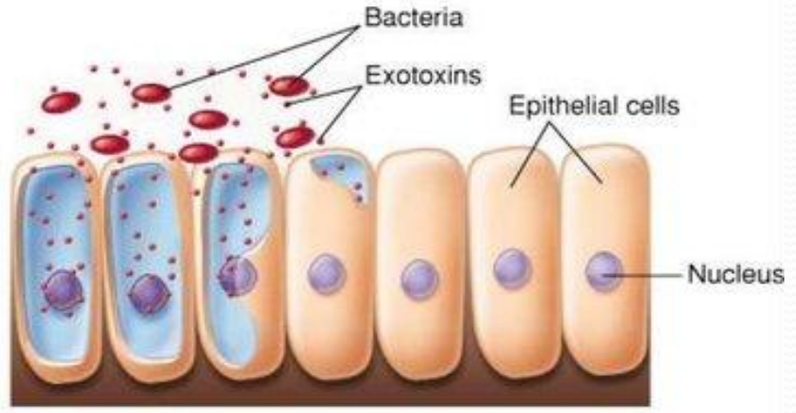
- **Факторы патогенности** – *факторы инфекционного агента (возбудителя), вызывающие серьезные нарушения в клетках или органах макроорганизма, тем самым способствующие становлению инфекционного процесса.*
- В зависимости от наличия факторов патогенности все микроорганизмы подразделяются на:
- **патогенные** (от греч. *patos* – болезнь) – болезнетворные, т.е. способные вызвать инфекционное заболевание;
- **условно-патогенные** – вызывают заболевания при определенных условиях;
- **сапрофитные** (от греч. *sapros* – гнилой и *phyton* – растения) – непатогенные/неболезнетворные, не вызывают заболевания у человека.

Характеристика факторов агрессии

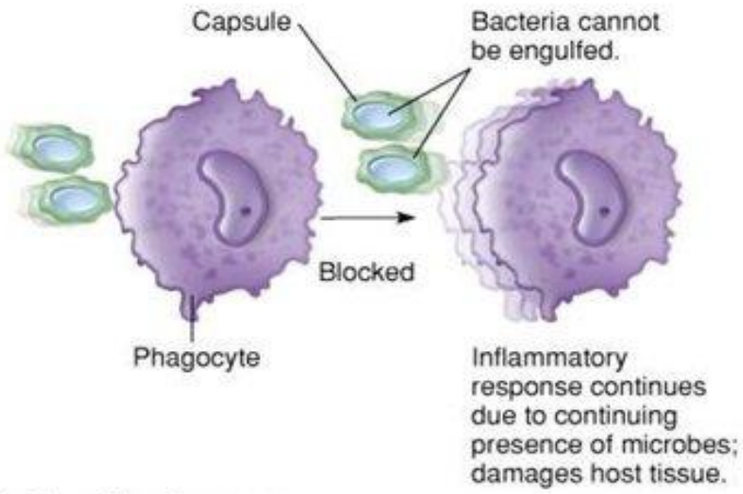
- **Вещества, входящие в состав клеточных структур** (капсулы, КС) – препятствуют фагоцитозу и действию антител
- **Продукция ферментов агрессии** (агрессивности)
  - **протеазы – разрушают антитела**
  - **коагулаза – свёртывает плазму крови**
  - **фибринолизин – растворяет сгустки фибрина**
  - **лецитиназа – расщепляет лецитин клеточных оболочек**
- **Токсины**



(a) **Exoenzymes**



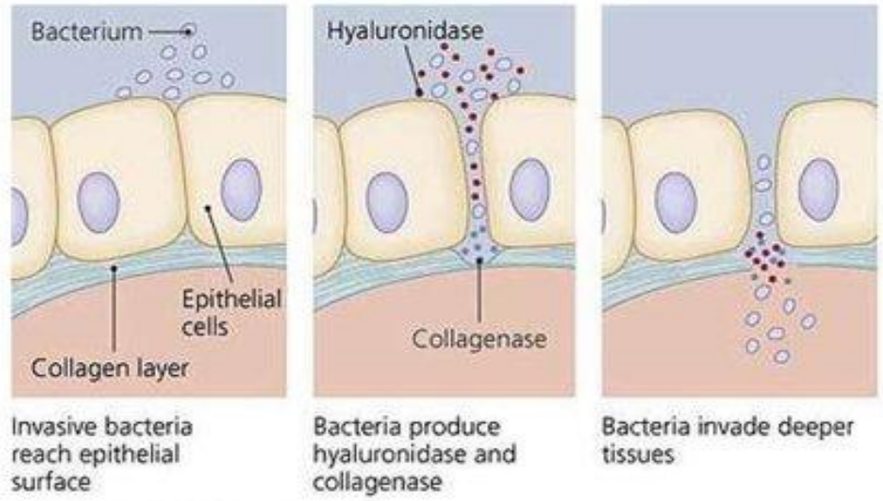
(b) **Toxins**

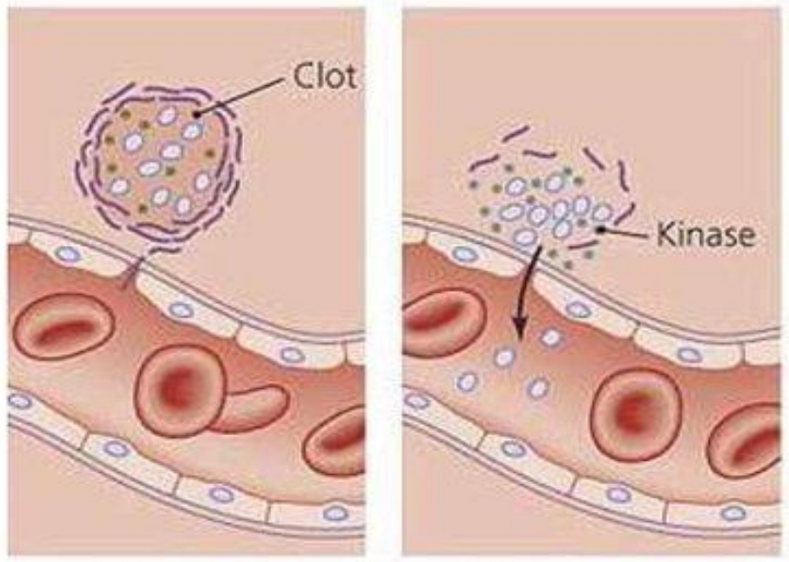


(c) **Induction of host response**

Характеристика основных ферментов инвазии и агрессии

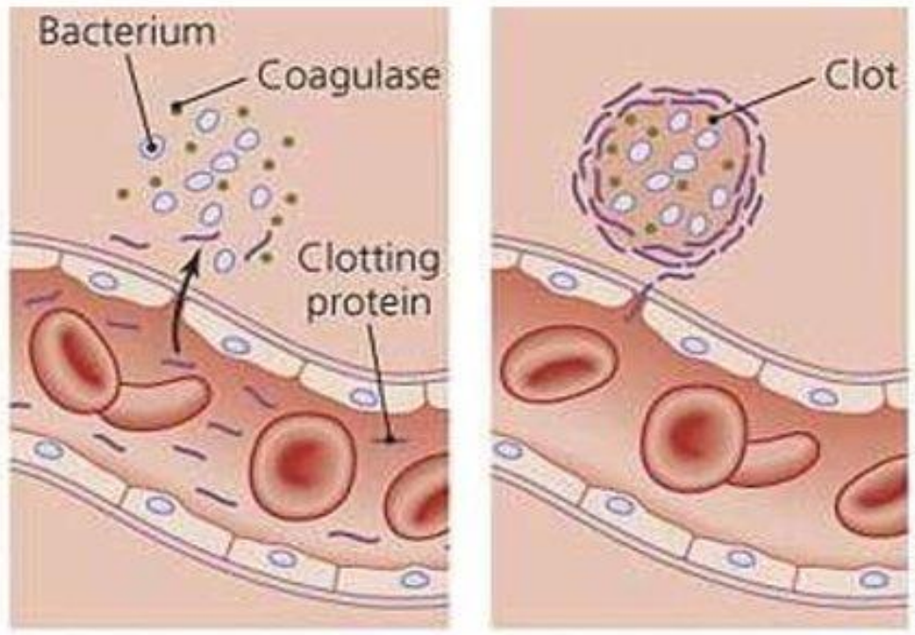
- **Гиалуронидаза, коллагеназа, ММР**
  - разрушение межклеточного вещества соединительной ткани
- **Нейраминидаза (сиалидаза)**
  - расщепление сиаловой кислоты, входящей в состав поверхностных рецепторов клеток слизистых оболочек, что делает их доступными для взаимодействия с микробами и их токсинами
- **Фибринолизин *(Streptokinase, Staphylokinase)***
  - растворение сгустка фибрина в зоне воспаления → распространение микробов вглубь органов и тканей





Характеристика основных ферментов инвазии и агрессии

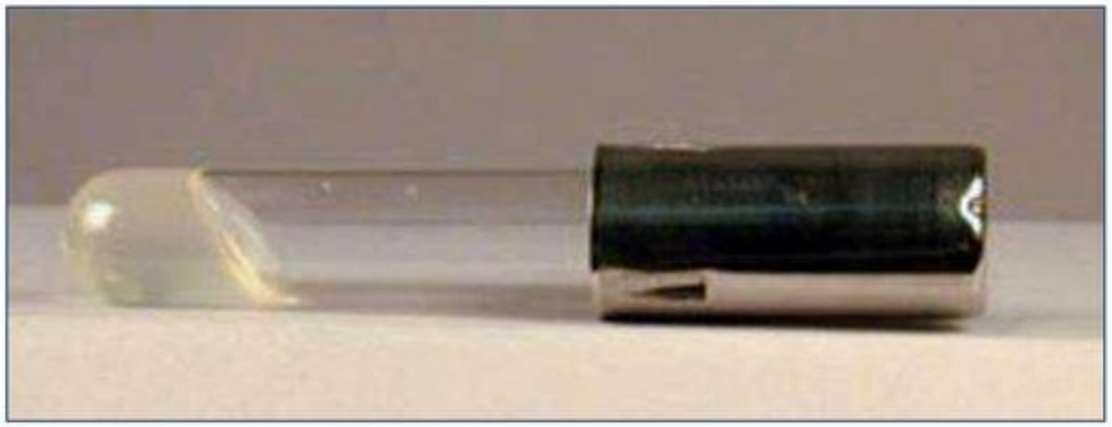
- **Лецитиназа**
  - – действует на лецитин мембран мышечных волокон, эритроцитов и др. клеток
- **Коагулаза**
  - – свертывает плазму крови
- **ДНКаза**
  - – деполимеризует ДНК
- **Протеазы**
  - – разрушают антитела

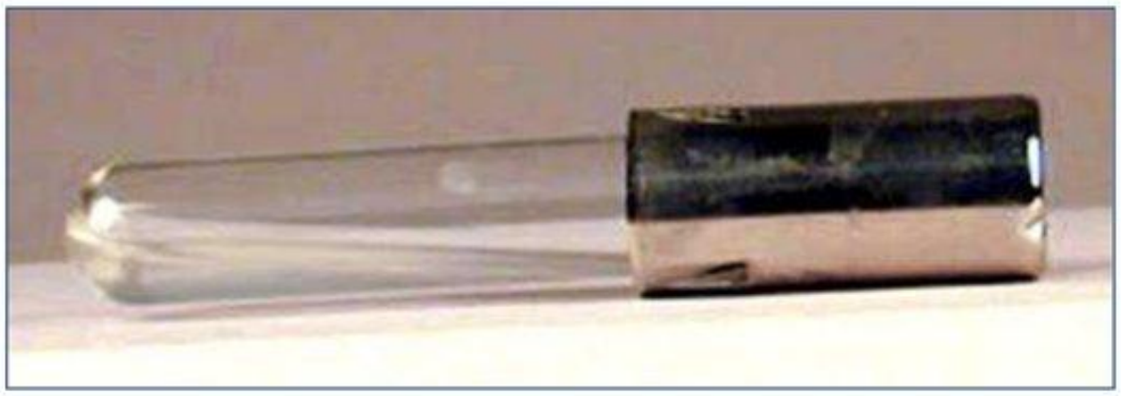


Bacteria produce coagulase

Clot forms

Коагулазный тест Staphylococcus aureus (положительный) и Staphylococcus epidermidis (отрицательный).



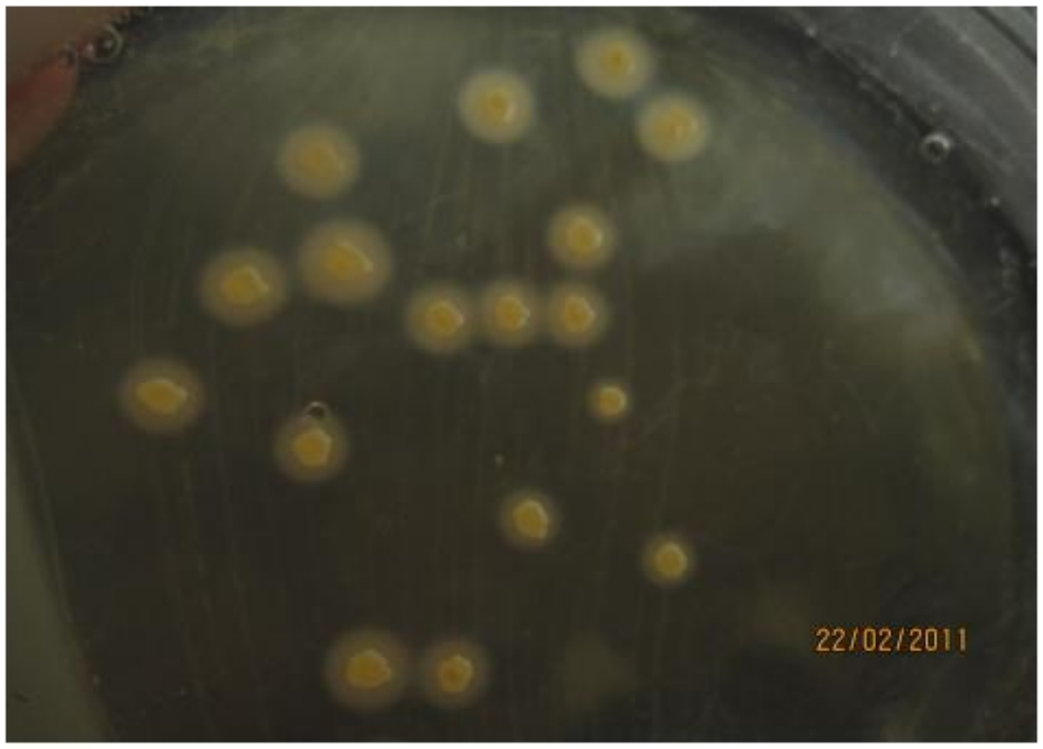


тест на плазмокоагулазу:

культуру микроорганизмов вносят в пробирку с 0,5 мл плазмы крови кролика, помещают в термостат при 37°С, через 3 часа пробирку вынимают, оставляют при комнатной температуре на 18 - 20 часов.

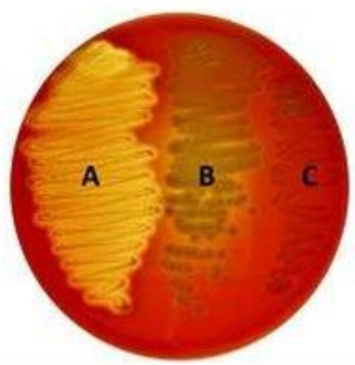
Реакция считается положительной независимо от степени свертывания плазмы - от небольшого сгустка, взвешенного в плазме, до полного неподвижного сгустка.

ЖЕЛТОЧНО-СОЛЕВОЙ АГАР ЧИСТОВИЧА - селективная среда, предназначенная для культивирования стафилококков. Содержит питательный агар, желток куриного яйца, повышенные концентрации хлорида натрия (8-10%), которые не препятствуют размножению стафилококков и обеспечивают элективность среды для данных микробов. Среда позволяет дифференцировать лецитиназопозитивные стафилококки, вокруг колоний которых образуются зоны помутнения с перламутровым оттенком.



Среды с комбинированными свойствами

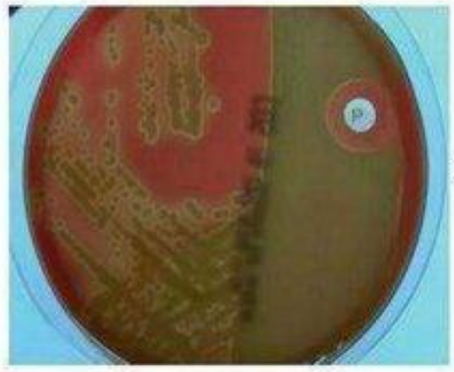
- ***Кровяной агар и его производные*** – являются одновременно обогащенными и дифференциально-диагностическими питательными средами.
- В данных средах содержится 5-10% крови, которая стимулирует рост различных прихотливых микроорганизмов.
- Дифференциально-диагностические свойства проявляются как образование зон гемолиза вокруг колоний некоторых микроорганизмов, хорошо заметных на фоне непрозрачно-красного кровяного агара:
- *Альфа-гемолиз* выглядит как зеленовато-коричневая зона, возникающая в результате перехода гемоглобина в метгемоглобин (*Streptococcus pneumoniae)*.
- *Бета-гемолиз (полный гемолиз)* представляет собой полное разрушение эритроцитов и выглядит как прозрачная зона вокруг колонии (*Streptococcus pyogenes* и *Staphylococcus aureus)*.



Бета-гемолитический стрептококк группы А, S.pyogenes

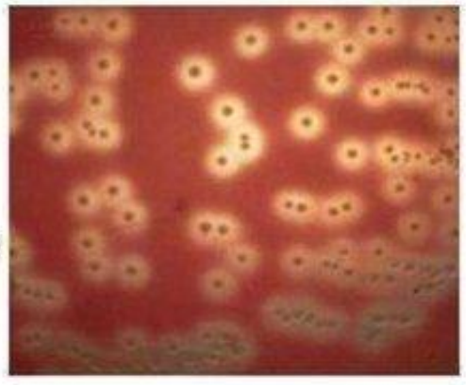
Встречается повсеместно. Колонизирует кожу и слизистые. Основной путь передачи– воздушно-капельный. Патогенность БГСА обусловлена продукцией токсинов– гемолизин, стрептолизин, стрептокиназа, гиалуронидаза

Кровяной агар для определения гемолитической активности стрептококков



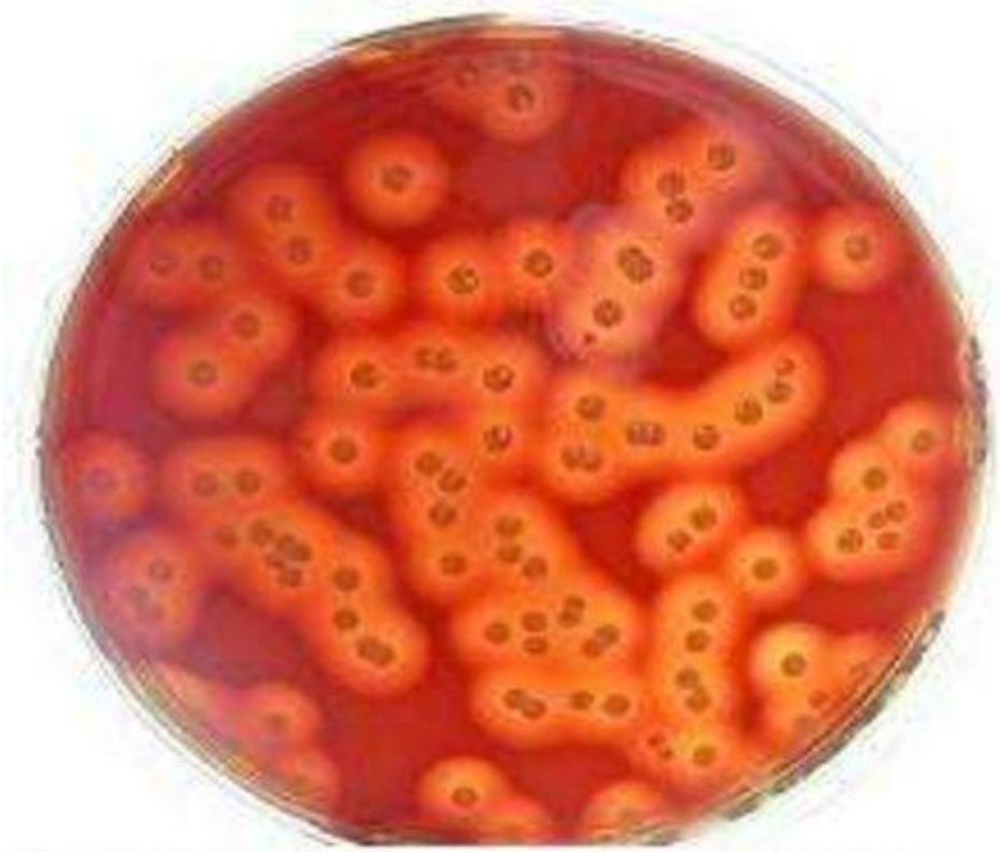
α – гемолиз

γ – гемолиз, без гемолиза



β-гемолиз

Стафилококки – рост на кровяном агаре



Стафилококки, рост на кров яном агаре.

Вокруг колоний видны зоны полного гемолиза

Рост негемолитических стафилококков на кровяном агаре.

Ускоренные методы биохимической идентификации

- **СИБ = системы индикаторных бумажек** = набор дисков, пропитанных субстратами, их вносят в пробирки или на чашки с чистой культурой.
- **набор мультимикротестов** =пластиковые планшеты, в лунки которых помещены субстраты с индикаторами → в лунки вносят бактерии, инкубируют 4 часа при 37° → учитывают результаты

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СРЕДЫ

используют для определения видовой принадлежности исследуемого микроба, основываясь на особенностях его обмена веществ.

ИЗБИРАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ.

В таких средах созданы благоприятные условия для развития одного вида микроорганизма, размножение всех остальных видов микробов угнетается.

А. Биохимическая идентификация

- Тест-системы Vitek

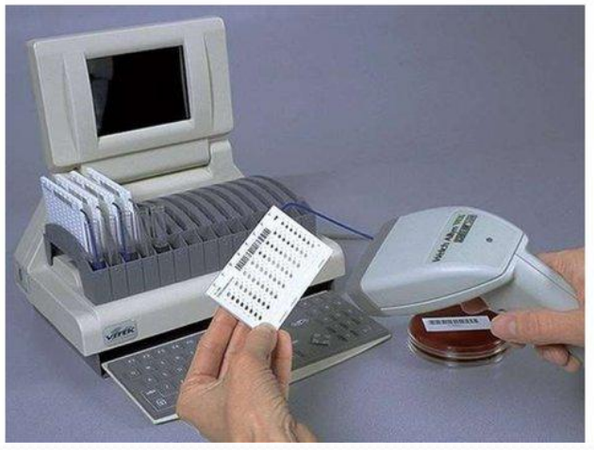


Схема выделения чистой культуры облигатных анаэробов.

- *3-й этап - идентификация выделенных облигатных анаэробов.*
- Проводят биохимическую идентификацию в микротест-системе, например АР1-20А. **Суспензию выделенной культуры засевают на пластину АР-20А с набором биохимических гестов, инкубируют в анаэробных условиях в течение 48 часов,** учитывают биохимические свойства культуры по изменению окраски индикаторов системы и определяют ее родовую и/или видовую

Дыхание бактерий

Дыхание, или биологическое окисление, основано на окислительно-восстановительных реакциях, идущих с образованием **АТФ** — универсального аккумулятора химической энергии. 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. Акцептором водорода или электронов может быть молекулярный кислород — такое дыхание называется ***аэробным***, а если акцептором служат нитрат, сульфат, фумарат, то такое дыхание называется анаэробным (нитратным, сульфатным, фумаратным).

Анаэробиоз (от греч. отрицательная приставка — an + aeros — воздух + bios — жизнь) — жизнедеятельность, протекающая при отсутствии свободного кислорода.

Особенности энергетических процессов у микроорганизмов

Способы получения энергии у микроорганизмов различны:

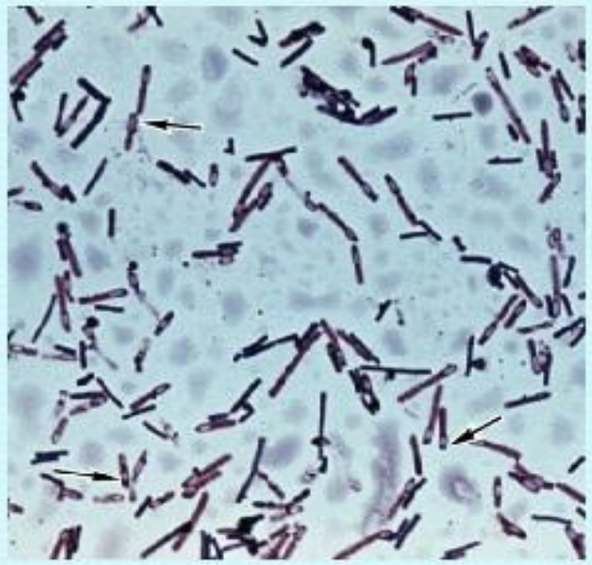
- окисление у м/о идет до конца, до образования $C0_2$ и H_20.
- неполное окисление органических веществ в присутствии кислорода воздуха с образованием промежуточных недоокисленных продуктов.
- окисление органических веществ с помощью кислорода, находящегося в соединениях, богатых им, - **нитратов** (***нитратное дыхание***) или **сульфатов** (***сульфатное дыхание***).
- путем процесса брожения (без участия кислорода).

Все способы сводятся к окислению молекул различных восстановленных веществ и восстановлению молекул других окисляющих веществ. Эти реакции - **биологическое окисление.**

ДЫХАНИЕ БАКТЕРИЙ

Дыхание (или биологическое окисление) микроорганизмов представляет собой совокупность биохимических процессов, в результате которых освобождается энергия, необходимая для жизнедеятельности микробных клеток.

БАКТЕРИИ



АЭРОБЫ

микроорганизмы, которые развиваются и размножаются в среде, содержащей свободный кислород.

АНАЭРОБЫ

микроорганизмы, которые развиваются и размножаются в среде, не содержащей свободный кислород.

ФАКУЛЬТАТИВНЫЕ И ОБЛИГАТНЫЕ АНАЭРОБЫ И АЭРОБЫ

Дыхание бактерий

В зависимости от потребностей в кислороде бактерии делятся на:

- **Облигатные (строгие) аэробы** – используют в качестве акцептора водорода лишь свободный кислород, снижение его содержания приводит к прекращению роста микробов; накопление перекиси водорода нейтрализуется ферментами каталазой, пероксидазой, супероксиддисмутазой (туберкулезная, дифтерийная палочки, холерный вибрион);
- **Облигатные (строгие) анаэробы** – растут только в бескислородной среде, не имеют фермента каталазы, разрушающего перекись водорода, накапливающуюся в присутствии кислорода и оказывающую бактерицидное действие на анаэробы (возбудители ботулизма, столбняка и т.д.); для анаэробов O_2 – яд!!! Нет фермента каталазы, нейтрализующего H_2O_2, образующуюся в присутствии O_2.
- **Факультативные анаэробы** – растут как в присутствии кислорода, так и без него (большинство бактерий – дизентарийная, брюшнотифозная палочки, стафилококки и стрептококки и др.)
- ***Микроаэрофилы (капнофилы)*** – лучше растут при повышенном содержании CO_2 и сниженном содержании кислорода (кампилобактерии и др.).

Аэротолерантность облигатных анаэробов – их способность сохранять жизнеспособность в присутствии кислорода.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ АНАЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

- Выращивание анаэробных микроорганизмов более сложно, чем культивирование аэробов, так как контакт их клеток с кислородом воздуха должен быть сведен к минимуму или даже полностью исключен. Для этого используют разные приемы, нередко комбинируя их друг с другом.

Культивирование аэробных и анаэробных микроорганизмов

2. Культивирование <u>анаэробных микроорганизмов</u> более сложно, чем выращивание аэробов (должен быть минимальным контакт микроорганизмов с молекулярным кислородом).

Микроорганизмы культивируют в замкнутом пространстве и используют ***физические, химические и биологические*** *методы* создания анаэробных условий:

- **<u>К физическим методам</u>** относится культивирование в микроанаэростате. Это вакуумный аппарат для выращивания микроорганизмов, в котором воздух замещен газовой смесью (часто это такой состав: азот с 5% CO_2 и 10% H_2).
- **<u>К химическим методам</u> относится:**

1) использование химических веществ, поглощающих молекулярный кислород (щелочной раствор пирогаллола, дитионит натрия ($Na_2S_2O_4$), металлическое железо и др.).
2) использование восстанавливающих агентов, которые добавляют в большинство сред для снижения окислительно-восстановительного потенциала среды: тиогликолат натрия, цистеин, аскорбиновая кислота.

Для культивирования строгих анаэробов создаются условия, позволяющие удалить атмосферный O_2 (механические, химические, биологические)

- Приборы: анаэростаты, анаэробные боксы (удаление воздуха, затем заполнение емкости инертным газом), CO_2 инкубаторы, эксикаторы со свечой

•система “Газпак” со специальными газорегенерирующими пакетами действующими по принципу вытеснения атмосферного воздуха газовыми смесями в герметически закрытых емкостях

Физические методы

- 1.культивирование в анаэростате (выкачивается воздух) или аппарате Киппа (замещается инертным газом, например азотом)
- 2. использование трубки Виньяла-Вейона (смешивание м/о с расплавленной и охлаждённой питательной средой с её последующим застыванием – глубинное культивирование)
- 3. посев уколом в высокий столбик (полужидкой среды)

Создание анаэробных условий. Микроанаэростат

- ✓Анаэростат представляет собой цилиндрическую ёмкость, герметично закрываемую с помощью ленточного замка.
- ✓В крышку вмонтирован вакуумметр и вентиль для присоединения вакуумного насоса и внешней системы источника газа.

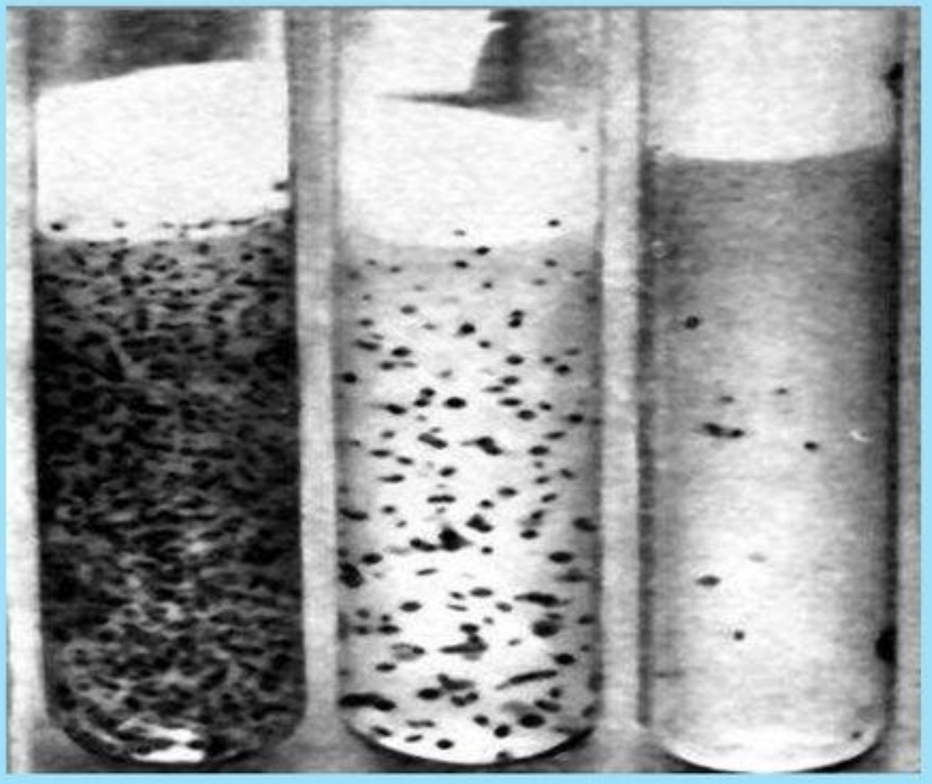
- С использованием насоса удаляется воздух и накачивается бескислородная газовая смесь, содержащая 80% N_2, 10% CO_2 и 10% H_2.
- Палладиевые или платиновые катализаторы обеспечивают удаление остатков кислорода, катализируя связывание O_2 с H_2.
- Создание анаэробных условий возможно с помощью химических газогенерирующих пакетов
- Использование микроанаэростатов позволяет производить посев облигатных анаэробов на обычные чашки Петри, обеспечивая простоту выделения чистых культур, а также расширяет спектр выделяемых микроорганизмов (например, позволяя культивировать представителей рода *Bacteroides*).

Аналоги анаэростата

Методы культивирования анаэробных микроорганизмов

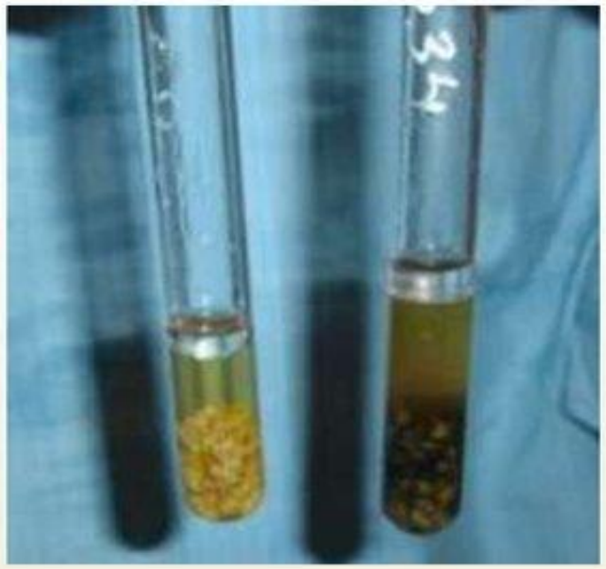
Рис. 56. Посев уколом.

Посев уколом анаэробных бактерий в столбик сахарного агара

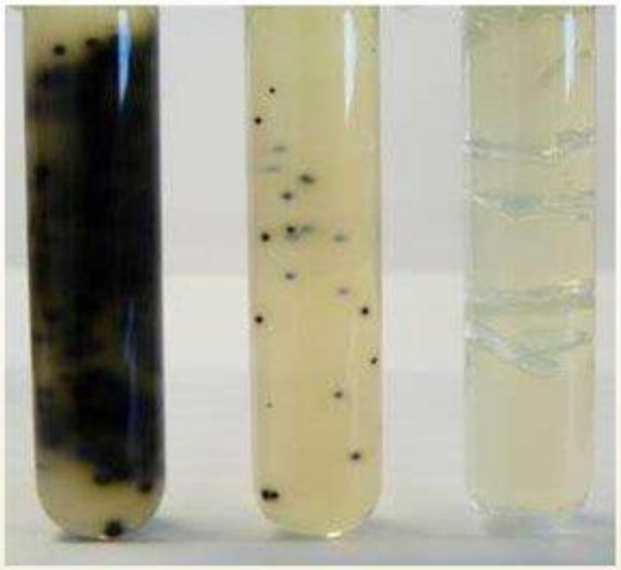


Изолированные по методу Вейнберга колонии анаэробов в сахарном агаре

Создание анаэробных условий



- Кислород удаляется при **кипячении** жидкой питательной среды вследствие снижения его растворимости в воде.
- После посева поверхность среды заливается вазелиновым маслом или парафином для предотвращения попадания кислорода в ходе инкубации.



- **Посев в высокий столбик** полужидкой или плотной питательной среды
- Можно культивировать сравнительно нетребовательные к анаэробным условиям микроорганизмы (например, некоторых представителей родов *Clostridium* и *Bifidobacterium*).
- На фото рост клостридий на среде Вильсон-Блер

Химические методы

- А. Добавление в среду культивирования химических веществ = поглотителей кислорода,

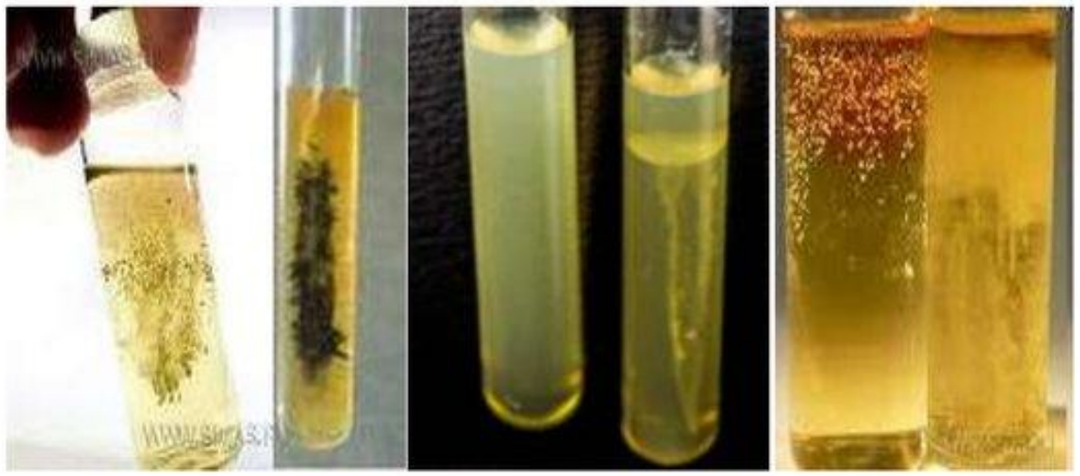
- в замкнутом объёме протекает химическая реакция с поглощением кислорода

- 2 метода:
  - метод Аристовского (сыпучие ингредиенты)
  - метод Омелянского (жидкие ингредиенты),

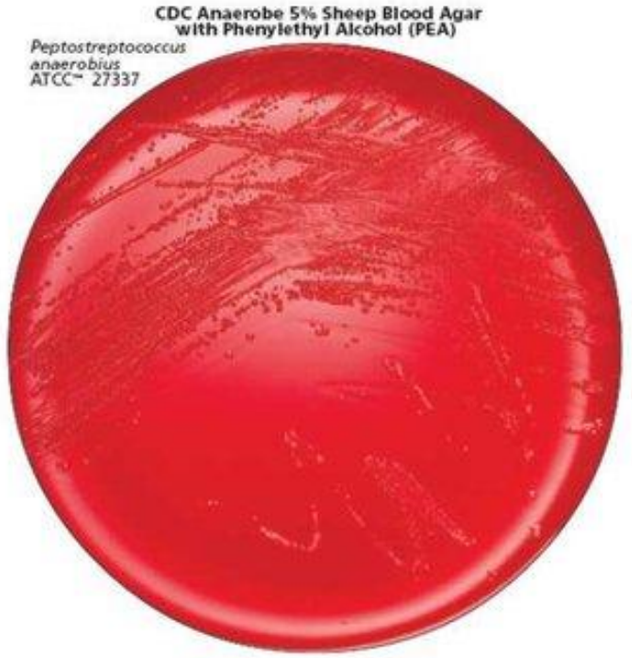
- Б. включение в питательную среду редуцирующих веществ (связывают растворённый в среде кислород)
  - глюкоза
  - тиогликолевая кислота и др.

Культивирование

Использование элективных сред



Среда Вильсона-Блера
Среда Китта-Тароцци
Среда контроля стерильности
и другие
Биохимические тест-системы



Питательные среды для анаэробов:

- Анаэробный кровяной агар (в т.ч. с селективными добавками – неомицин или канамицин, гентамицин или др. – для подавления роста факультативно-анаэробных МО).
- Желточный агар.
- Среда для контроля стерильности (СКС).
- Среда для исследования крови на бактериемию.
- Среда Китта-Тароцци – с добавлением кусочков печени и вазелиновым маслом на поверхности.
- Среда Вильсона-Блера – для ускоренной диагностики газовой гангрены (среда с возбудителем через 4-6 часов чернеет и в ней появляются разрывы за счет выделяемого газа)
- Лакмусовое молоко. Для ускоренной диагностики газовой гангрены – через 2-4 часа при 42 С в среде появляется коричнево-красный творожистый осадок казеина, пронизанный пузырьками газа.
- Сахарный агар. Используют для выделения анаэробов методом Вейнберга, Вейона-Виньяля, Перетца.
- Среды для определения сахаролитических свойств анаэробов.

СРЕДА КИТТА-ТАРОЦЦИ

Среда Китта-Тароцци — содержит кусочки печени, обладающие высокой адсорбционной способностью, 0.5% глюкозы. Перед посевом среду кипятят на водяной бане не менее 15 минут, сверху заливают слоем вазелиного масла, чтобы предохранить посев от проникновения кислорода.

Professor Dr. Theodor Kitt (1858-1941)

Giulio Tarozzi (1868-1948)

Среда Вильсона — Блера

W. J. Wilson, 1879-1954, англ. бактериолог;
E. M. Blair;

Содержит глюкозу, сернисто-кислый натрий, хлорид железа. Анаэробы образуют черные колонии за счет восстановления сернисто-кислого натрия в сернистый натрий, который, соединяясь с хлоридом железа, образуют осадок черного цвета -сернистое железо.

Культивирование аэробных и анаэробных микроорганизмов

- **К биологическим методам** создания анаэробных условий **относится:**

✓ выращивание совместно с аэробными или факультативно анаэробными бактериями. Например, питательную среду в чашке Петри разделяют желобком на две половины, на одну половину засевают какой-либо аэробный микроорганизм, на другой - анаэроб. Края чашки заливают парафином. Рост анаэробного микроорганизма начнется только после полного использования кислорода аэробом.

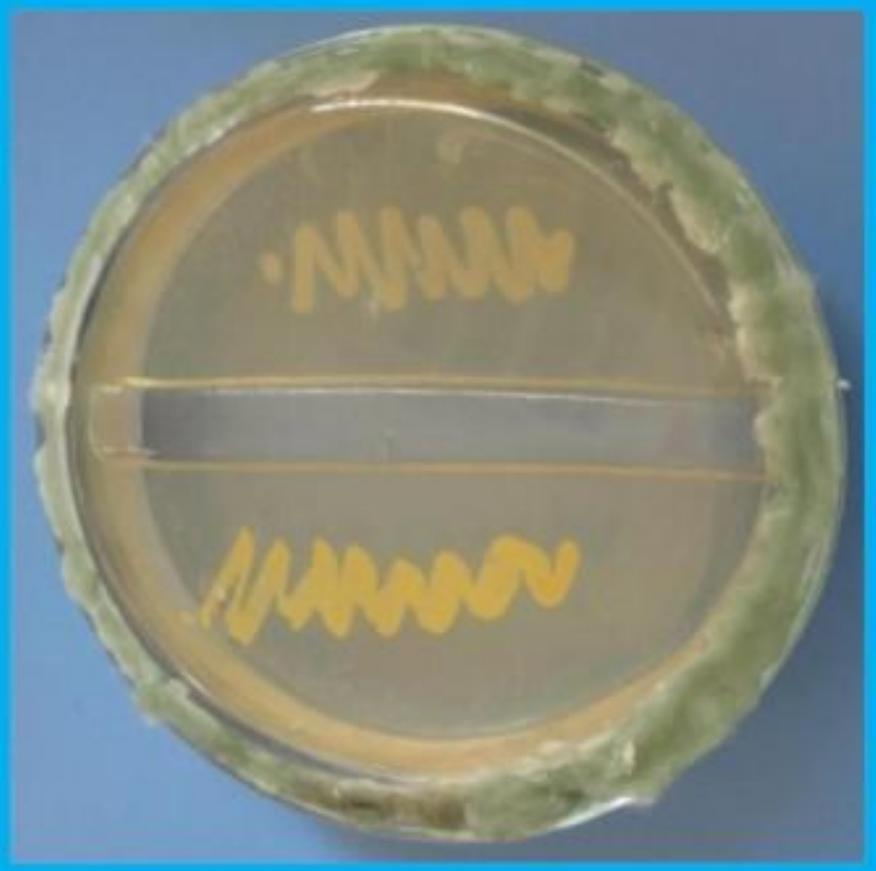
✓ выращивание в высоком слое среды;

✓ выращивание в толще плотной среды;

✓ культивирование в вязких средах, в которых диффузия молекулярного кислорода в жидкость уменьшается с увеличением ее плотности;

✓ заливка среды с посевом высоким слоем стерильного вазелинового масла или парафина.

СОВМЕСТНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ АЭРОБОВ И АНАЭРОБОВ (МЕТОД ФОРТНЕРА)



В чашке с сахарным агаром вырезается «полоска» для невозможности смешивания разных культур бактерий.

С одной стороны выполняется посев культуры аэробных бактерий, с другой – умеренно строгих анаэробов.

Чашка закрывается, ее края запаиваются парафином (с целью не допустить попадания воздуха, кислорода внутрь чашки). Сначала вырастают в присутствии кислорода аэробы, а затем – анаэробы.

РОСТ И РАЗМНОЖЕНИЕ БАКТЕРИЙ

- Термин «**рост**» означает увеличение цитоплазматической массы отдельной клетки или группы бактерий в результате синтеза клеточного материала (например, белка, РНК, ДНК). Достигнув определенных размеров, клетка прекращает рост и начинает размножаться.
- Под **размножением** микробов подразумевают способность их к самовоспроизведению, увеличению количества особей на единицу объема. Иначе можно сказать: размножение — это повышение числа особей микробной популяции.

Способы размножения бактерий

- Бинарное деление

  Большинство бактерий:
  - **перегородка формируется от КС к центру клетки – $Г^+$**
  - **перетяжка клетки (клетка истончается посередине) – $Г^-$**
- Почкование
  - **Francisella**
  - **Микоплазмы**
  - **дрожжи**
- Фрагментация нитевидных форм
  - **Актиномицеты**
  - **Микоплазмы**
- Экзоспоры

  Стрептомицеты
- Особый цикл деления

  Хламидии

Размножение бактерий

- Происходит путем поперечного деления:

1 стадия - перераспределение генетического материала

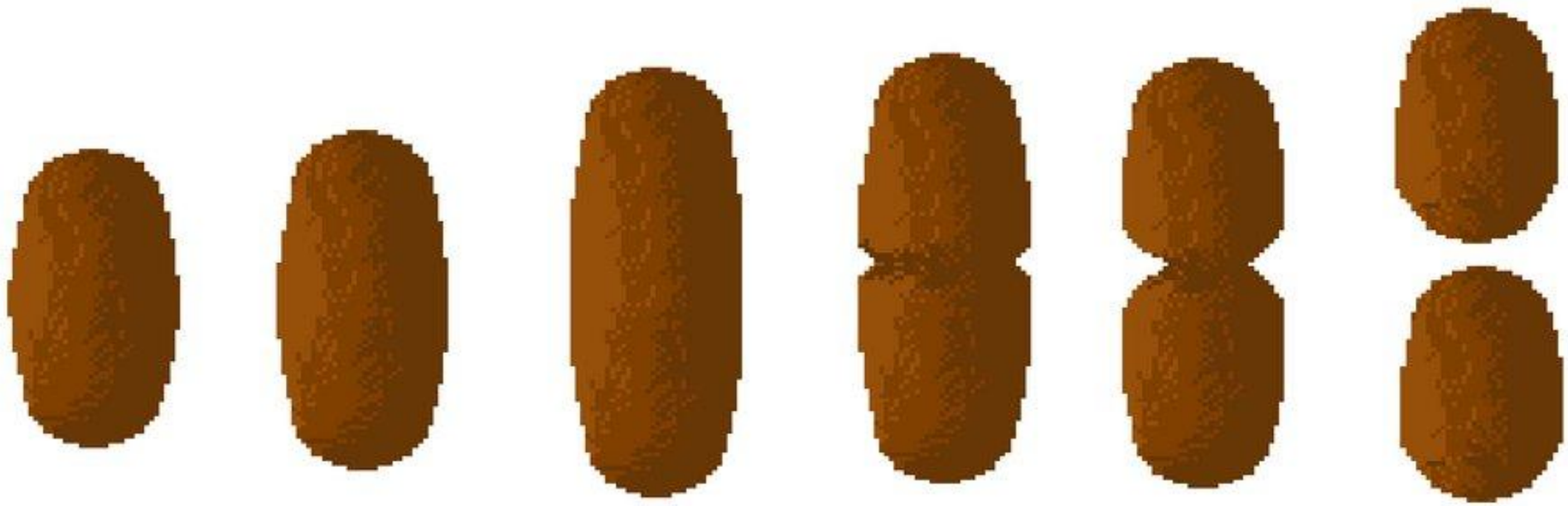
2 стадия – образование межклеточной перегородки путем инвагинации ЦПМ и клеточной стенки

3 стадия – расхождение клеток

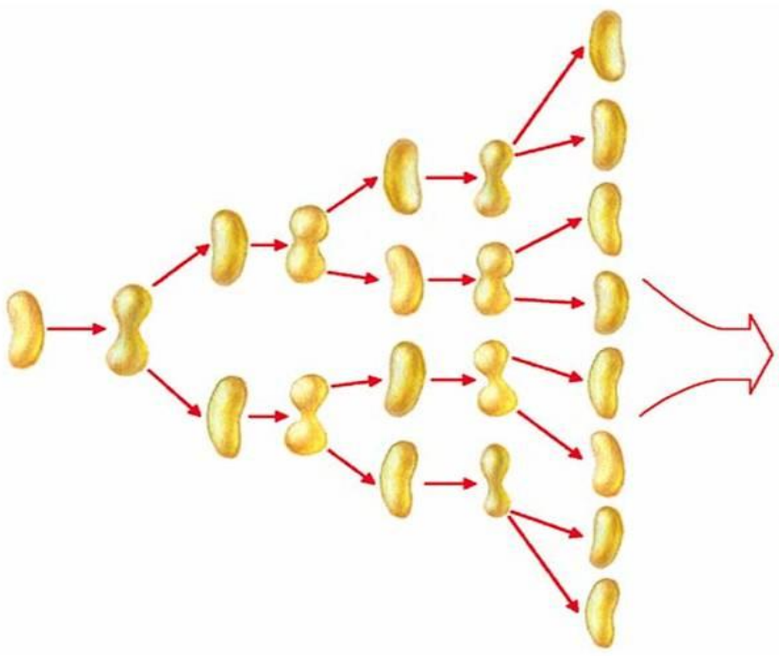
Размножение бактерий

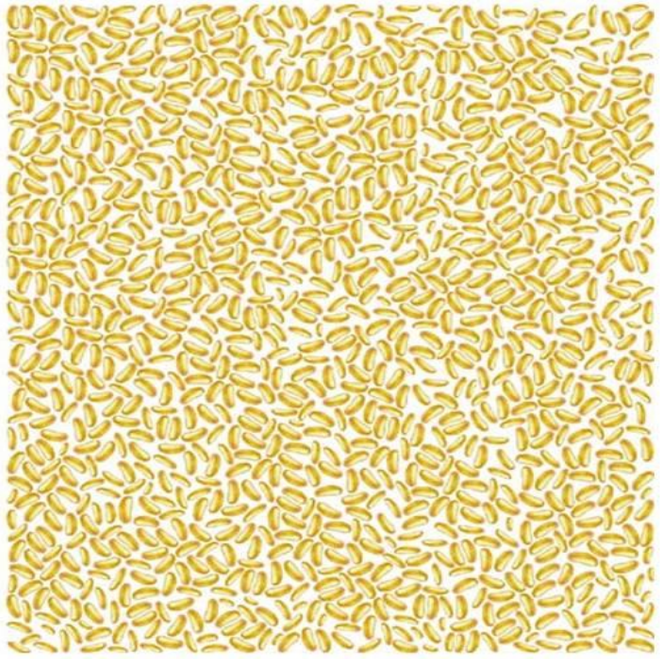
Размножаются бактерии делением одной клетки на две. Достигнув определённого размера, бактерия делится на две одинаковые бактерии.

Схема деления бактерии



Размножение бактерий





Клетки бактерий при благоприятных условиях очень быстро размножаются, делясь надвое.
Если клетка удваивается каждые пол часа, то за сутки она способна дать 281474976710656 потомков.
А некоторые бактерии способны размножаться еще быстрее

Делению клеток предшествует репликация бактериальной хромосомы по полуконсервативному типу (двуспиральная цепь ДНК раскрывается и каждая нить достраивается комплементарной нитью), приводящая к удвоению молекул ДНК бактериального ядра — нуклеотида. Репликация хромосомной ДНК осуществляется от начальной точки ori (от англ. origin- начало). Хромосома БК связана в области ori с ЦПМ. Репликация ДНК катализируется ДНК-полимеразами. Сначала происходит раскручивание (деспирализация) двойной цепи ДНК, в результате чего образуется репликативная вилка (разветвленные цепи); одна из цепей достраиваясь, связывает нуклеотиды от 5'- к 3'- к концу, другая – достраивается посегментарно.

Репликация ДНК происходит в 3 этапа:

1.инициализация 2. элонгация 3. терминация.

Образовавшиеся в результате репликации 2 хромосомы расходятся, чему способствует увеличение размеров растущей клетки: прикрепленные к ЦПМ хромосомы, по мере увеличения объема клетки удаляются друг от друга. Окончательное их обособление завершается образованием перетяжки или перегородки деления. Клетки с перегородкой деления расходятся в результате действия аутолитических ферментов, разрушающих сердцевину перегородки деления. Аутолиз при этом происходит неравномерно: делящиеся клетки в одном участке остаются связанными частью КС в области перегородки деления. Такие клетки располагаются под углом друг к другу

Размножение бактерий в жидкой питательной среде

Бактерии, засеянные в определенный объем питательной среды, размножаются, потребляют питательные вещества, что приводит к истощению питательной среды и прекращению роста бактерий.

Фазы роста

Рост периодической культуры бактерий, выращиваемых на жидкой питательной среде, подразделяют на несколько фаз:

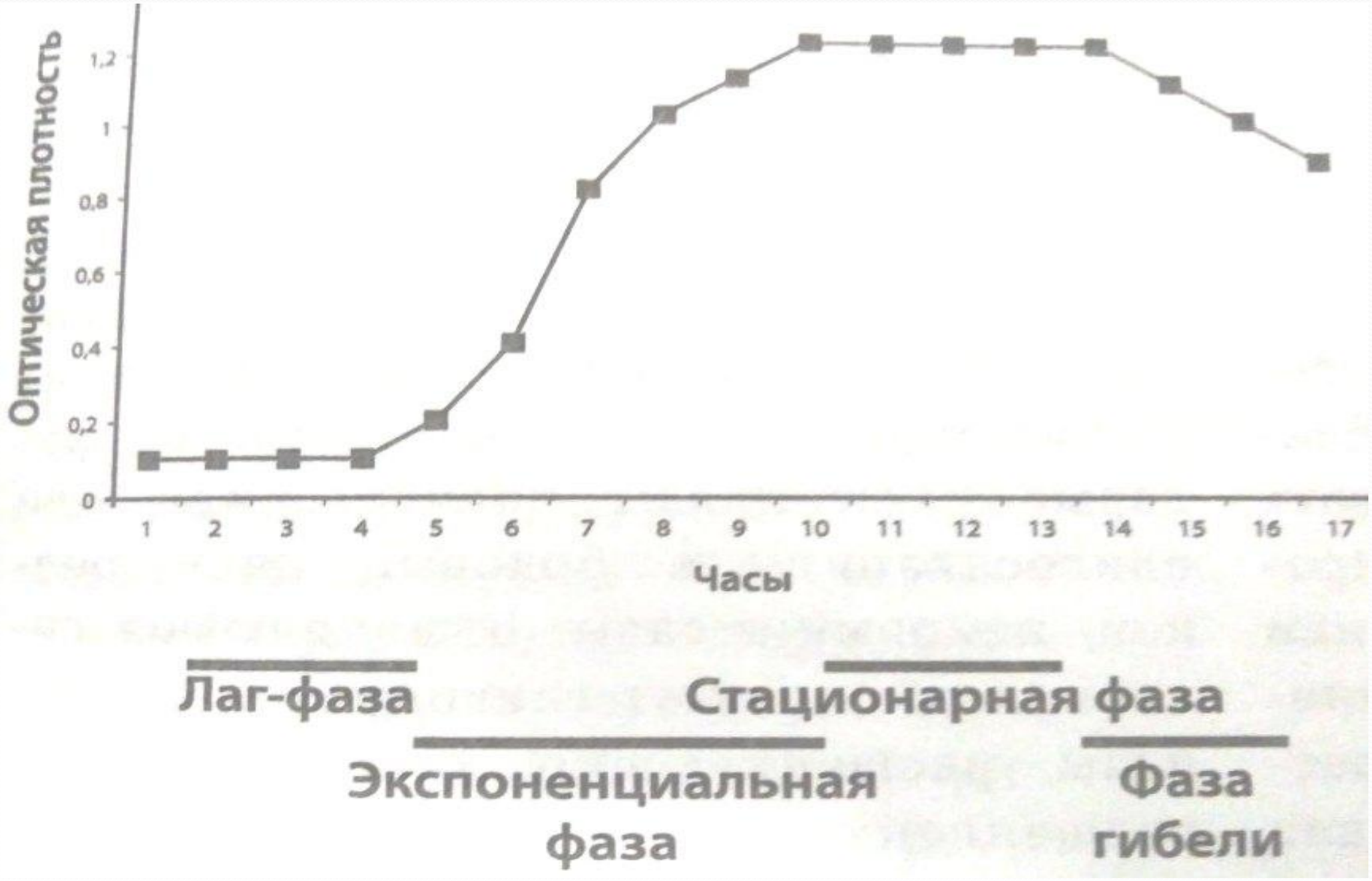
1. лаг-фаза — период между посевом бактерий и началом размножения. Продолжительность лаг-фазы в среднем 4—5 ч. Бактерии при этом увеличиваются в размерах и готовятся к делению; нарастает количество нуклеиновых кислот, белка и других компонентов.

2. фаза логарифмического роста является периодом интенсивного деления бактерий. Продолжительность ее около 5— 6 ч. При оптимальных условиях роста бактерии могут делиться каждые 20—40 мин.

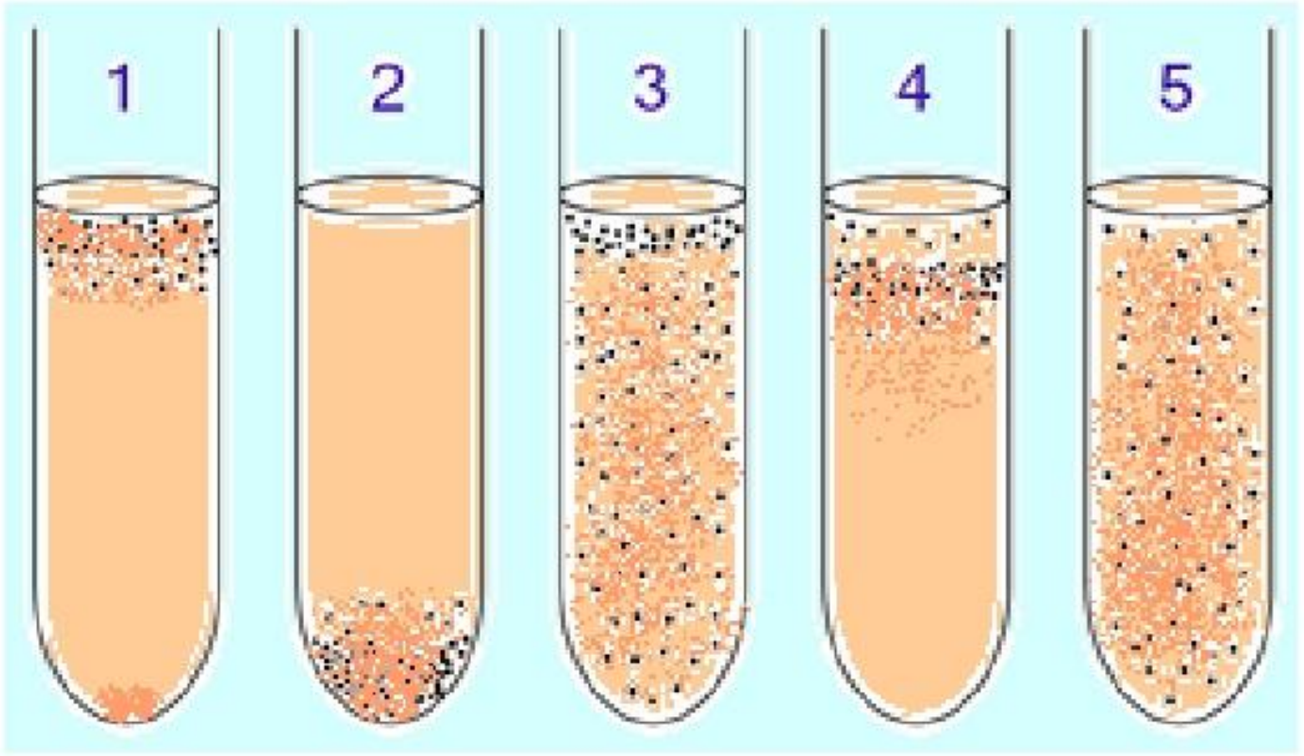
3. фаза стационарного роста, или максимальной концентрации бактерий;(количество жизнеспособных клеток остается без изменений, составляя максимальный уровень (М-концентрация)).

4. фаза гибели бактерий (характеризуется отмиранием бактерий в условиях истощения источников питательной среды и накопления в ней продуктов метаболизма бактерий)

При размножении бактерий в жидкой питательной среде можно наблюдать последовательную смену фаз



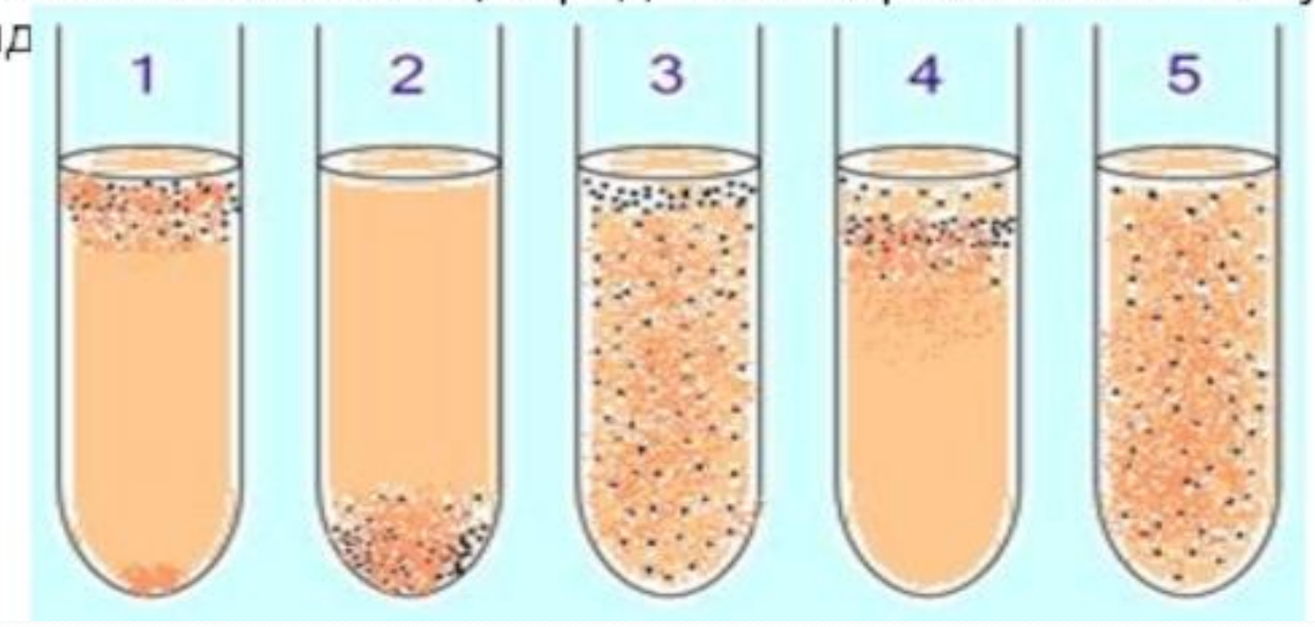
ОТНОШЕНИЕ БАКТЕРИЙ К КИСЛОРОДУ



1. **Облигатные аэробные** бактерии *в основном* собираются в верхней части пробирки.
2. **Облигатные анаэробные** бактерии собираются в нижней части.
3. **Факультативные** бактерии собираются в основном в верхнем слое и на всем протяжении среды, так как от O_2 не зависят.
4. **Микроаэрофилы** собираются в верхней части пробирки, но их оптимум — малая концентрация кислорода.
5. **Аэротолерантные** анаэробы не реагируют на концентрации O_2 и равномерно распределяются по пробирке.

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



Питательные среды

Питательные субстраты – плотные или жидкие – называют культуральными или питательными средами

Питательные среды

Питательные среды должны обязательно отвечать основным требованиям:

- они должны содержать в достаточном количестве все необходимые питательные вещества (источники энергии, углерода, азота), соли и ростовые факторы;
- должны иметь определенные, значения pH, осмотические и другие физико- химические свойства, оптимальные для роста данного вида бактерий;
- должны иметь достаточную влажность (при их усыхании повышается концентрация питательных веществ, особенно солей, до уровней, тормозящих рост бактерий).
- питательные среды для лучшего определения культуральных свойств бактерий должны быть по возможности прозрачными.
- должны быть стерильными, не содержать посторонней микрофлоры.

Микробиологические питательные среды – это субстраты, предназначенные для культивирования (выращивания) микроорганизмов в лабораторных условиях

I. **По происхождению**:

1. естественные (натуральные) – неизмененные нативные (природные) компоненты (сыворотка крови, яичный белок и т.д.);
2. искусственные – готовят из пищевых продуктов путем соответствующей обработки
3. синтетические – состоят из растворов химически чистых соединений в точно установленных дозировках

II. **По составу:**

1. простые
2. сложные

III. **По консистенции:**

1. жидкие
2. полужидкие – 0,3-0,7% агар-агара
3. плотные – 1,5-2% агар-агара

IV. **По назначению:**

1. основные или универсальные (МПА, МПБ)
2. специальные – сложные среды для требовательных микроорганизмов (Левенштейна-Йенсена)
3. элективные (пептонная вода, селенитовая среда, солевой агар)
4. дифференциально-диагностические (среда Гисса, Эндо, Левина, Плоскирева)

- Агар – полисахарид, добываемый из морских водорослей определенных видов; используется для уплотнения питательных сред в бактериологии по такому же алгоритму, как в быту крахмал или желатин
- Свернутые питательные среды – это плотные среды, содержащие сыворотку крови или обогащенные белком (яичные, например), которые уплотняются при прогревании в процессе стерилизации
- Натуральные среды готовятся на основе отваров, экстрактов мяса, рыбы, овощей и др. натуральных продуктов
- Простые натуральные среды представляют собой такие отвары или экстракты
- Сложные натуральные среды получают путем добавления в простые натуральные среды любого вещества (красителя, сахара, антибиотика, крови и т.д.)

Классификация искусственных питательных сред

- По консистенции
- **Жидкие** – мясной или рыбный бульон на дистиллированной воде (Питательный бульон),
- **Плотные** – готовятся на основе жидких, добавляют 1,5% *агар-агара* (полисахарид, получ-й из морских водорослей), *силикагеля* или 10-15% *желатины* (Питательный агар)
- **Полужидкие** – готовят на основе жидких, но агар-агара или силикагеля добавляют 0,7%, а желатины – 5-7,5%

Классификация искусственных питательных сред

- По назначению
- **Консервирующие** – применяются для предотвращения отмирания бактерий в патологическом материале (Глицериново-солевая смесь),
- **Основные** – применяются для культивирования большинства бактерий (Питательные бульон и агар),
- **Элективные** – обеспечивают оптимальные условия для выращивания одного вида бактерий (Желточно-солевой бульон для стафилококка, желчный бульон для сальмонелл),
- **Дифференциально-диагностические** – применяются для изучения биохимических свойств при идентификации бактерий (Среды Гисса, Ресселя, Эндо)

Простые питательные среды

- **Мясо-пептонный бульон (МПБ)** является белковой основой всех сред. Готовят на мясной воде с добавлением готового пептона. **Пептон** – продукт неполного переваривания (гидролиза) белка, используется как источник азота и углерода.
- **Мясо-пептонный агар (МПА)** – получают путём добавления к МПБ 1,5 – 3% агар-агара. Агар-агар – продукт из морских водорослей, содержит высокомолекулярные полисахариды

Простые(универсальные, основные) питательные среды

- мясо-пептонный бульон (**МПБ**) — жидкая среда
- мясо-пептонный агар (**МПА**) — плотная среда
- Обеспечивают рост большинства бактерий
- Служат основой для приготовления сложных сред

Сложные среды

(с повышенной питательной ценностью)

- Обогащенные углеводами (сахарный бульон/агар)
- Обогащенные белками (кровяной, сывороточный, асцит бульон/агар)

Дифференциально-диагностические среды

- позволяют отличить один вид микроба от другого на основании разной биохимической активности бактерий.
- В состав дифференциально-диагностических сред входят:

- **основная питательная среда**, обеспечивающая размножение бактерий,

- определенный химический **субстрат**, различное отношение к которому является диагностическим признаком,

- **индикатор**, изменение цвета которого свидетельствует о расщеплении субстрата и образовании конечных продуктов.

Дифференциально-диагностические среды

- Позволяют дифференцировать группы или виды бактерий по ферментативной активности
- *Среды Эндо, Левина, Плоскирева* – используются для выделения чистой культуры энтеробактерий на 1 этапе; позволяют дифференцировать бактерии, способные и неспособные ферментировать лактозу
- *Среды Гисса* – используются на 3 этапе выделения чистой культуры для определения спектра сахаролитической активности.

Среда Эндо

E. coli

ферментирует лактозу

(Лактозоположительные колонии)

Salmonella

не ферментирует лактозу

(Лактозоотрицательные колонии)

Селективные питательные среды

стимулируют рост одних микробов и угнетают рост других (за счет добавления в среду определённых компонентов).

Так как в этих средах патогенные бактерии размножаются и накапливаются, их называют также **средами обогащения**.

Например, среда Мюллера служит для накопления сальмонелл. К питательной среде добавляют мел, раствор Люголя и гипосульфит натрия. При взаимодействии этих веществ образуется тетратионат натрия, который угнетает рост кишечных палочек, но создает благоприятные условия для размножения сальмонелл.

Элективные среды

Щелочной агар
Холерные вибрионы

Желточно-солевой агар (ЖСА)
стафилококки

Специальные питательные среды

Сывороточный агар
Пневмококки, менингококки

Кровяной агар
Стрептококки, пневмококки

Желчный агар
брюшнотифозные, паратифозные и дизентерийные палочки

Транспортная система со средой Стюарта

- Среда Стюарта представляет собой полужидкий, бедный питательными веществами субстрат для сохранения и транспортировки широкого спектра патогенных микроорганизмов, таких, как *Neisseria gonorrhoeae, Haemophilus influenzae, Corynebacterium diphteriae, Trichomonas vaginalis, Streptococcus sp., Salmonella sp., Shigella sp.* и др. Наиболее требовательные микроорганизмы сохраняются в данной среде более суток, прочие – до нескольких дней.

- Наличие в среде тиогликолата подавляет ферментативную активность бактерий, а отсутствие азота предотвращает их размножение.

Натрия тиогликолят	1,00 г/л
Натрия глицерофосфат	10,00
Кальция хлорид	0,10
Метиленовый синий	0,002
Агар-агар	3,00
Конечное значение pH (при 25°C)	7,4 ± 0,2

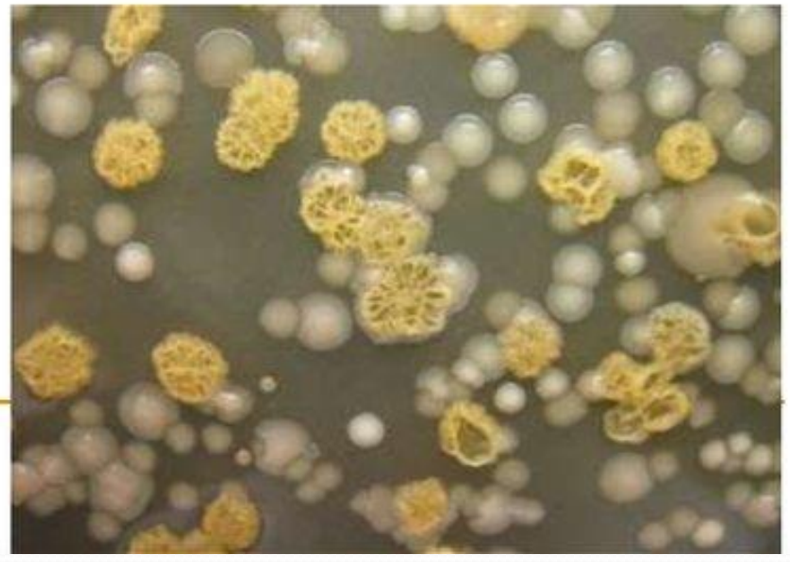
Размножение бактерий на плотной питательной среде.

- Бактерии, растущие на плотных питательных средах, образуют изолированные колонии различной формы, с ровными или неровными краями (S- и R-формы), различной консистенции и цвета, зависящего от пигмента бактерий и другими особенностями.
- Вид, форма, цвет и другие особенности колоний (культуральные свойства) могут учитываться при идентификации бактерий, а также отборе колоний для получения чистых культур

КОЛОНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ –
популяция микробных клеток одного вида, сформировавшаяся в результате деления одной микробной клетки в условиях культивирования на плотной питательной среде при оптимальной температуре

ХАРАКТЕРИСТИКА КОЛОНИЙ

- **S - колонии** (англ. smooth – гладкий) круглые, влажные, с блестящей гладкой поверхностью и ровными краями
- **R – колонии** (англ. rough - неровный, грубый) – неправильной формы, непрозрачные, сухие, с неровными краями и шероховатой поверхностью

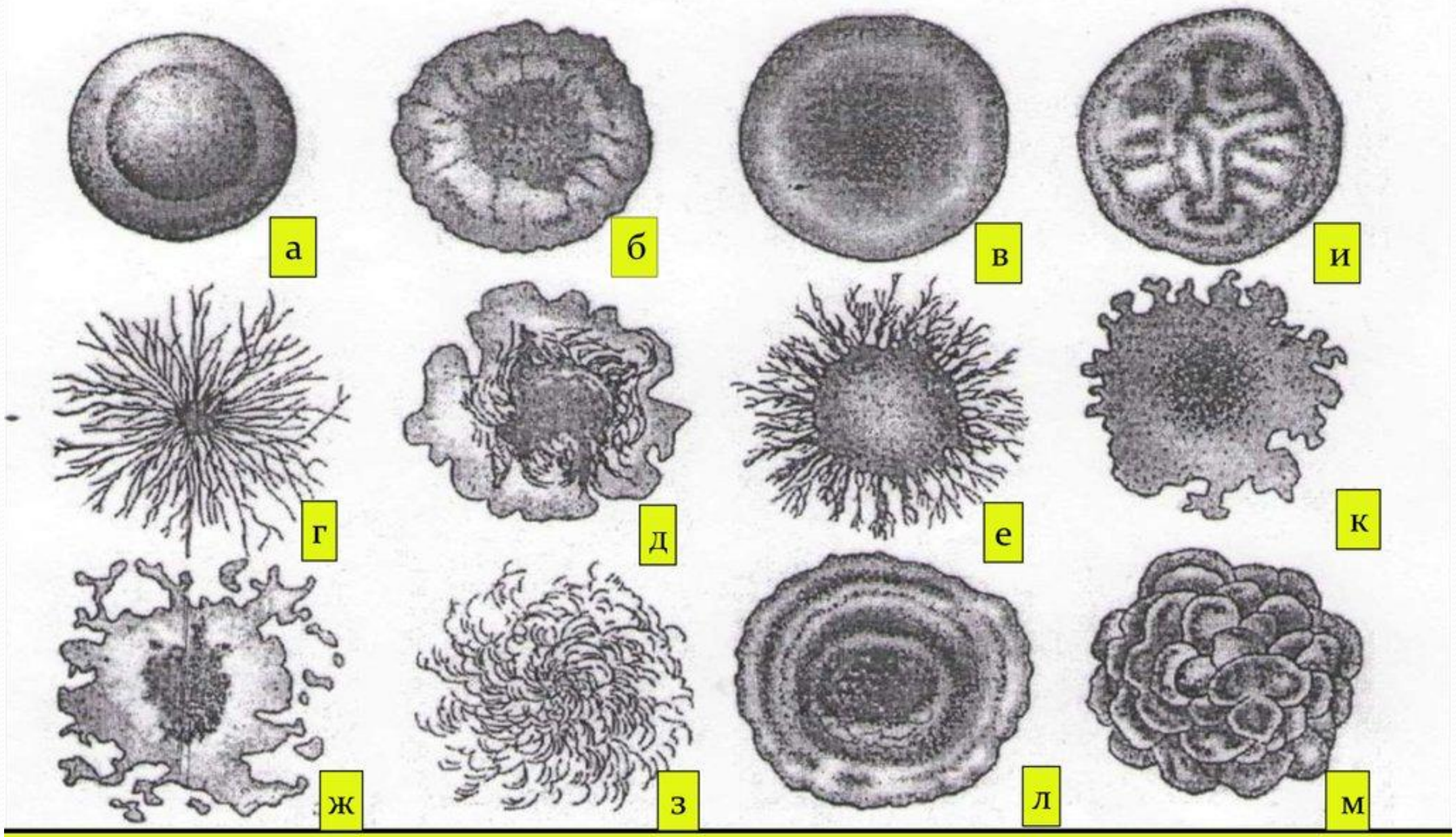


Макроскопическое изучение выросших колоний (описание культуральных свойств)

Культуральные свойства бактерий

- Колонии различаются по величине, форме, цвету, консистенции, контуру края, структуре и характеру поверхности:
- по величине — крупные (диаметр более 4—5 мм), средние (2—4 мм) и малые (1—2 мм)
- по форме — круглые, розеткообразные, листовидные и т. д.
- по цвету, зависящему от пигмента — белого, ярко-синего, красного цветов и т. д.
- по консистенции — сухие, влажные, сочные, слизистые
- по поверхности — гладкие, морщинистые, исчерченные, плоские, выпуклые, плосковыпуклые, вдавленные
- по краю — с ровными, волнистыми, бахромчатыми краями
- по структуре — могут иметь аморфную, зернистую, волокнистую внутреннюю структуру
- в чистой культуре, выращенной на скошенном питательном агаре, характер роста может быть сухим, влажным, ползучим, складчатым, пигментированным

Форма колоний микроорганизмов



а - круглая; б – круглая с фестончатым краем; в – круглая с валиком по краю; г, д – ризоидные; е – круглая с ризоидным краем; ж – амёбовидная; з – нитевидная; и – складчатая; к – неправильная; л – концентрическая; м – сложная.

бактерий

Выделение м/о из различных материалов и получение чистых культур необходимо для диагностики заболеваний, в производстве вакцин, антибиотиков и других БАВ. Для этого необходимы условия:

-температура
-время культивирования
-значение pH среды
-состав среды

Влияние условий внешней среды на микроорганизмы

Основными факторами, влияющими на жизнедеятельность микробов, являются:

Температура, влажность, действие света, характер питательной среды

ТЕМПЕРАТУРА

Все микробы имеют максимальную, оптимальную и минимальную температуру своего развития.

Оптимальная температура для большинства микроорганизмов 25—35°С. Поэтому пищевые продукты в этих условиях быстро портятся.

Минимальный температурный предел у разных микробов различен. Понижение температуры замедляет или прекращает развитие микробов, но не убивает их.

Поэтому при охлаждении (6°С) и замораживании (от —6 до — 20°С) пищевые продукты хорошо сохраняются, но при оттаивании и обработке их микробы вновь начинают свою деятельность.

Максимальная температура (45—50°С) также приостанавливает развитие микробов. Дальнейшее повышение температуры ведет к гибели вегетативных клеток, а затем и спор.

В зависимости от температуры развития микробы делят на:

***психрофильные* (холодоустойчивые), у которых оптимум развитйя 15°С (плесневые грибы);**

***мезофильные* (микробы, развивающиеся при средней температуре), у которых оптимум составляет 25— 37°С (болезнетворные, бактерии, дрожжи);**

***термофильные* (теплолюбивые), у которых оптимум 50°С (молочнокислые бактерии).**

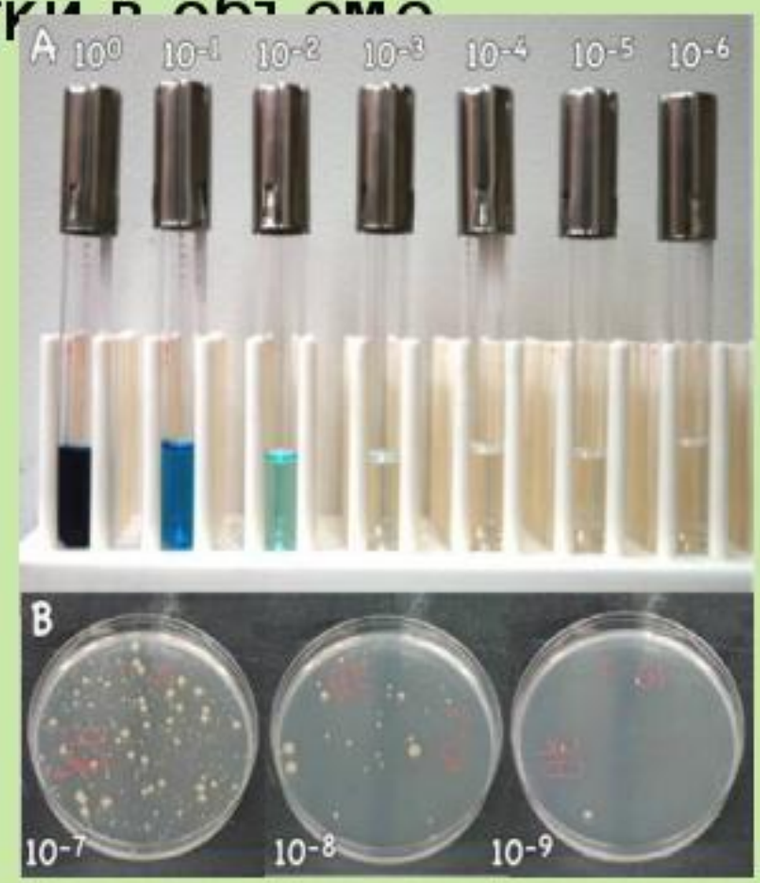
Методы выделения чистых культур аэробов

- 1. **Механическое разобщение клеток**:
- а) ***метод Коха***: готовят десятикратные разведения материала в хлориде натрия, из каждого разведения 1 петлю вносят в пробирку с агаром (40^0) и выливают его в чашку Петри;

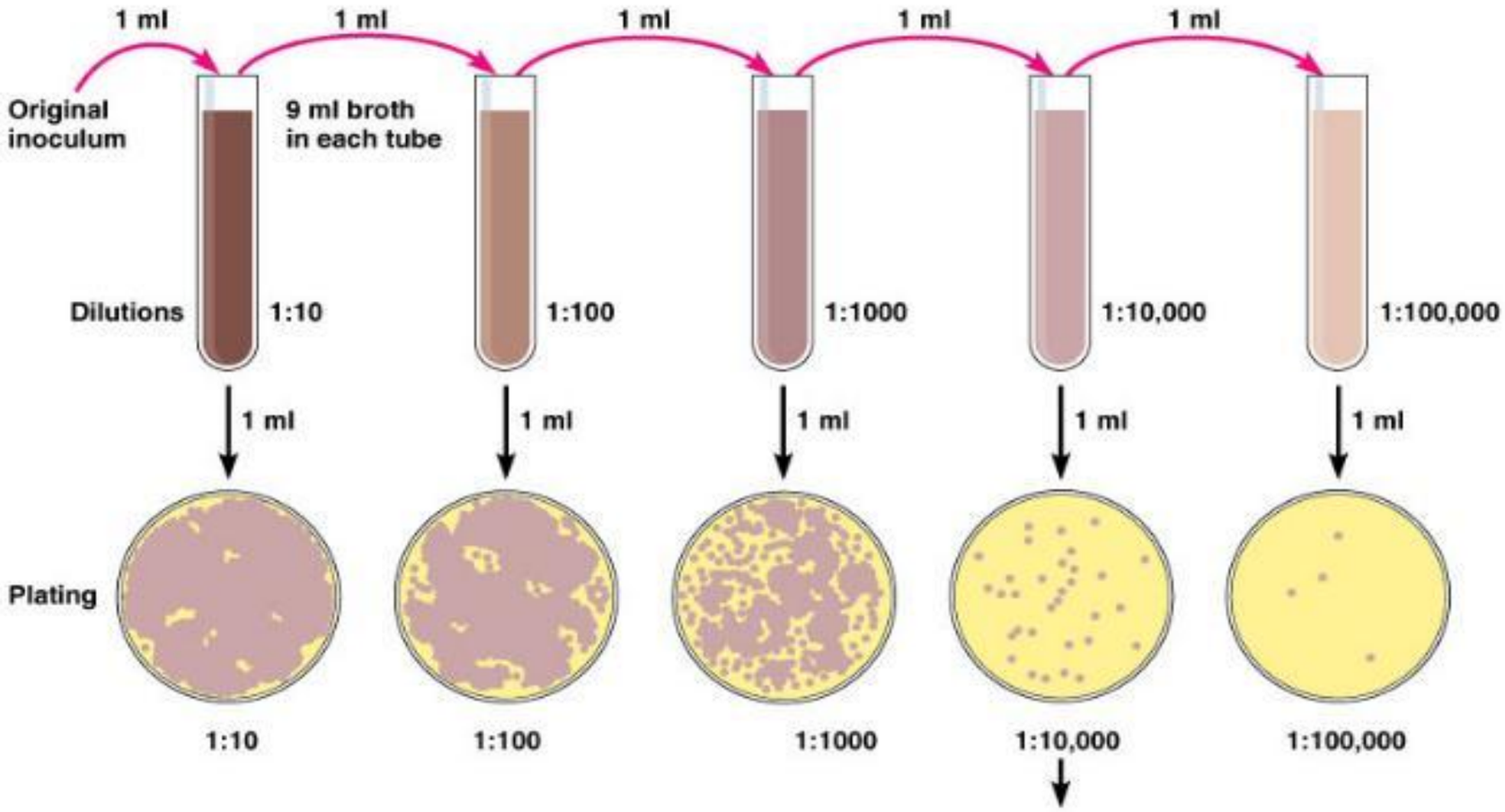
- б) ***метод Дригальского***: 1 петлю материала наносят на поверхность агара в чашку Петри и растирают шпателем, затем, не прожигая его, растирают по поверхности агара второй, а затем третьей чашки и т.д;

Метод Коха
(метод серийных разведений)

- последовательное разведение исследуемого материала в жидкой питательной среде до концентрации одной клетки в объеме



Метод серийных разведений



Calculation: Number of colonies on plate × reciprocal of dilution of sample = number of bacteria/ml
(For example, if 32 colonies are on a plate of $^{1}/_{10,000}$ dilution, then the count is 32 × 10,000 = 320,000/ml in sample.)

Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Метод Дригальского

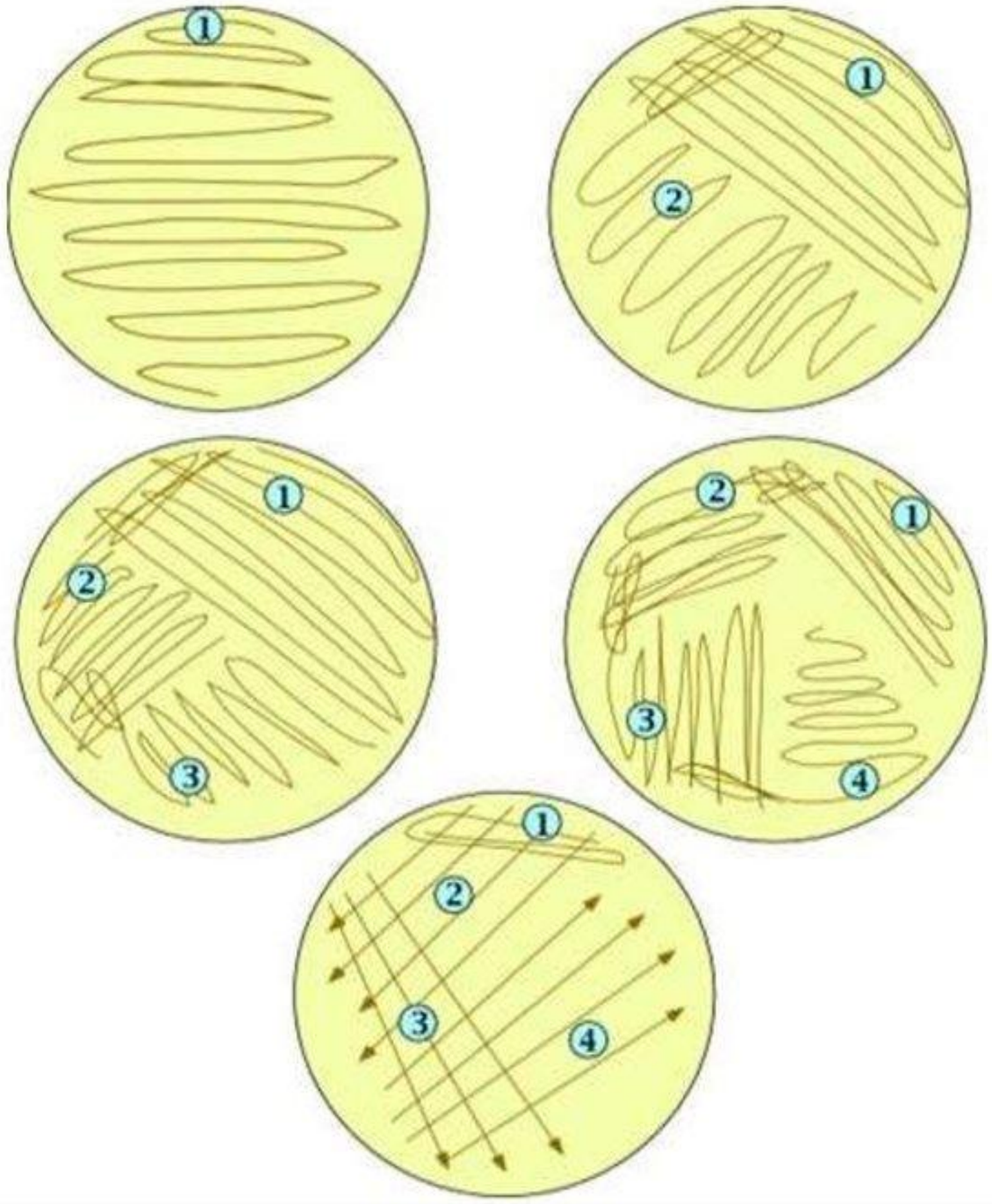
0,1мл материала вносят в первую чашку и стерильным стеклянным шпателем распределяют по поверхности среды. Затем этим же шпателем (не прожигая его в пламени горелки) делают такой же посев во второй и третьей чашках. С каждым посевом бактерий на шпателе остается все меньше и меньше и, при посеве на третью чашку, бактерии будут распределяться по поверхности питательной среды отдельно друг от друга. Через 1-7 сут выдерживания чашек в термостате (в зависимости от скорости роста микроорганизмов) на третьей чашке каждая бактерия дает клон клеток, образуя изолированную колонию, которую пересевают на скошенный агар с целью накопления чистой культуры.

Посев истощающим штрихом

Область применения:

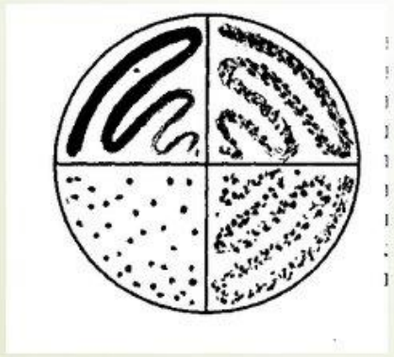
для выделения чистых культур из материалов, содержащих обильную смешанную микрофлору.

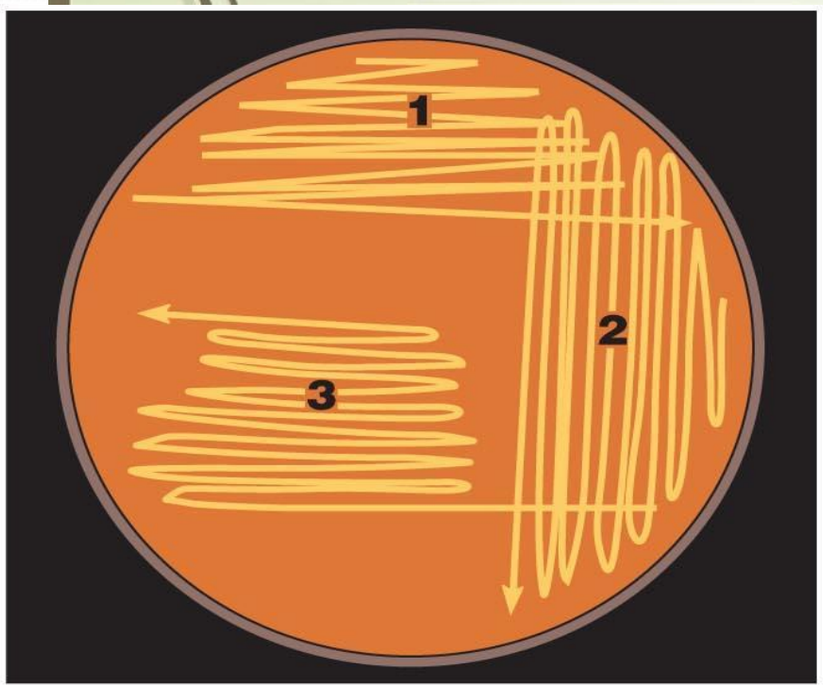
Материал отбирают петлей и на поверхности плотной среды проводят штрихи в таком порядке, как указано на рисунке. Перед каждым новым нанесением петлю стерилизуют в пламени горелки.

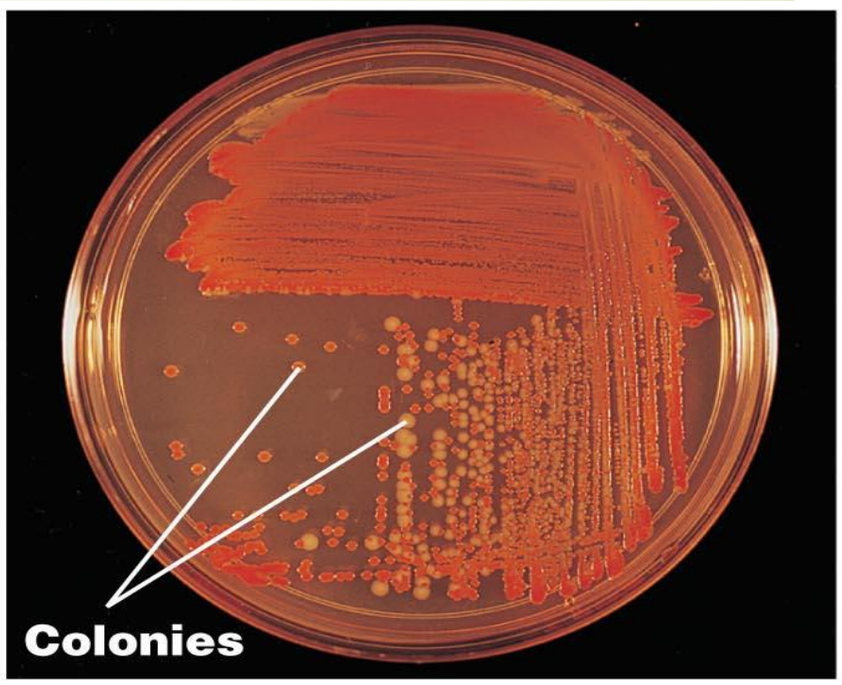


Методы выделений чистых культур микроорганизмов .

- Рассев петлёй (посев штрихами).Метод экономичен . Берут одну чашку Петри с питательным агаром и делят её на четыре сектора , проводя разграничение линии на внешней стороне дна чашки . Исследуемый материал петлёй вносят в первый сектор и проводят ею параллельные линии по всему сектору .Этой же петлёй ,не изменяя её положения по отношению к агару , проводят такие же линии на других секторах чашки .В том же месте ,где на агар попало большое количество микробных клеток ,рост микроорганизмов будет в виде сплошного штриха. На секторах с небольшим количеством клеток вырастают отдельные колонии .
- Бактериостатический метод (метод ингибирования) основан на различном действии некоторых химических веществ и антибиотиков на микроорганизмы .Определённые вещества угнетают рост одних микроорганизмов и не оказывают влияния на другие .







Copyright © 2010 Pearson Education, Inc.

Методы выделения чистых культур аэробов

- 3. **Избирательное подавление сопутствующих бактерий физическими или химическими факторами во время инкубации посевов.**
  Например: для выделений иерсиний чумы посевы инкубируют при Т=5 ^{0}

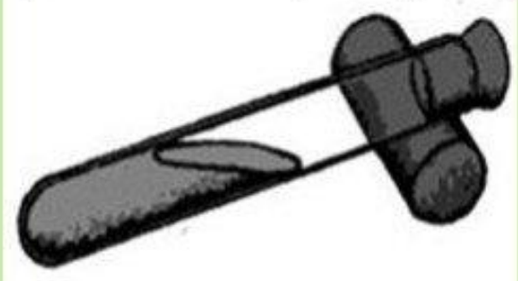
- **4. Заражение чувствительных животных** = для выделения возбудителя чумы из трупов грызунов

- 5. **Использование биологических свойств бактерий**. Например: метод Шукевича для выделения протея (ползучий рост).

Посев на скошенный агар, метод Шукевича

- Посев на скошенный агар применяют для накопления и хранения чистой культуры бактерий

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



Место посева культуры по Шукевичу

Посев однократным штрихом

Требования к условиям культивирования бактерий

- 1.Питательные потребности
  - простые – растут на универсальных питательных средах
  - сложные – растут на специальных питательных средах
- 2.Температура культивирования
  - ≈ 37°С – мезофилы (бол-во патогенных бактерий)
  - 6 – 20°С – психрофилы (возбудители чумы и лептоспироза),
  - 50 – 60°С – термофилы (актиномицеты, спороносные бациллы).

Требования к условиям культивирования бактерий

- 3. Реакция среды (pH)
  - кислая – ацидофилы (pH = 4,0-6,0)
  - нейтральная – большинство патогенных бактерий
  - щелочная – алкалифилы (для холерного вибриона pH = 7,8-8,6)
- 4.Условия аэрации
  - не принимают во внимание – факультативные анаэробы
  - ↓ O_2 – микроаэрофилы
  - ↑ CO_2 – капнофилы
  - без доступа воздуха – анаэробы
  - с обязательным доступом воздуха – облигатные аэробы

Требования к условиям культивирования бактерий

- 5. Длительность культивирования - **зависит от времени генерации,**
- **- для большинства бактерий составляет 24-48 ч;**
- **некоторые растут дольше:**
  - **- бактерии коклюша – 2-5 сут,**
  - **- микробактерии туберкулеза – 3-4 нед.**

- 6. Освещение - **например, микобактерии.**

Свойства микроорганизмов, используемые для их идентификации

- **Морфологические признаки** – форма, размеры и взаиморасположение микробных клеток, изучаемые микроскопическим методом исследования
- **Тинкториальные признаки** – способность микробных клеток окрашиваться красителями, изучаемые микроскопическим методом исследования
- **Культуральные признаки** – характер роста на жидких и плотных питательных средах
- **Биохимические (ферментативные) признаки** – способность микроорганизмов расщеплять различные субстраты
- **Антигенные признаки** – определение специфических антигенов с использованием серологических реакций
- **Фаголизабельность** – разрушение микробной клетки специфическим бактериофагом
- **Выделение биологически активных веществ** – определение факторов патогенности микроорганизмов