

# 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**

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

**Анаболизм  
(ассимиляция)**

**Биосинтез**

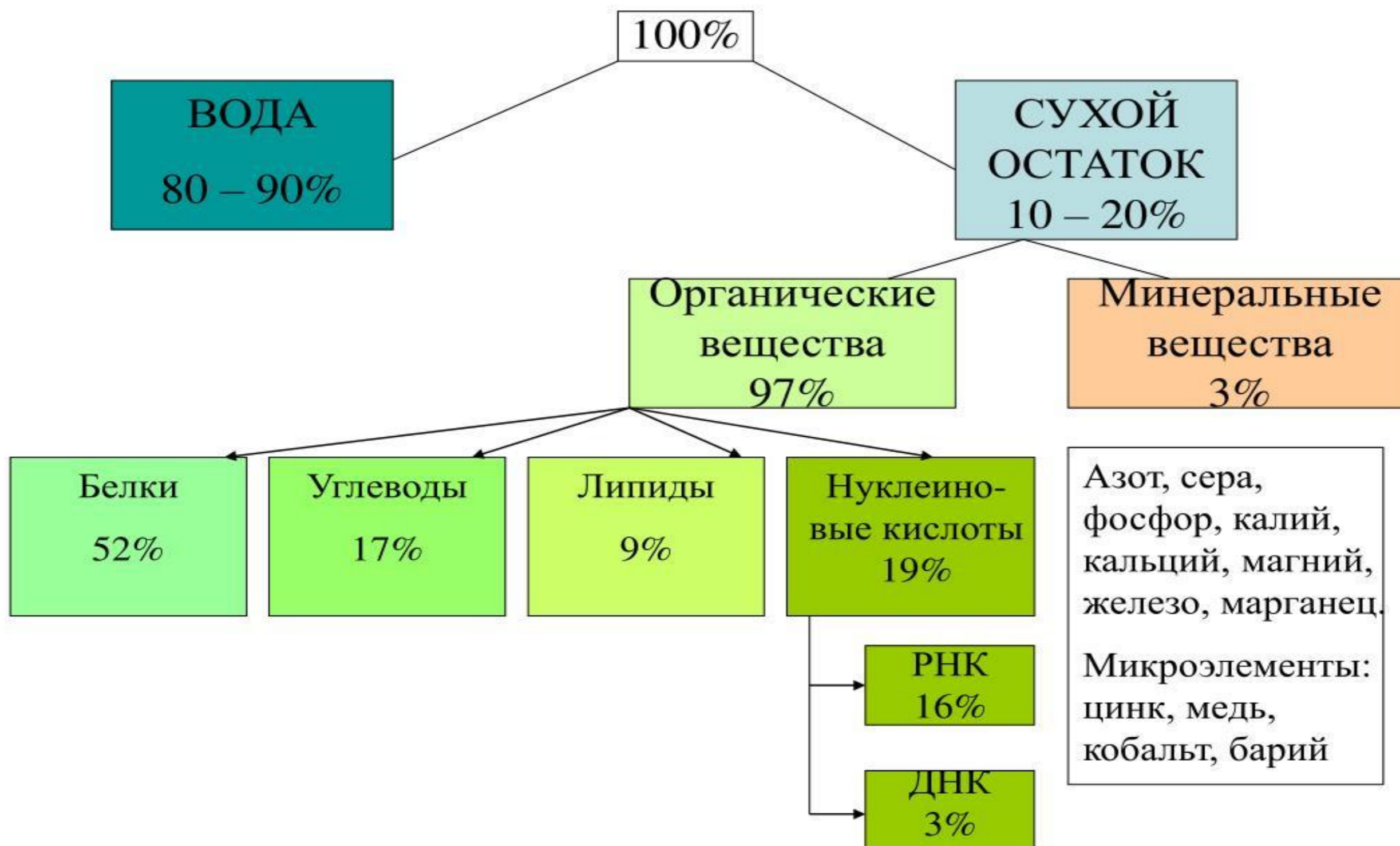
**Небольшие молекулы → большие**

**Энергия требуется**

## 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



# 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



# 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. рН 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

п  
е  
р  
м  
е  
а  
з  
ы



# 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, обуславливая широкое распространение в инфицированной ткани микроорганизмов и их токсинов. Это **ферменты агрессии** - гиалуронидаза, коллагеназа, дезоксирибонуклеаза, нейраминидаза, лецитовителлаза и др. Их относят к **факторам патогенности** микроорганизма..

## Ферменты бактерий.

В соответствии с особенностями генетического контроля

- *Конститутивные*, синтез которых происходит в течение всего клеточного цикла.
- *Индукцибельные*, синтез которых индуцируется соответствующим субстратом. Например,  $\beta$ -галактозидаза кишечной палочкой на среде с глюкозой практически не образуется, но ее синтез резко увеличивается при выращивании на среде с лактозой или другим  $\beta$ -галактозидом.
- *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 (разжижение 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 углеводов (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 Андрее (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 мочевины

## 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.

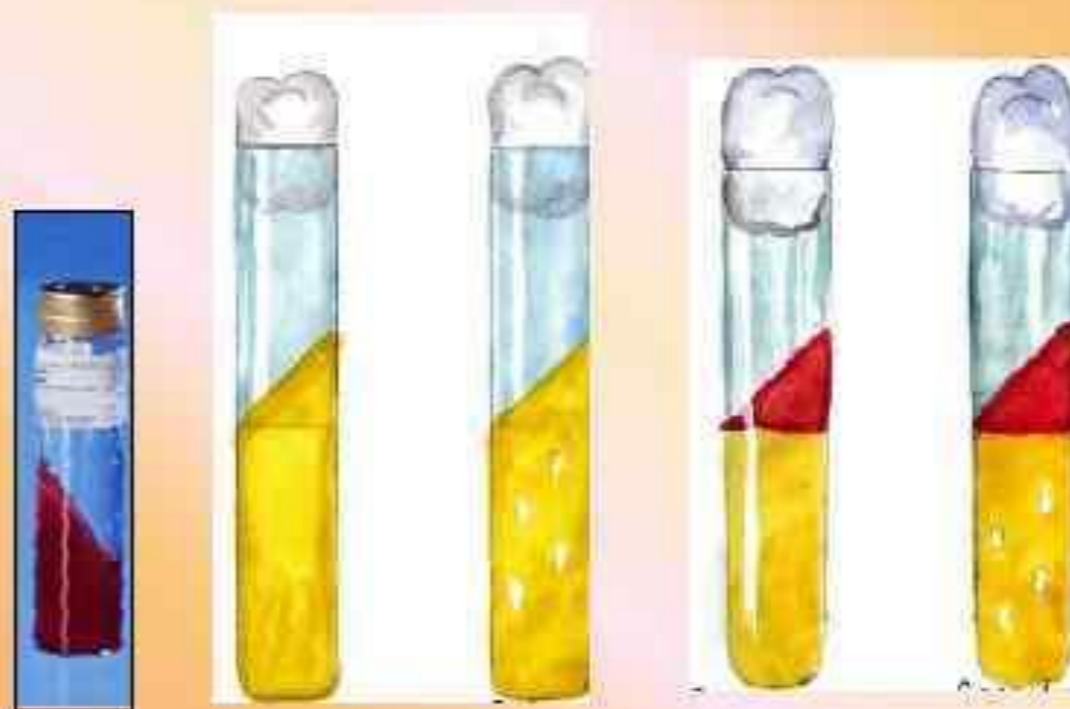
## **Среда Олькеницкого -**

**плотная комбинированная среда.**

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

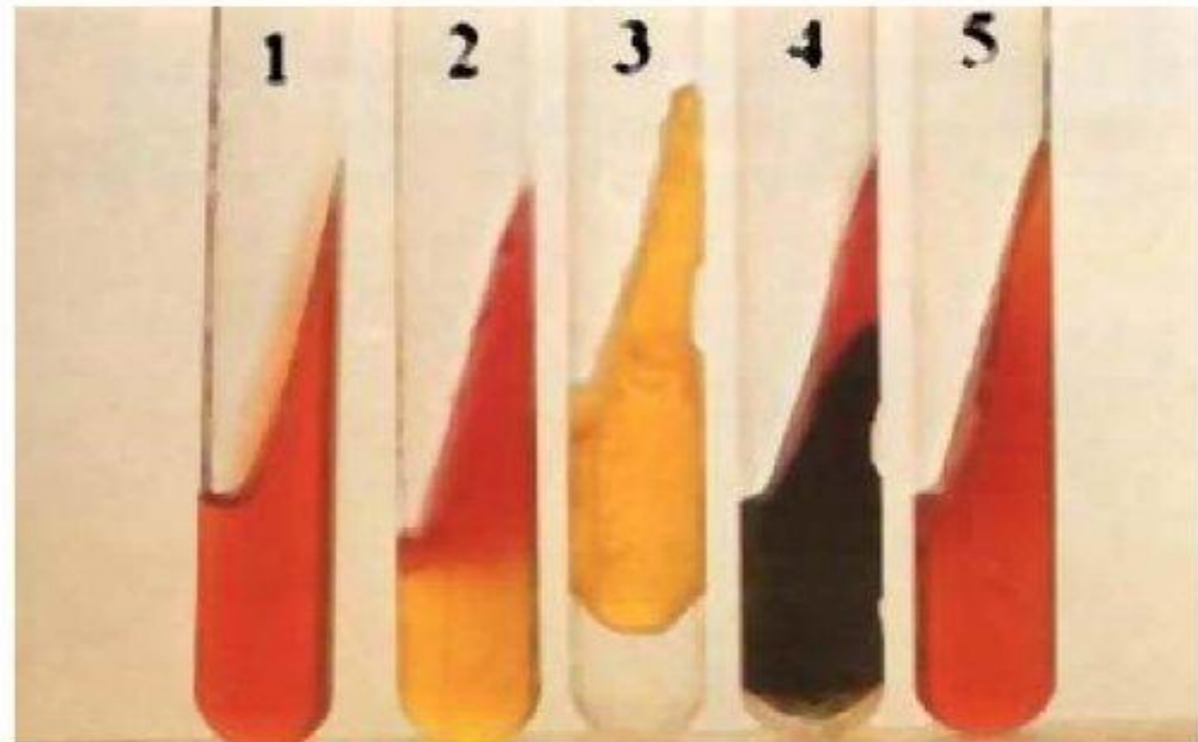
**Лактоза, сахароза**

**Глюкоза**



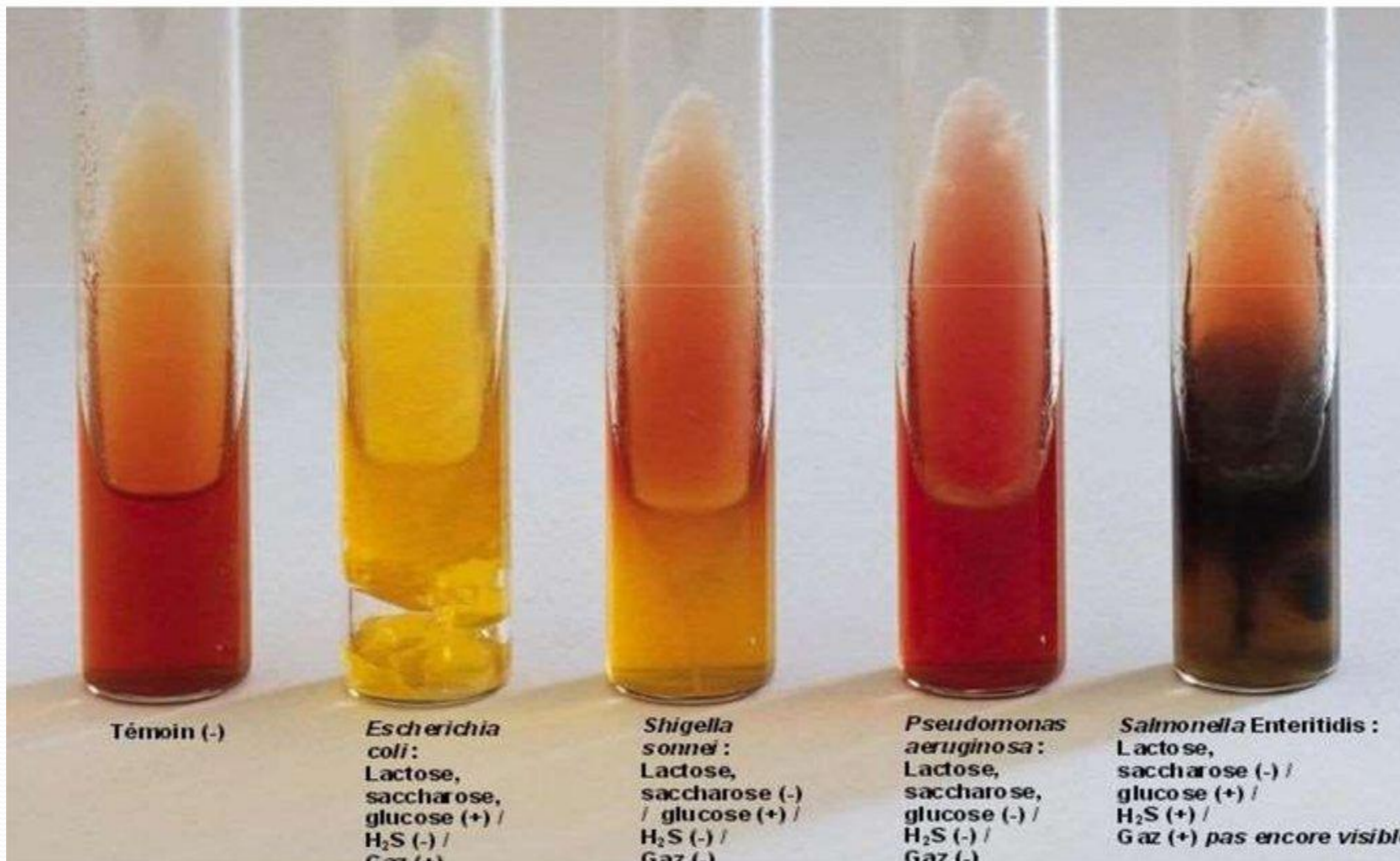
## Рост микроорганизмов на среде Олькеницкого.

- 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 ( $Na_2SO_3$ )**,
- ❖ **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

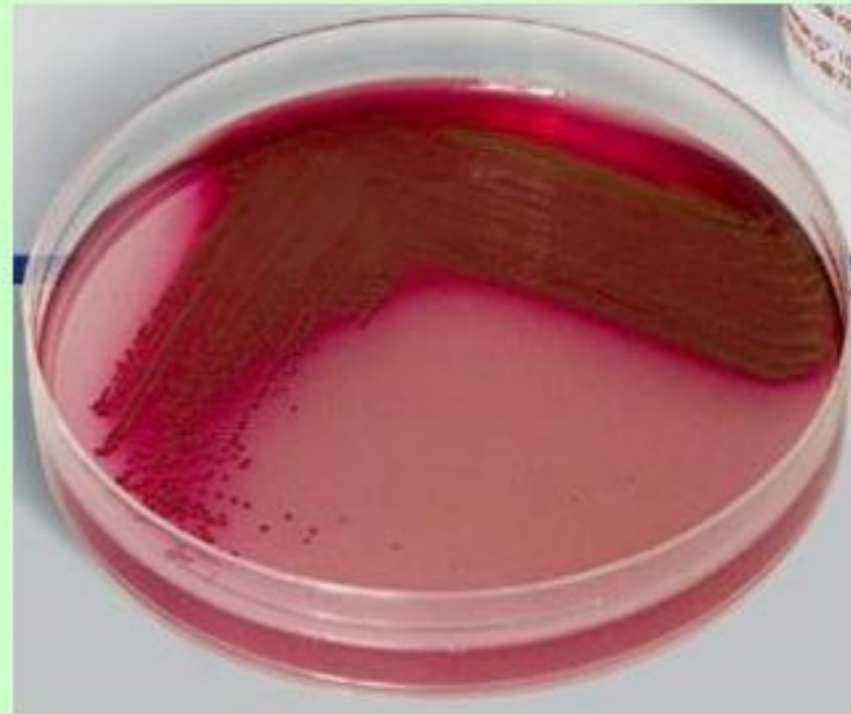


Лактозо-позитивные

# 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**;**

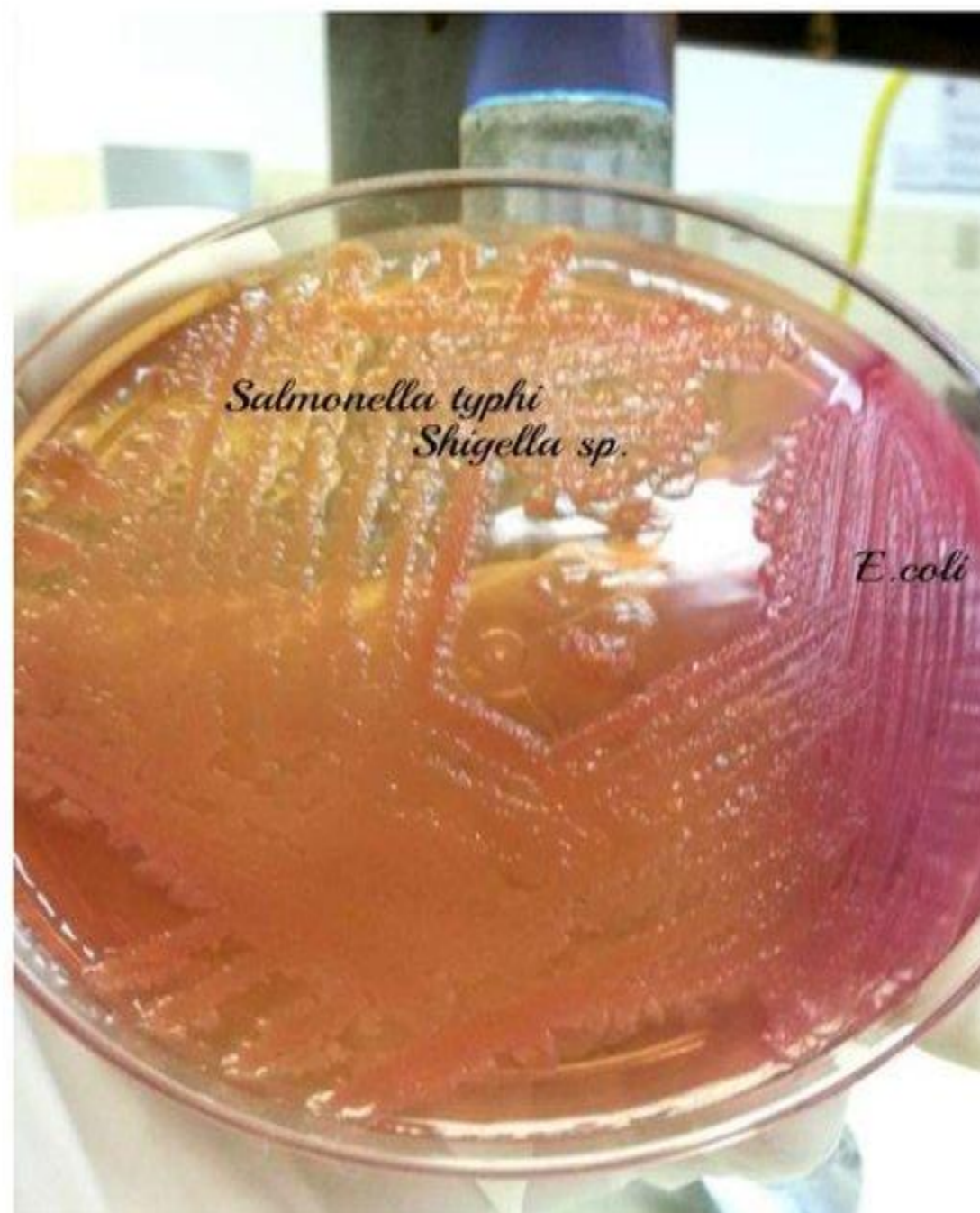
**колонии бактерий, не ферментирующих лактозу, остаются бесцветными.**

# 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 протей.
- ❖ 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

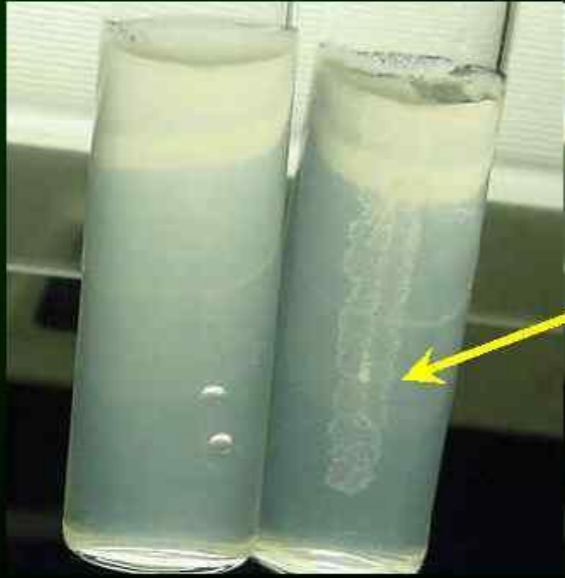


# Определение протеолитических ферментов

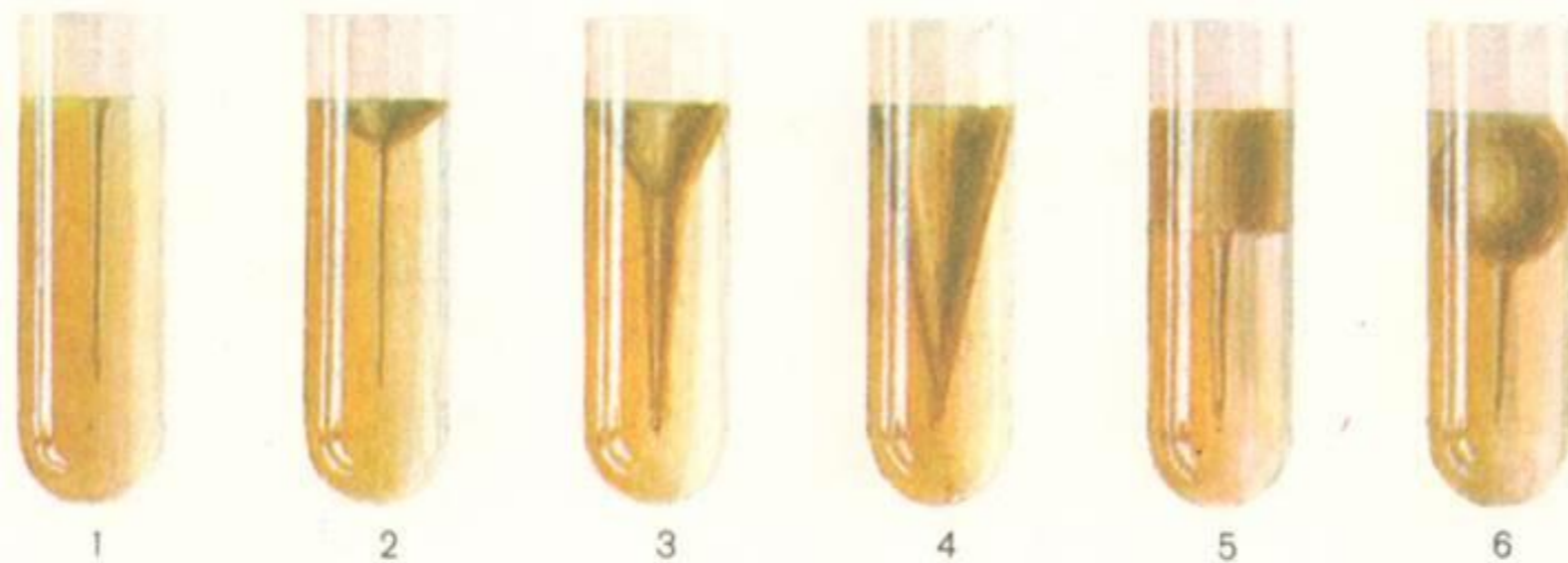
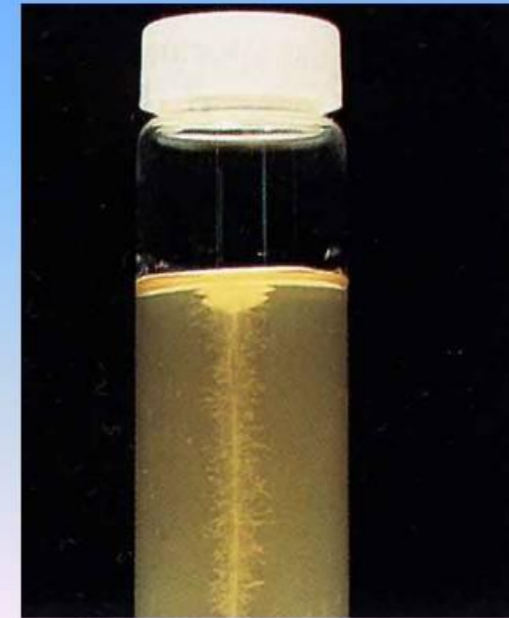
## ▶ **Учет результатов:**

- ▶ 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.

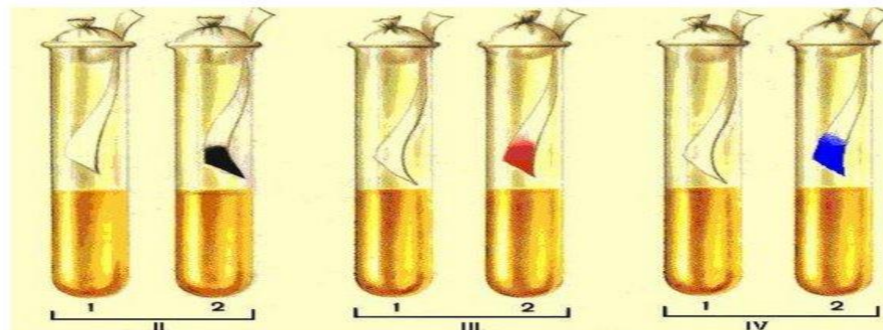
При наличии аммиака смесь окрашивается в желтый или коричневый цвет. Коричневое окрашивание указывает на большое содержание продукта гнилостного распада.

^ *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

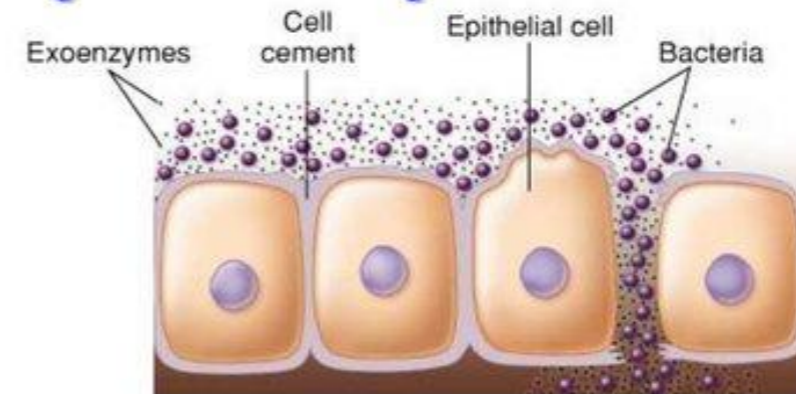
## **Факторы патогенности микроорганизмов.**

- **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.

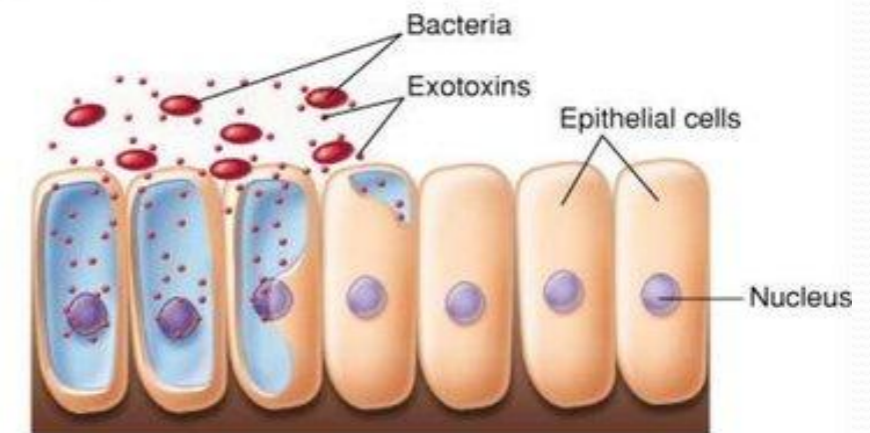
# Характеристика факторов агрессии

- ▶ **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

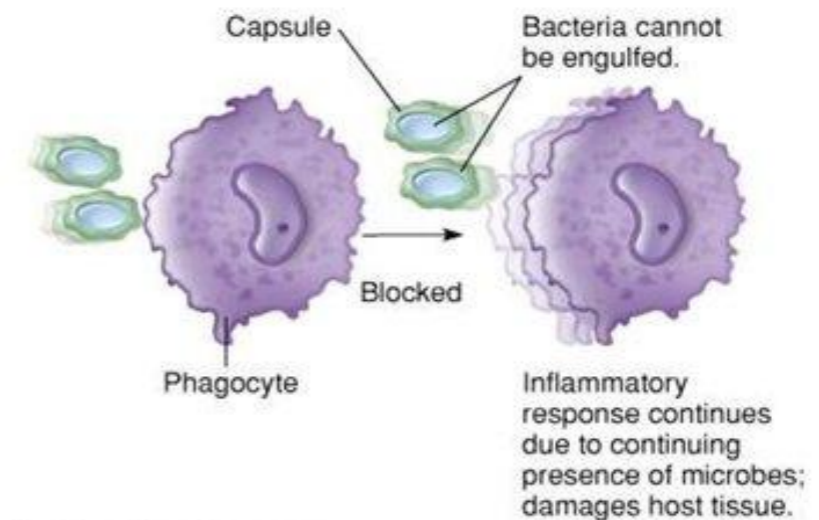
## ▶ **Токсины**



(a) Exoenzymes



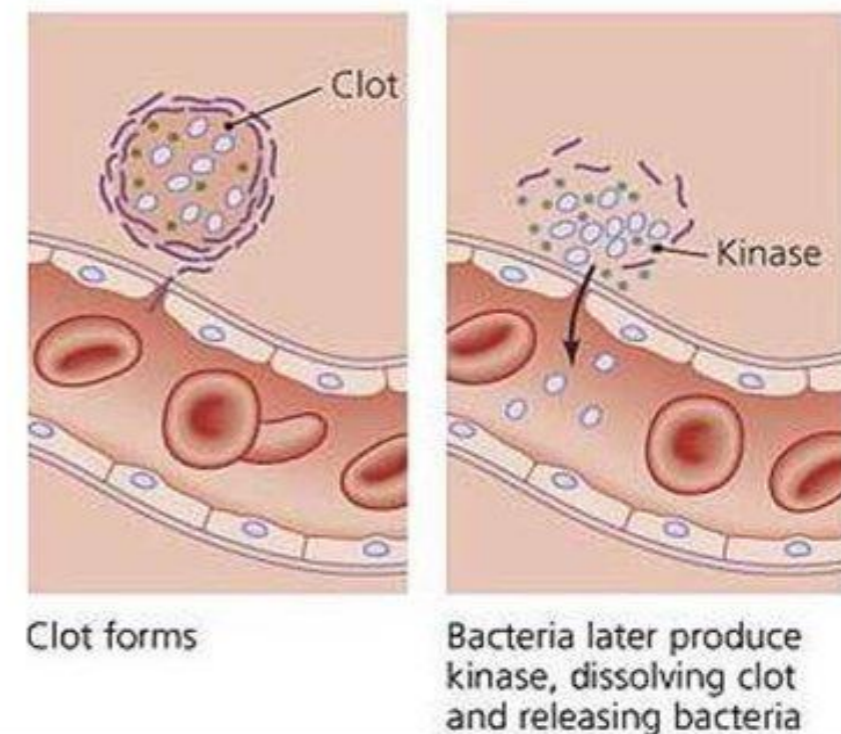
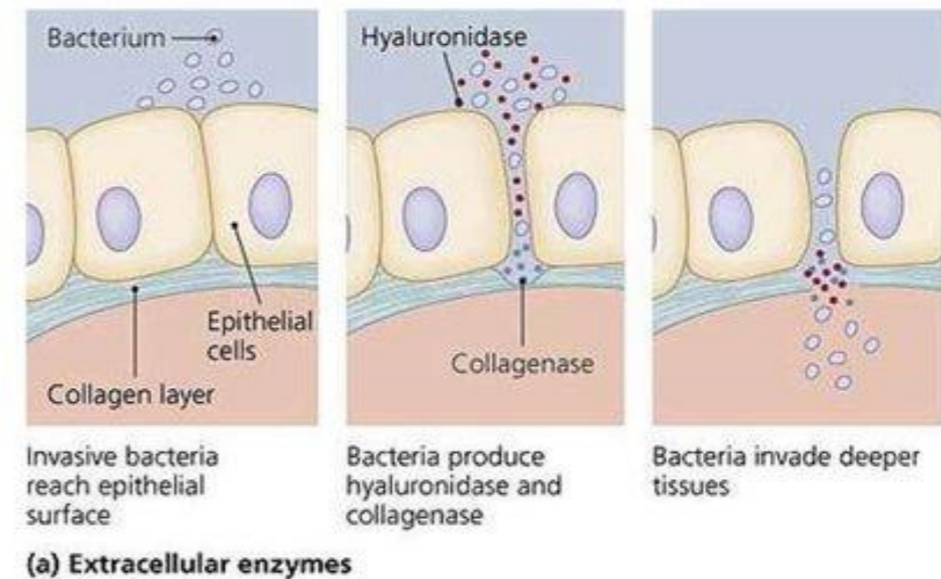
(b) Toxins



(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

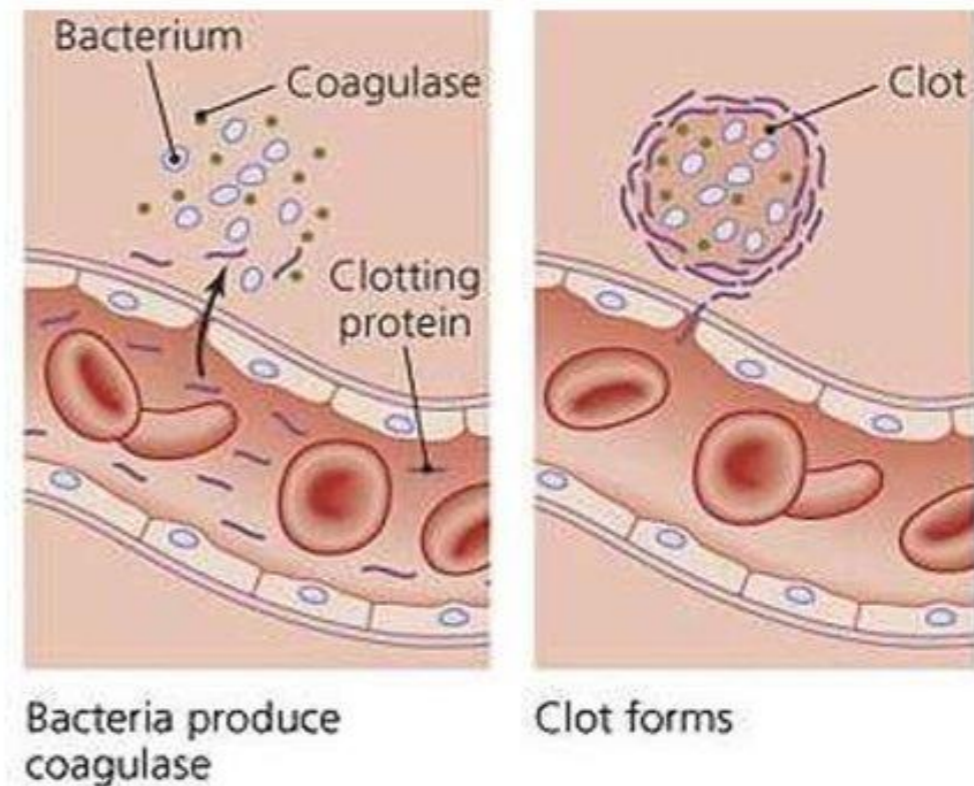
- свертывает плазму крови

## ▶ ДНКаза

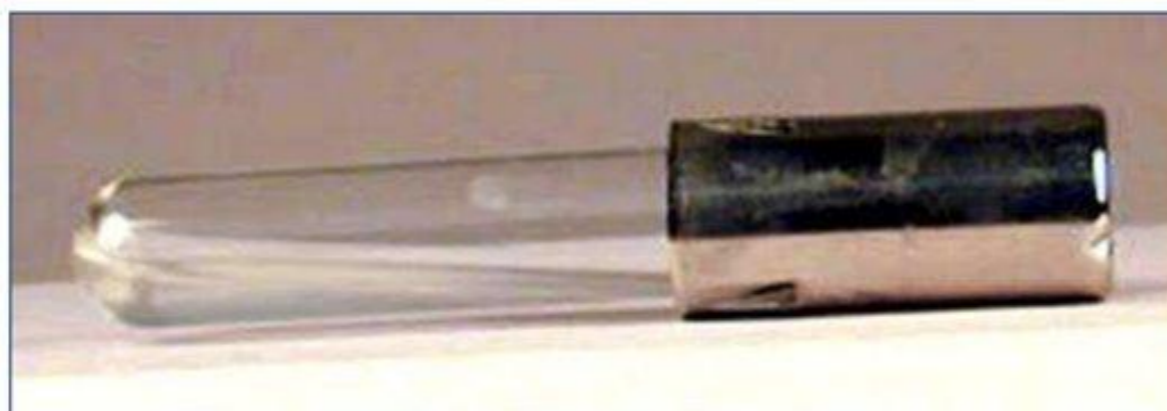
- деполимеризует ДНК

## ▶ Протеазы

- разрушают антитела



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

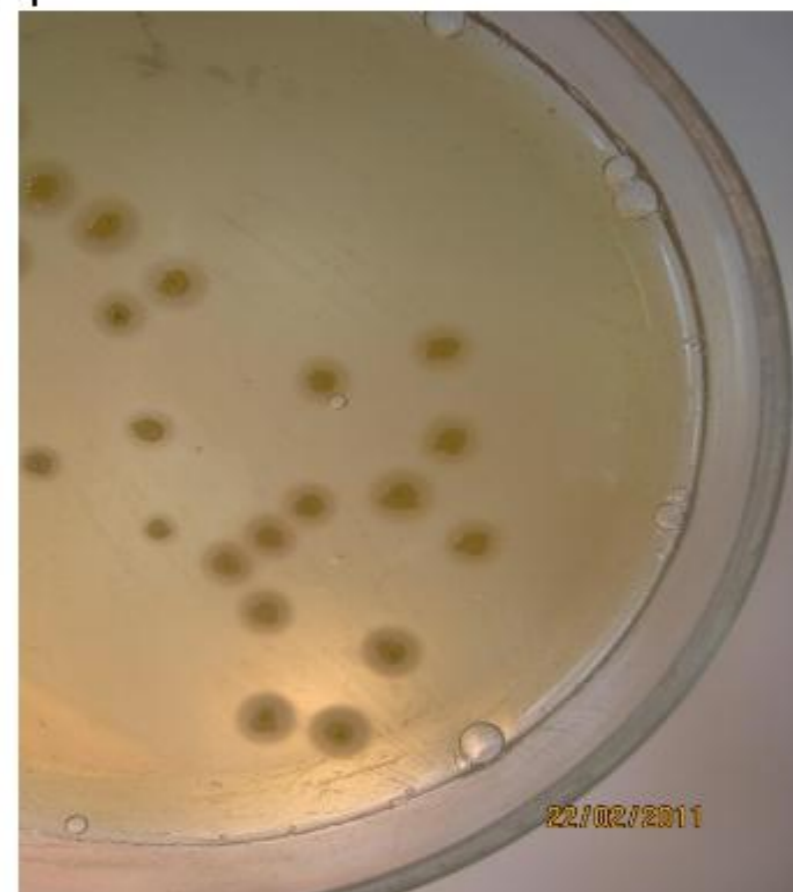


**тест на плазмокоагулазу:**

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

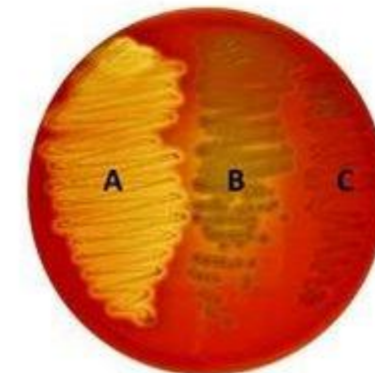
Реакция считается положительной независимо от степени свертывания плазмы - от небольшого сгустка, взвешенного в плазме, до полного неподвижного сгустка.

**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 селективность 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

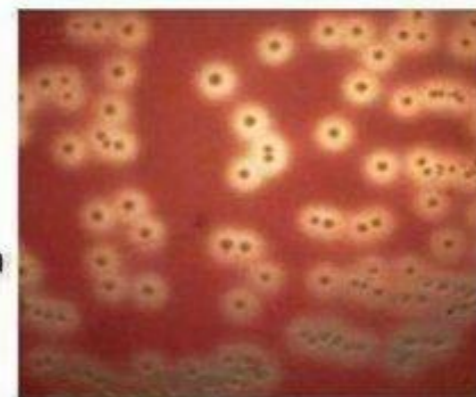
### Кровяной агар для определения гемолитической активности стрептококков



$\alpha$  - гемолиз

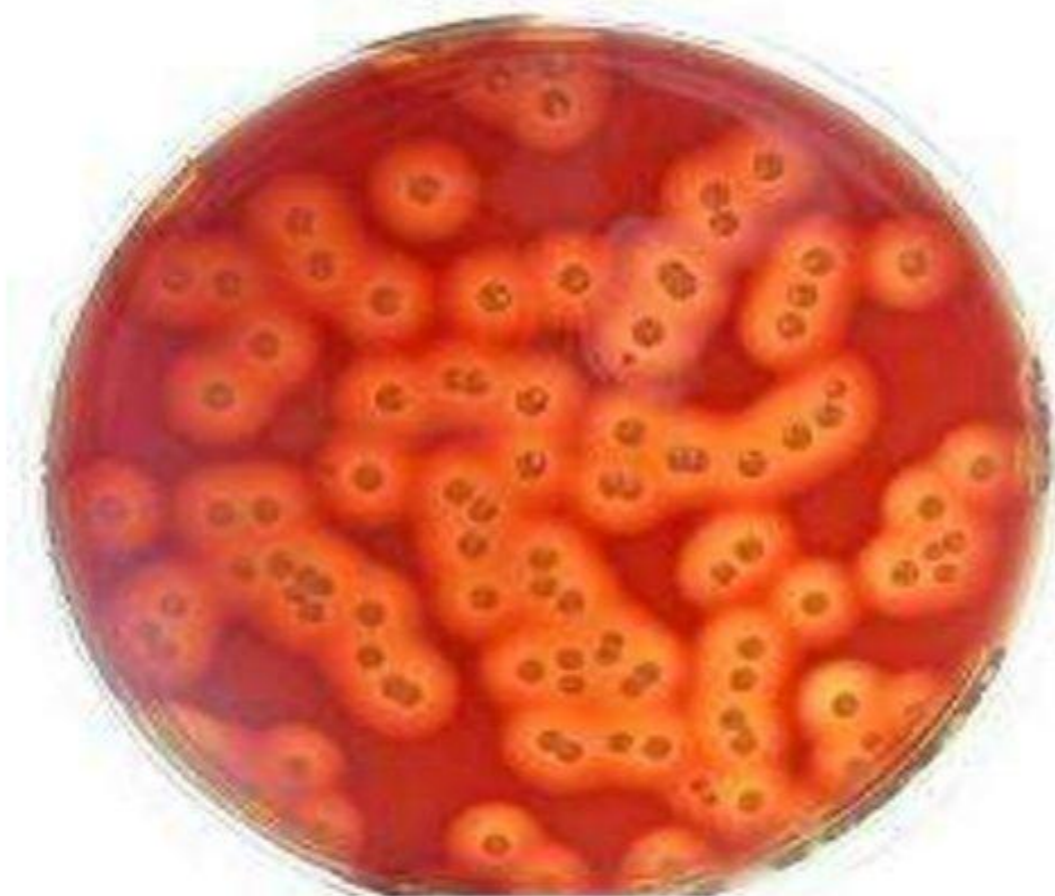


$\gamma$  - гемолиз,  
без гемолиза



$\beta$ -гемолиз

# Стафилококки – рост на кровяном агаре



Стафилококки, рост на кровяном 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.



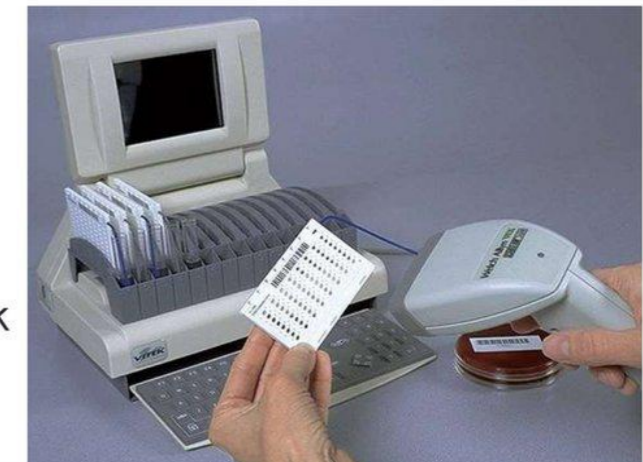
## ИЗБИРАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ.

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 AP1-20A. Суспензию выделенной культуры засевают на пластину AP-20A с набором биохимических тестов, 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).

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

# Особенности энергетических процессов у микроорганизмов

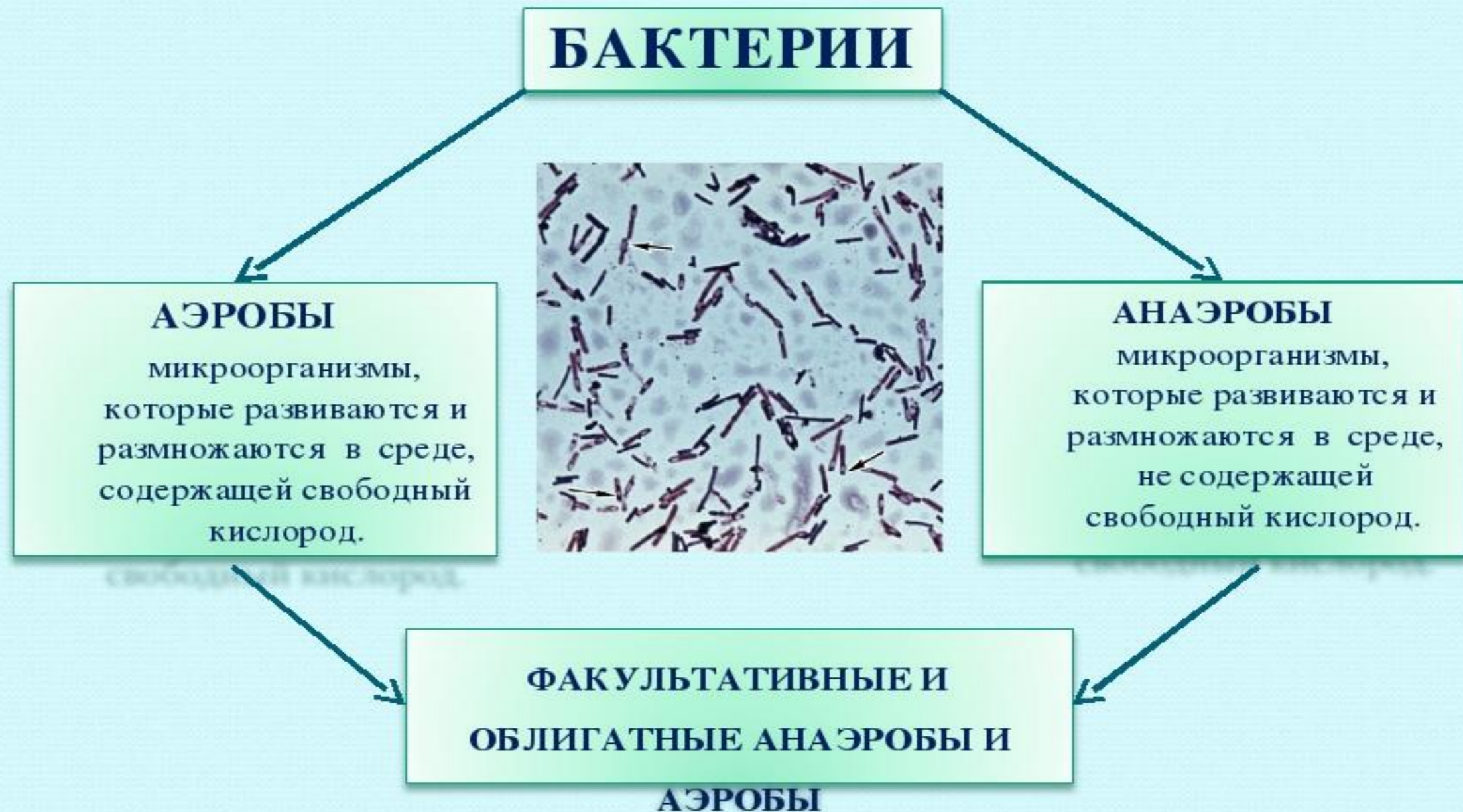
Способы получения энергии у микроорганизмов различны:

- окисление у м/о идет до конца, до образования  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ .
- 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.



# 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 – дизентерийная, 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

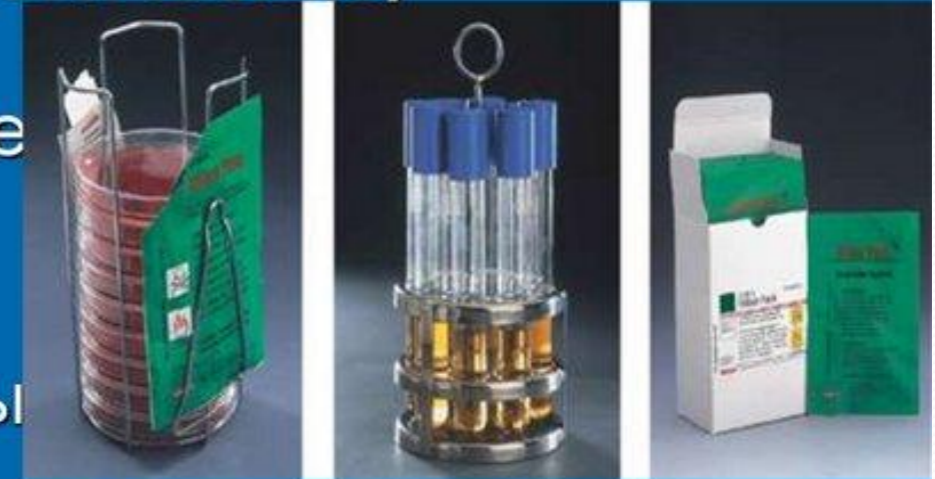
2. Культивирование анаэробных микроорганизмов более сложно, чем выращивание аэробов (должен быть минимальным контакт микроорганизмов с молекулярным кислородом).

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

- К физическим методам относится культивирование в микроанаэроостате. Это вакуумный аппарат для выращивания микроорганизмов, в котором воздух замещен газовой смесью (часто это такой состав: азот с 5% CO<sub>2</sub> и 10% H<sub>2</sub>).
- К химическим методам относятся:
  - 1) использование химических веществ, поглощающих молекулярный кислород (щелочной раствор пиросульфата натрия, дитионит натрия (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), 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: анаэроостаты, 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 **анаэроостате** (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<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> и 10% H<sub>2</sub>.
- Палладиевые или платиновые катализаторы обеспечивают удаление остатков кислорода, катализируя связывание O<sub>2</sub> с H<sub>2</sub>.
- 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 анаэроштата

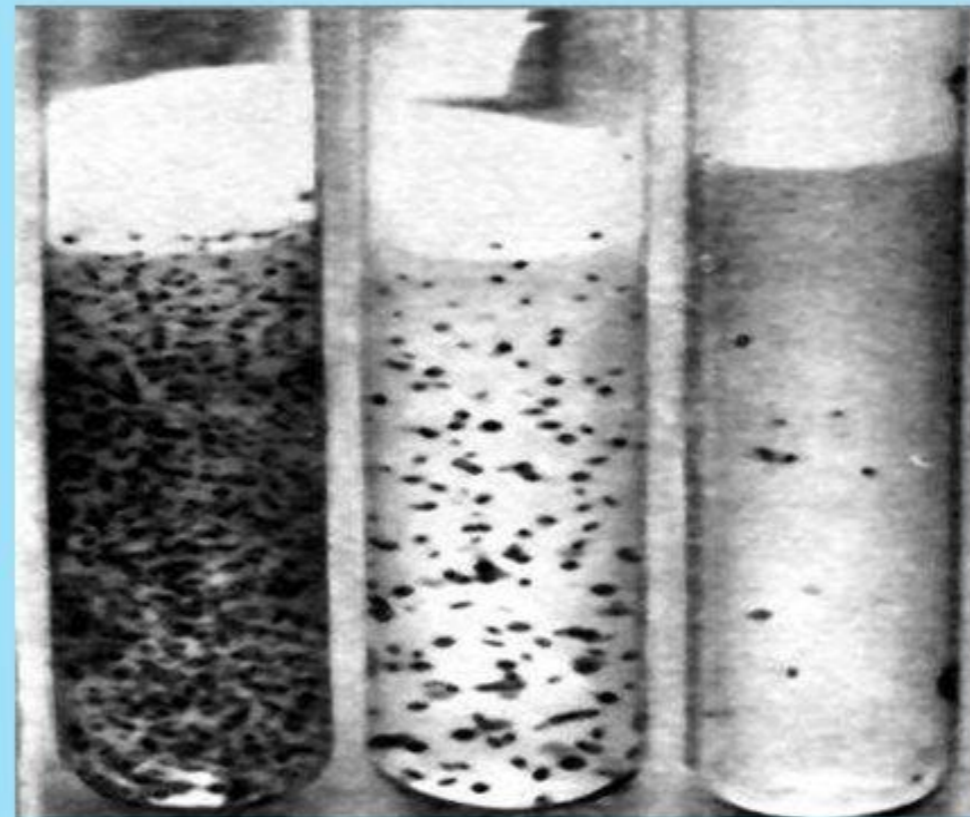


# Методы культивирования анаэробных микроорганизмов



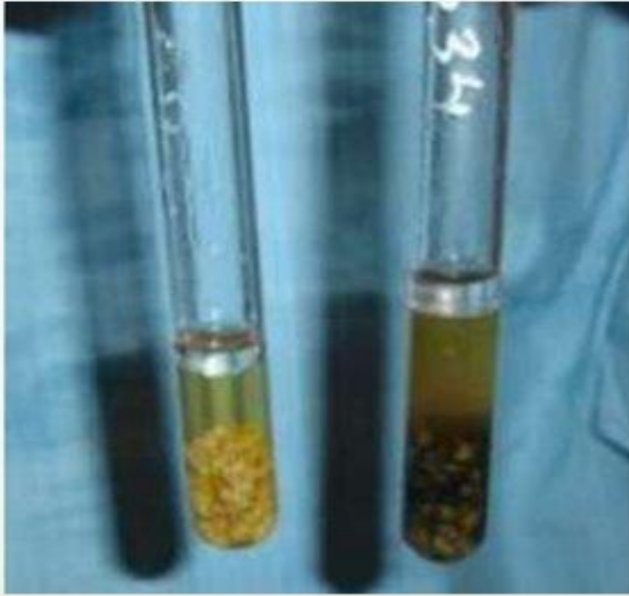
Рис. 56. Посев уколом.

Посев уколом анаэробных бактерий в столбик сахарного агара

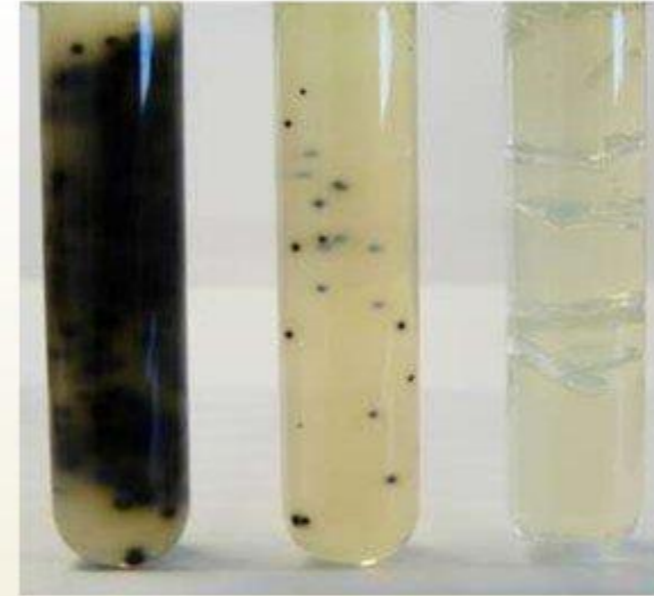


Изолированные по методу Вейнберга колонии анаэробов в сахарном агаре

## 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.



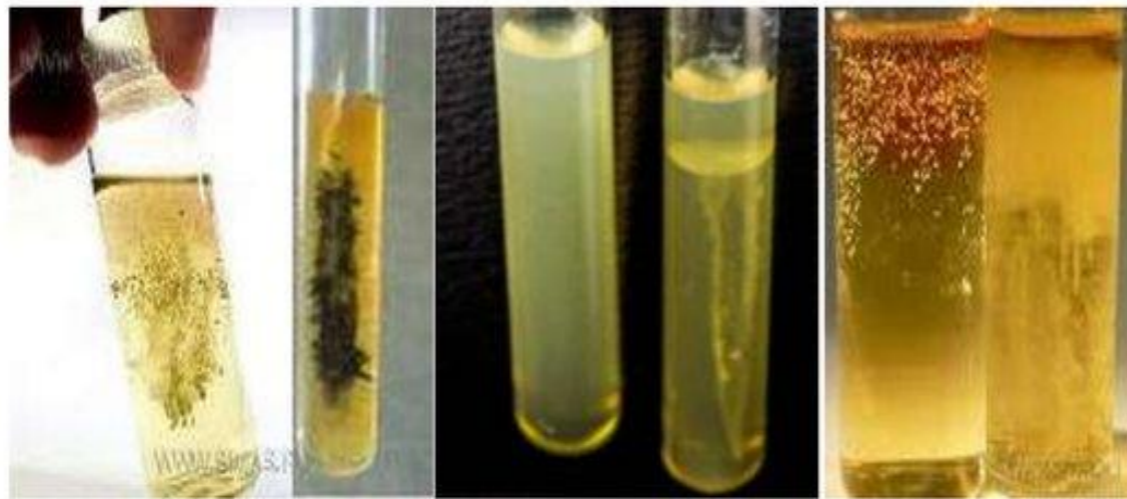
- **Посев в высокий столбик** полужидкой или плотной питательной среды
- Можно культивировать сравнительно нетребовательные к анаэробным условиям микроорганизмы (например, некоторых представителей родов *Clostridium* и *Bifidobacterium*).
- На фото рост клостридий на среде Вильсон-Блер

# 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



*Bacteroides fragilis*  
ATCC™ 25285



CDC Anaerobe 5% Sheep Blood Agar  
with Phenylethyl Alcohol (PEA)  
*Peptostreptococcus  
anaerobius*  
ATCC™ 27337



# 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.
- Среда 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 вазелинового масла, чтобы предохранить посев от проникновения кислорода.



**Professor Dr. Theodor  
Kitt (1858-1941)**



**Giulio Tarozzi (1868-1948)**



# Среда Вильсона — Блера



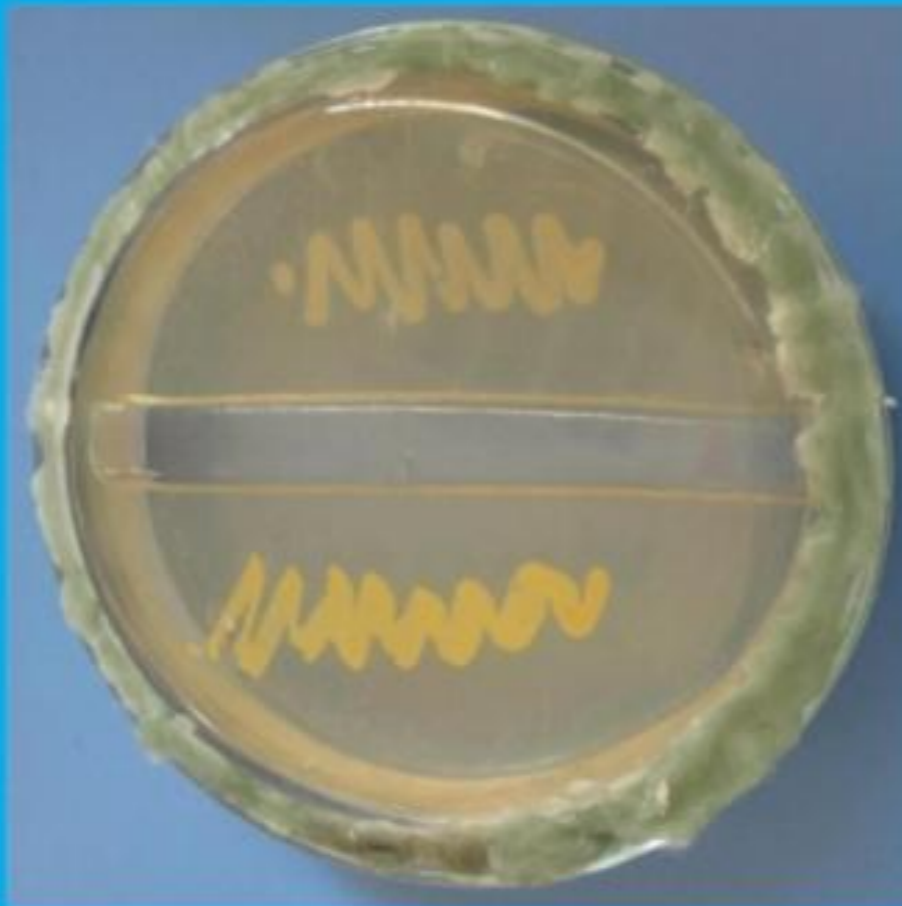
W. J. Wilson, 1879-1954, англ.  
бактериолог;  
E. M. Blair;

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 –  $\Gamma^+$
- перетяжка клетки (клетка истончается посередине) –  $\Gamma^-$

## ▶ Почкование

- Francisella
- Микоплазмы
- дрожжи

## ▶ Фрагментация нитевидных форм

- Актиномицеты
- Микоплазмы

## ▶ Экзоспоры

Стрептомицеты

## ▶ Особый цикл деления

Хламидии

# Размножение бактерий

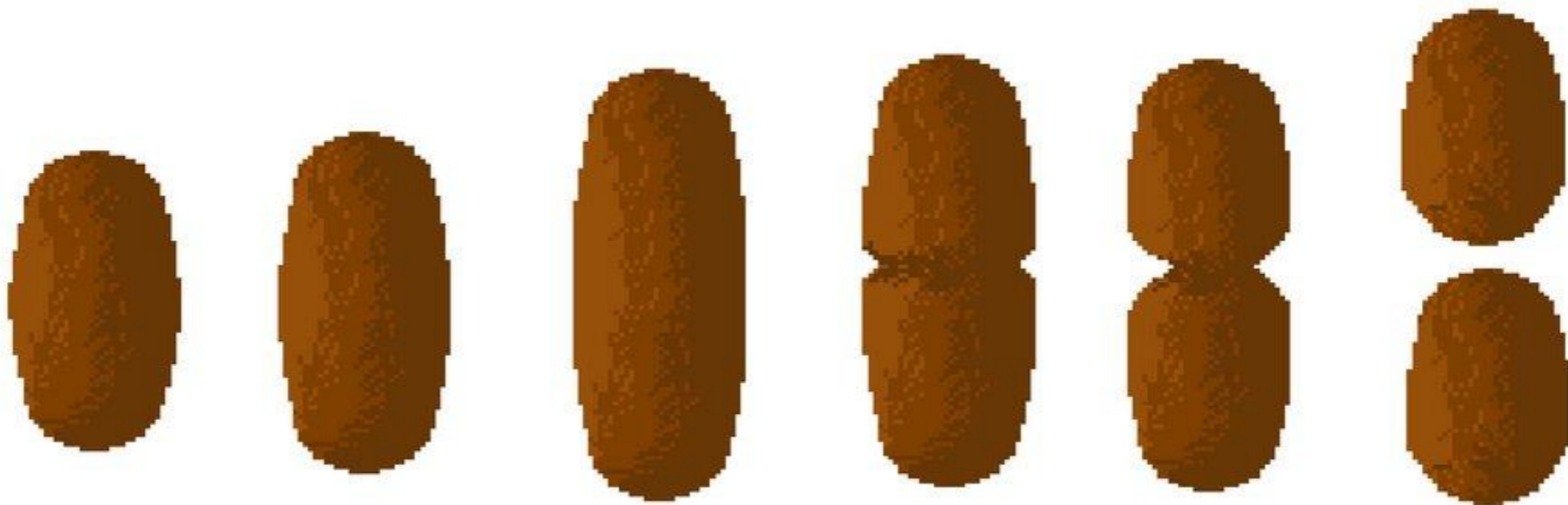
---

- 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

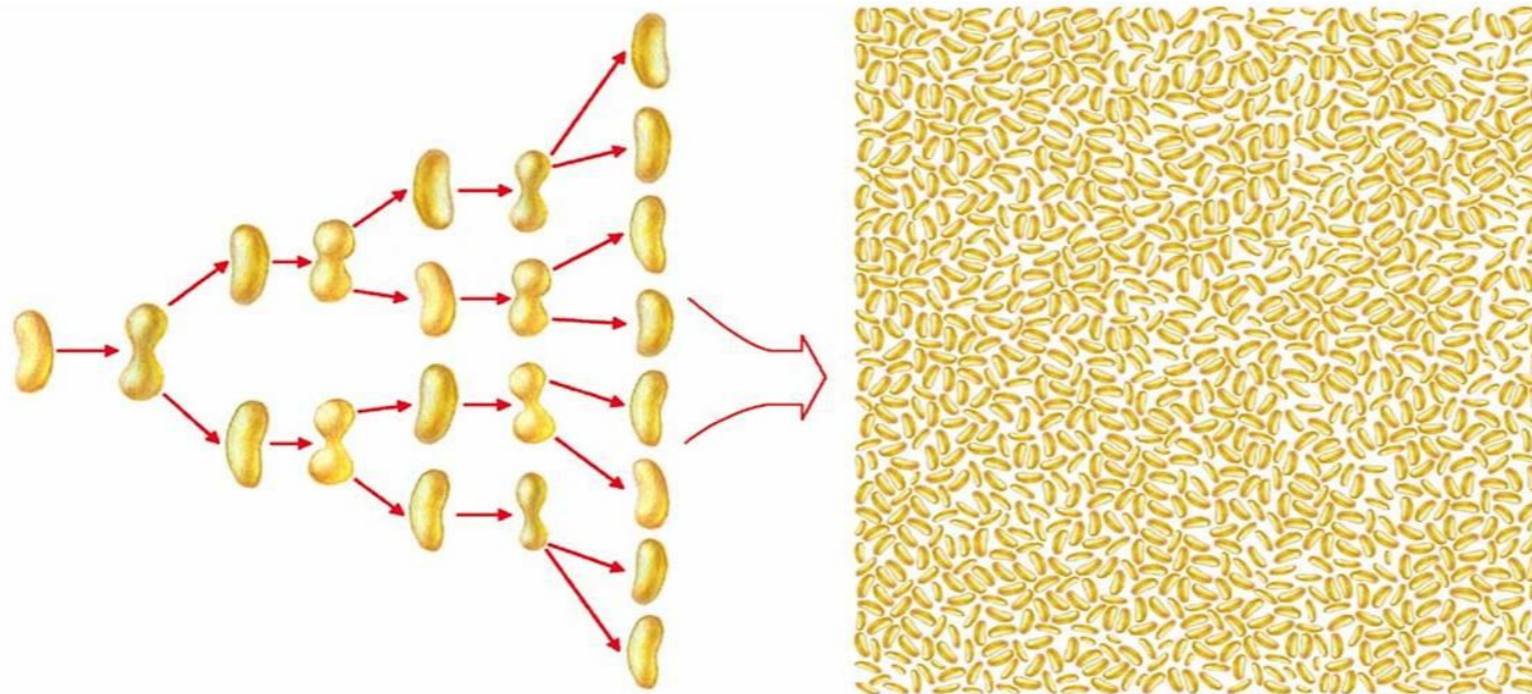
Размножаются бактерии делением одной клетки на две. Достигнув определённого размера, бактерия делится на две одинаковые бактерии.

*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 (двухспиральная 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:

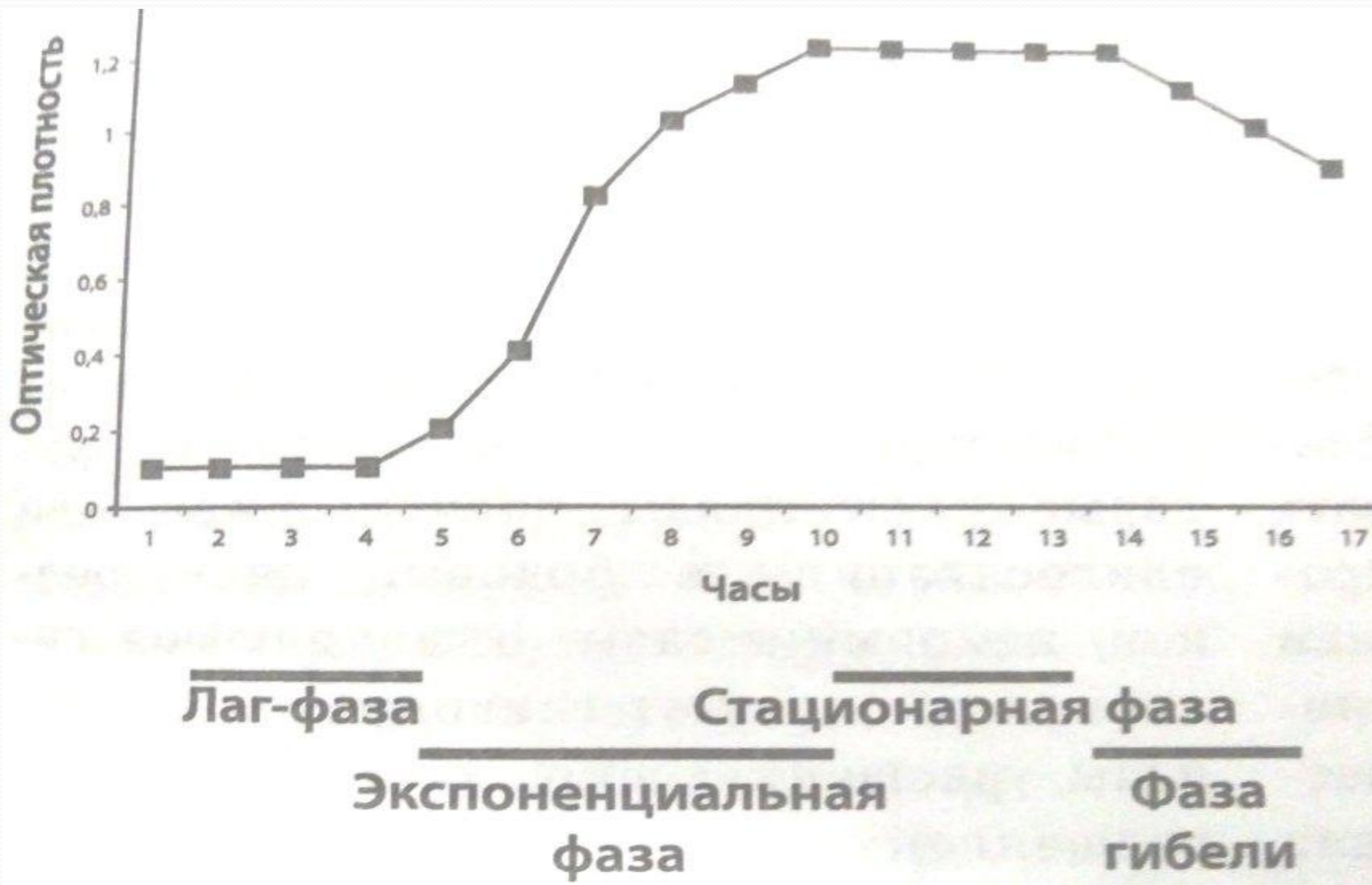
1. **лаг-фаза** — период между посевом бактерий и началом размножения. Продолжительность лаг-фазы в среднем 4—5 ч. Бактерии при этом увеличиваются в размерах и готовятся к делению; нарастает количество нуклеиновых кислот, белка и других компонентов.

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.

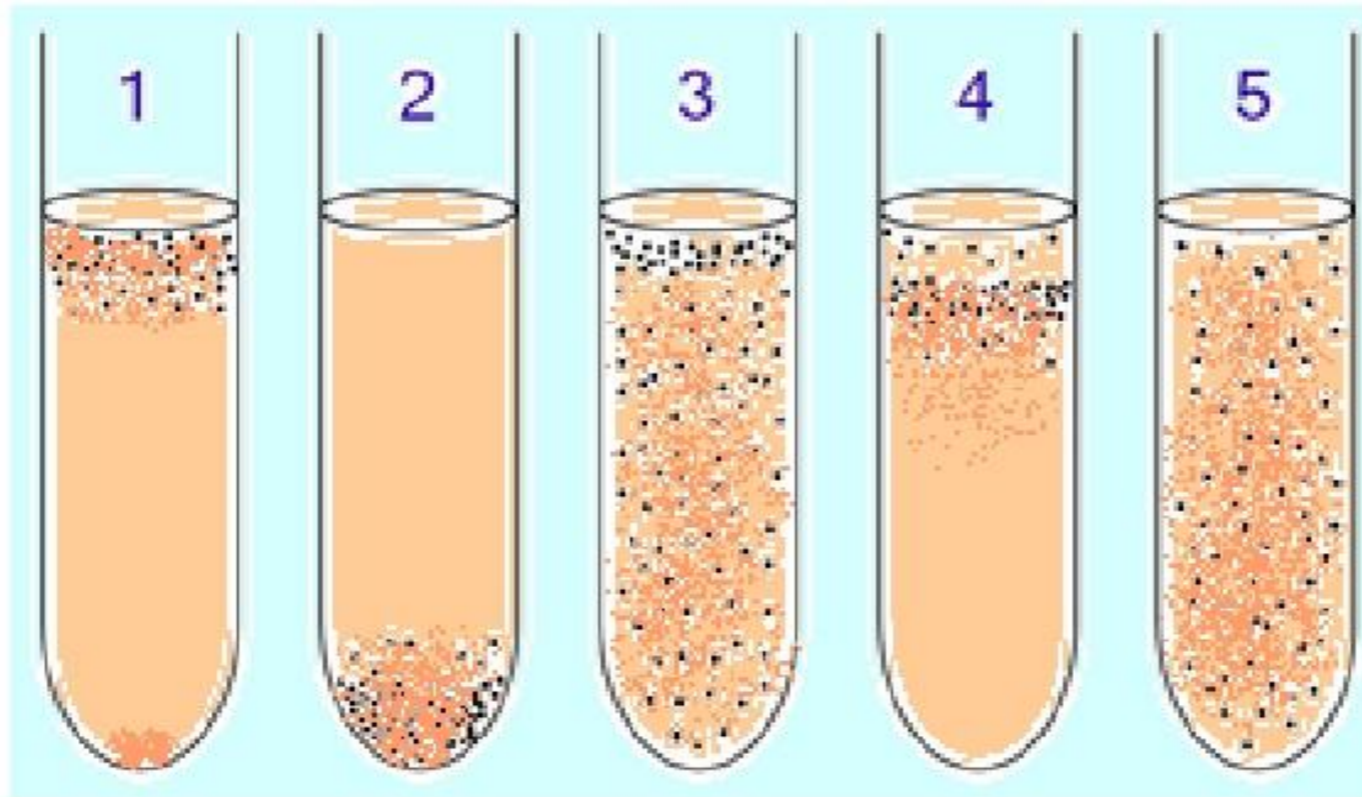
3. **фаза стационарного роста**, или максимальной концентрации бактерий; ( количество жизнеспособных клеток остается без изменений, составляя максимальный уровень (M-концентрация)).

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



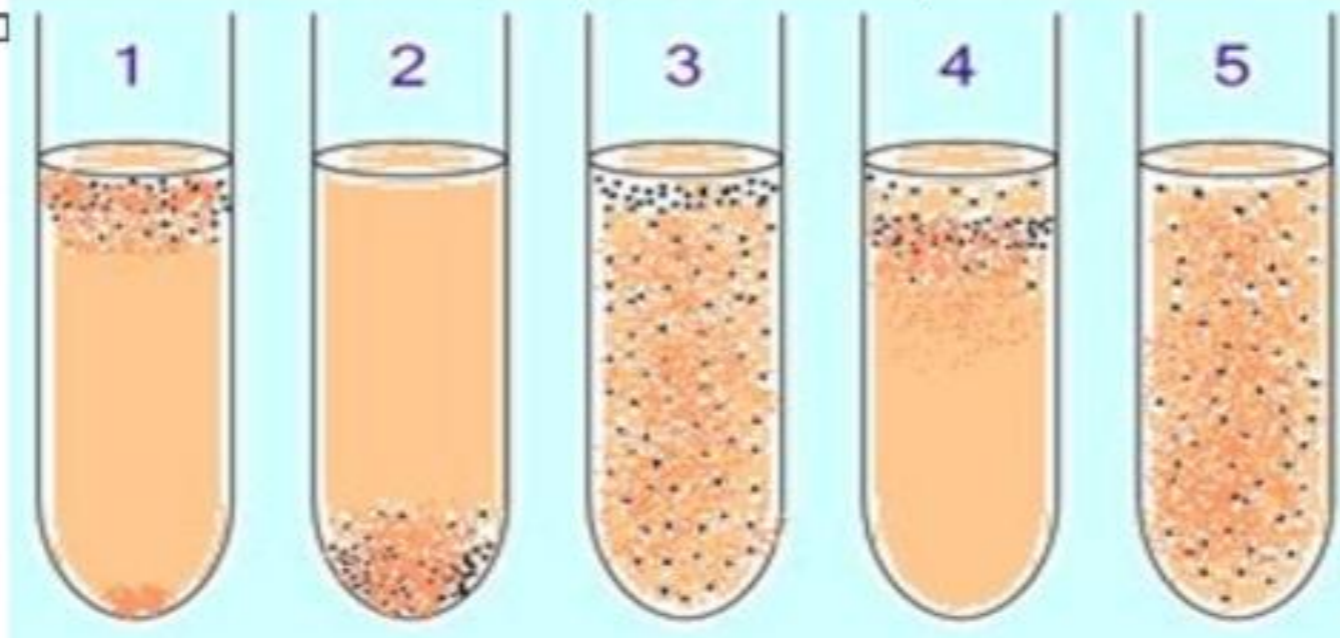
## ОТНОШЕНИЕ БАКТЕРИЙ К КИСЛОРОДУ



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 рН, 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) – неизменные 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

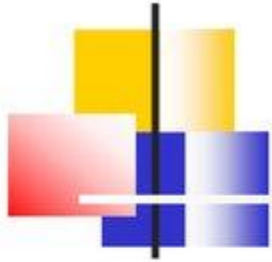


- мясо-пептонный бульон (**МПБ**) — жидкая среда
- мясо-пептонный агар (**МПА**) — плотная среда
- ❖ Обеспечивают рост большинства бактерий
- ❖ Служат основой для приготовления сложных сред



# 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**

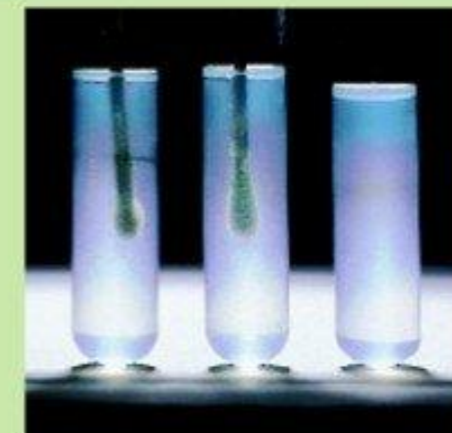
брюшнотифозные,  
паратифозные и  
дизентерийные  
палочки



# 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 diphtheriae*, *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 тиогликолат	1,00 г/л
Натрия глицерофосфат	10,00
Кальция хлорид	0,10
Метиленовый синий	0,002
Агар-агар	3,00
Конечное значение рН (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

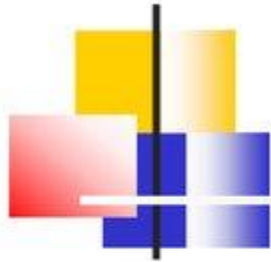


# ХАРАКТЕРИСТИКА КОЛОНИЙ

- **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)



ASM MicrobeLibrary.org © Wise and Paulson



## 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

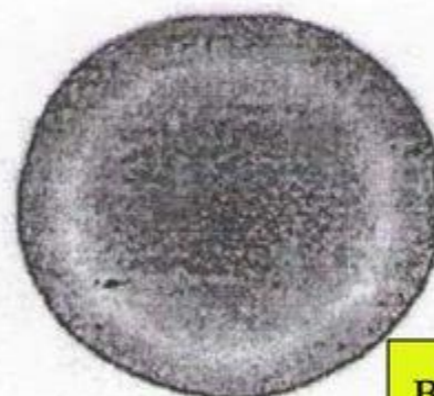
# Форма колоний микроорганизмов



а



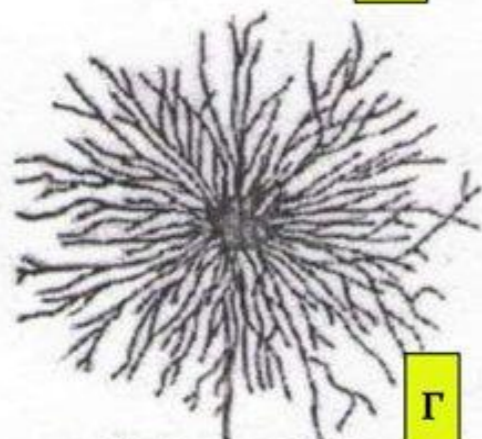
б



в



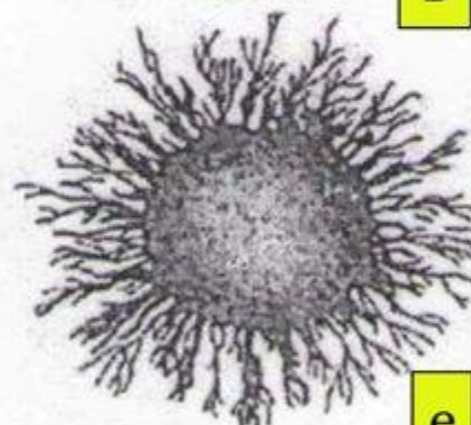
и



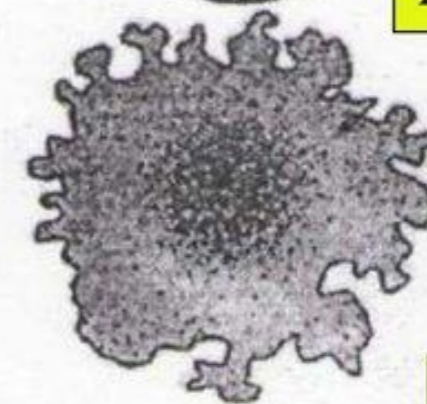
г



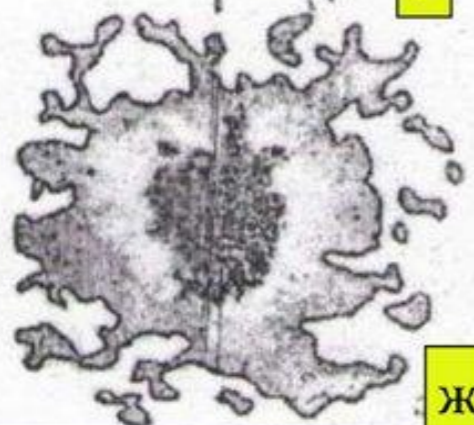
д



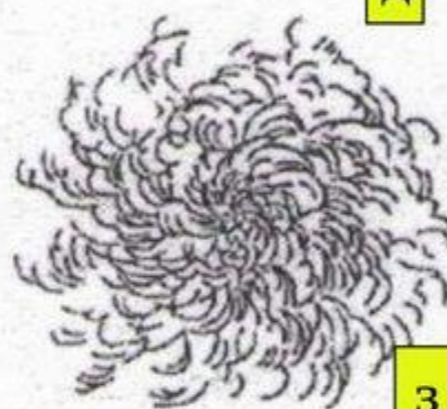
е



к



ж



з



л



м

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 - concentрическая; 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 рН 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  $25—35^{\circ}\text{C}$ . 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 ( $6^{\circ}\text{C}$ ) и замораживании (от  $-6$  до  $-20^{\circ}\text{C}$ ) пищевые продукты хорошо сохраняются, но при оттаивании и обработке их микробы вновь начинают свою деятельность.

**Максимальная температура** ( $45—50^{\circ}\text{C}$ ) 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 развития  $15^{\circ}\text{C}$  (плесневые грибы);

**мезофильные (микробы, развивающиеся при средней температуре)**, у которых оптимум составляет  $25—37^{\circ}\text{C}$  (болезнетворные, бактерии, дрожжи);

**термофильные (теплолюбивые)**, у которых оптимум  $50^{\circ}\text{C}$  (молочнокислые бактерии).

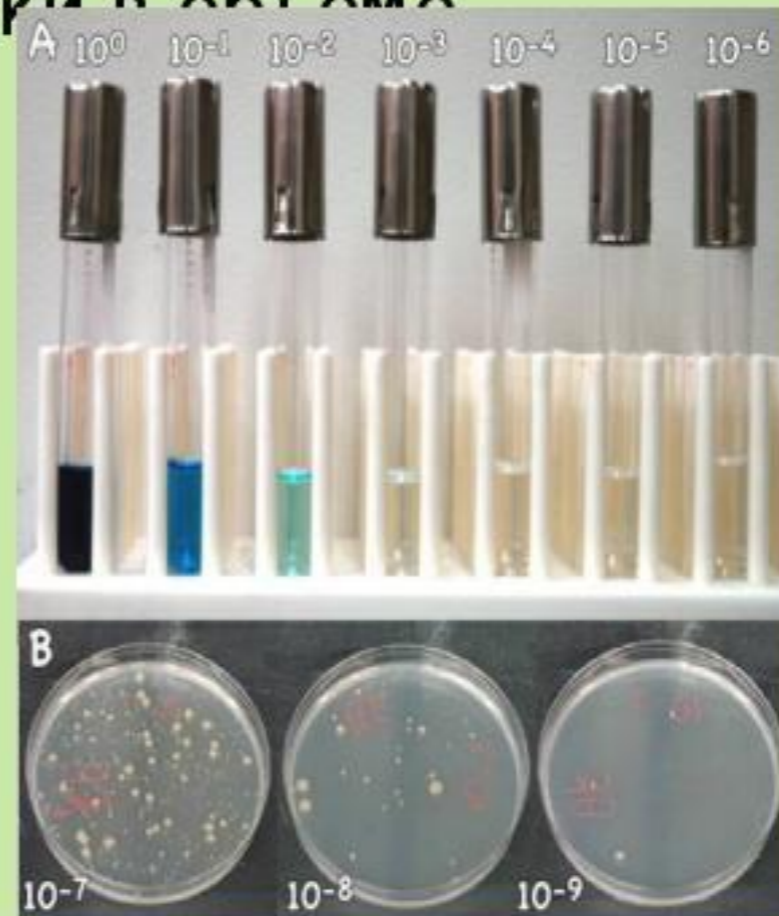
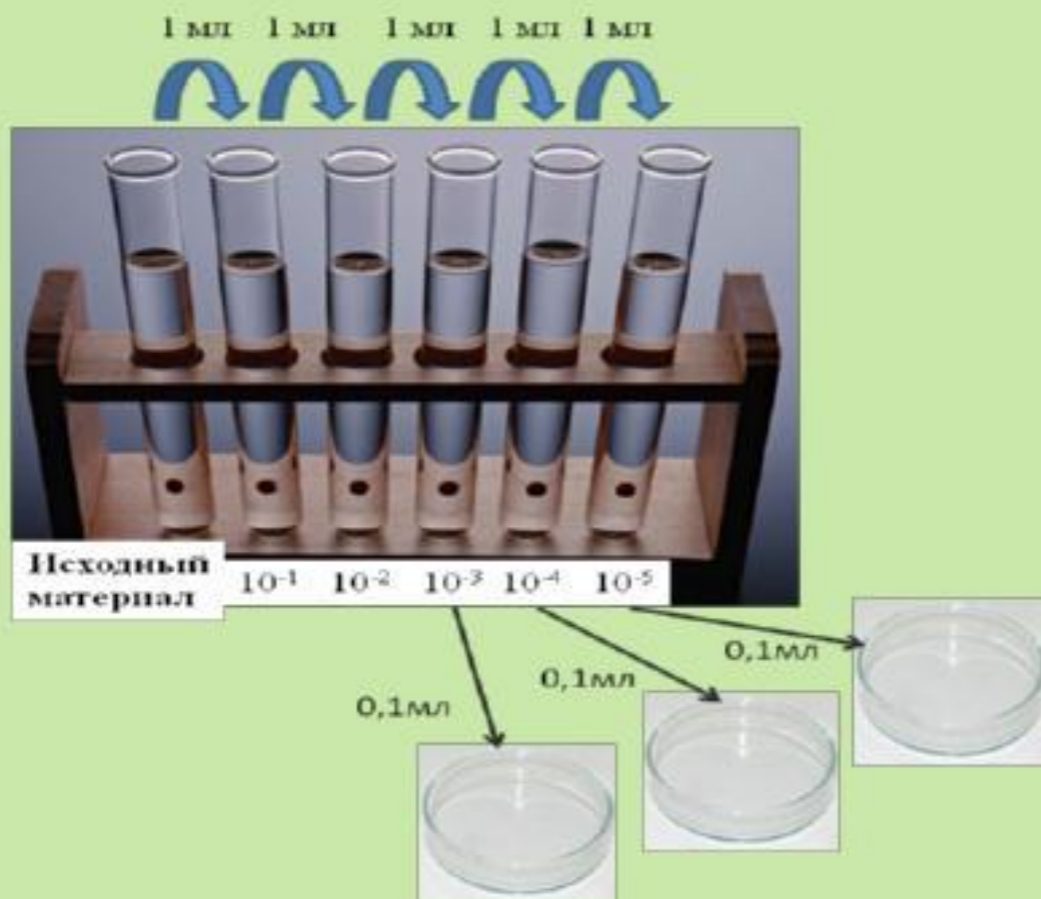


# Методы выделения чистых культур аэробов

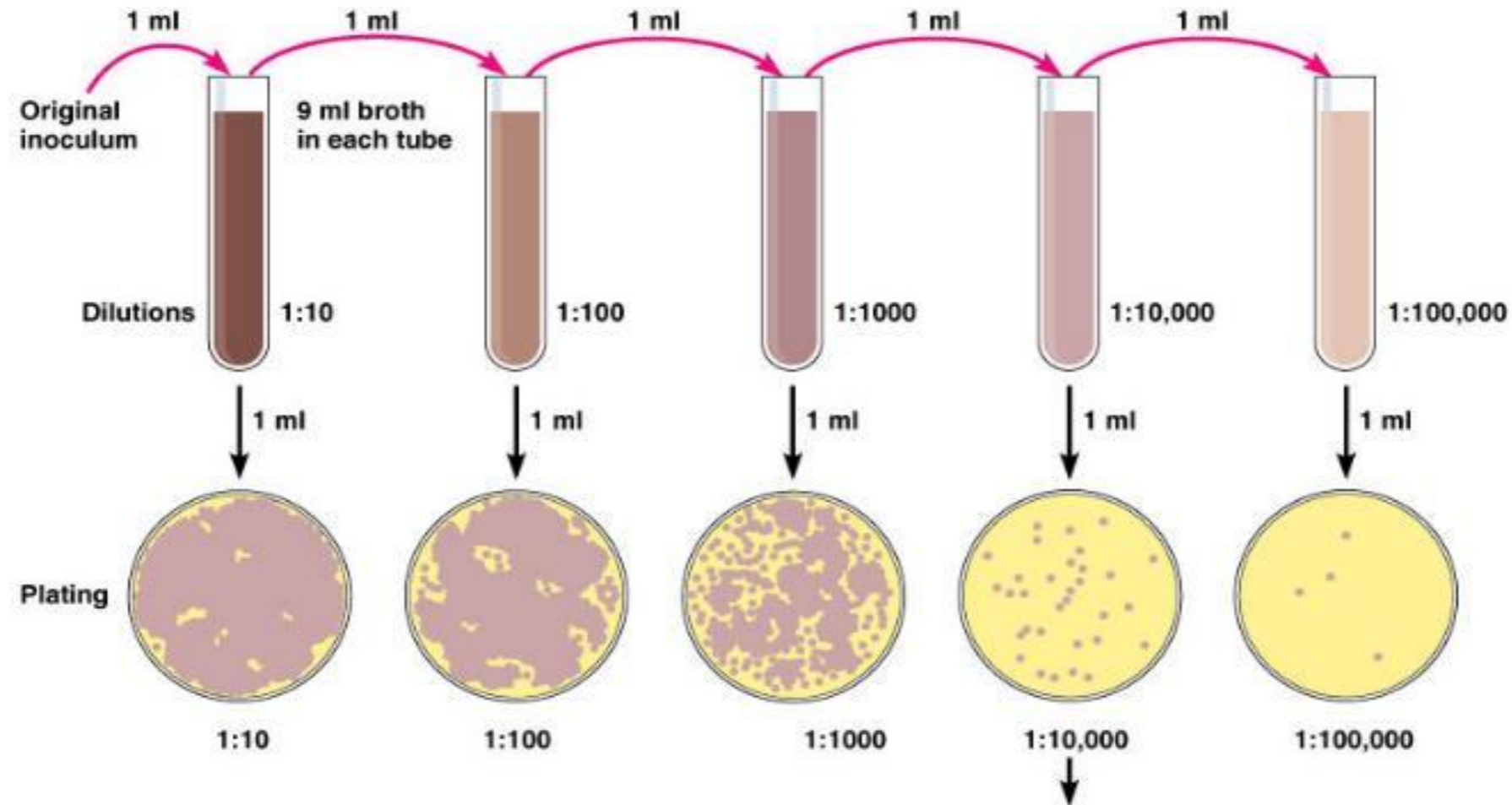
- ▶ 1. **Механическое разобращение клеток:**
- ▶ а) **метод Коха:** готовят десятикратные разведения материала в хлориде натрия, из каждого разведения 1 петлю вносят в пробирку с агаром (40°) и выливают его в чашку Петри;
- ▶ б) **метод Дригальского:** 1 петлю материала наносят на поверхность агара в 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  $\times$  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  $32 \times 10,000 = 320,000/\text{ml}$  in sample.)

# Метод Дригальского

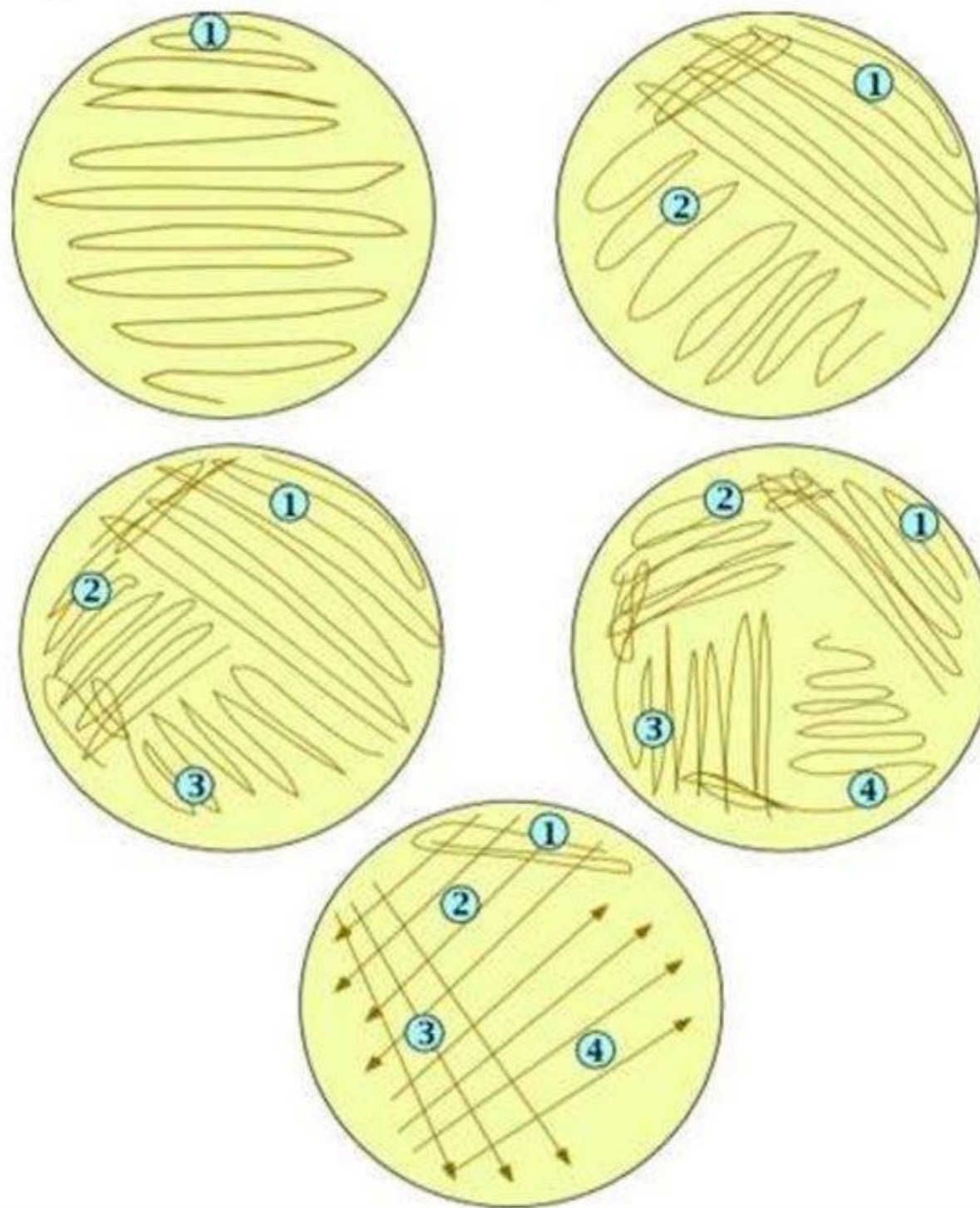
0,1мл материала вносят в первую чашку и стерильным стеклянным шпателем распределяют по поверхности среды. Затем этим же шпателем (не прожигая его в пламени горелки) делают такой же посев во второй и третьей чашках. С каждым посевом бактерий на шпателе остается все меньше и меньше и, при посеве на третью 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

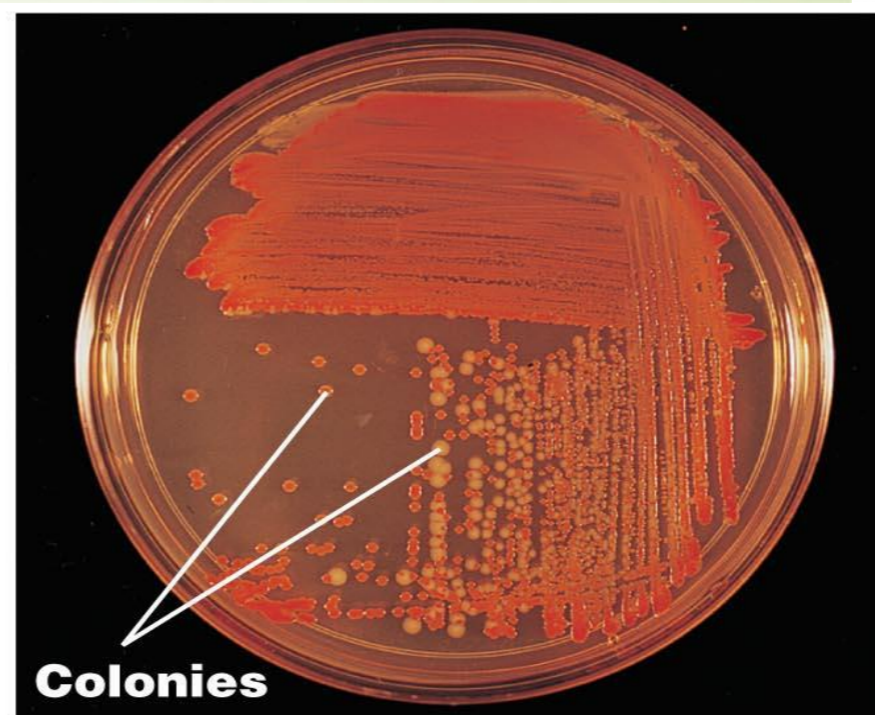
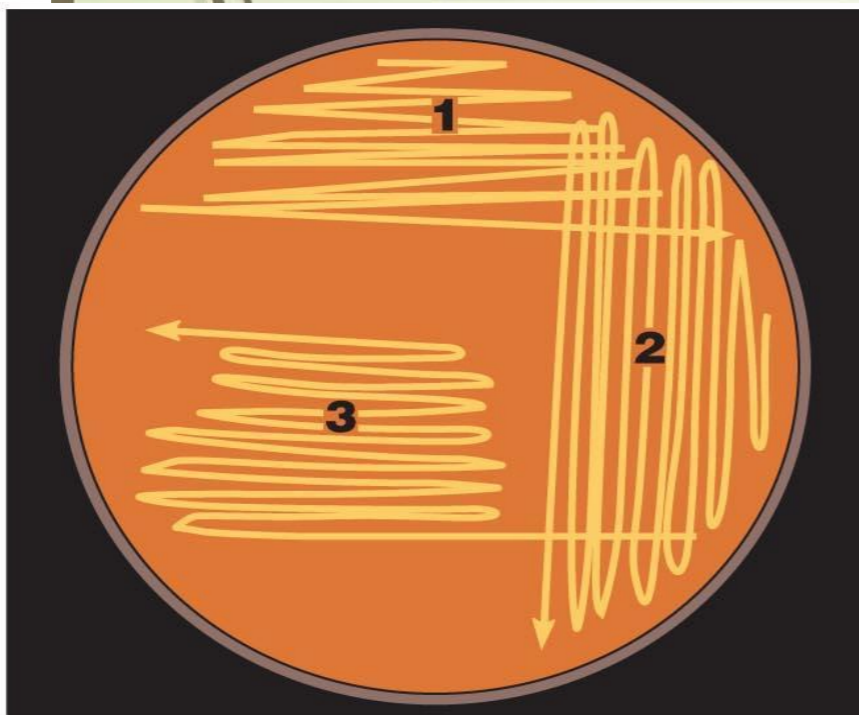
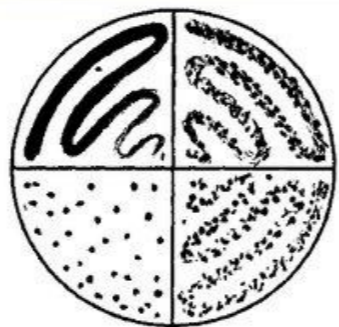
Область применения:  
для выделения чистых культур из материалов, содержащих обильную смешанную микрофлору.

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 .



# *Методы выделения чистых культур аэробов*

- ▶ **3. Избирательное подавление сопутствующих бактерий физическими или химическими факторами во время инкубации посевов.**

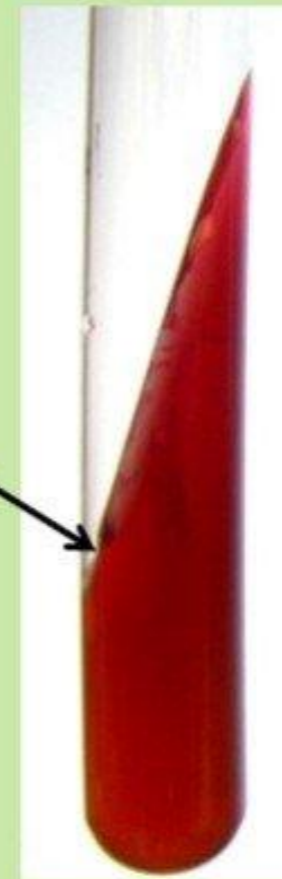
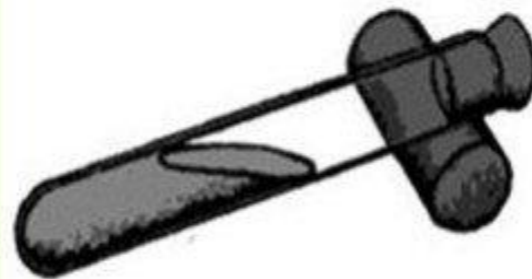
Например: для выделений иерсиний **чумы** посева инкубируют при  $T=5^{\circ}$

- ▶ **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 протей 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. Пересекая 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

- $\approx 37^{\circ}\text{C}$  – **мезофилы** (бол-во патогенных бактерий)
- $6 - 20^{\circ}\text{C}$  – **психрофилы** (возбудители чумы и лептоспироза),
- $50 - 60^{\circ}\text{C}$  – **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<sub>2</sub> – **микроаэрофилы**
  - ↑ CO<sub>2</sub> – **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