

Министерство сельского хозяйства РФ

ФГБОУ ВО «Брянский государственный
аграрный университет»

Институт ветеринарной медицины и биотехнологии

Кафедра эпизоотологии, микробиологии, паразитологии
и ветеринарно-санитарной экспертизы

ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

учебно-методическое пособие
для проведения лабораторных занятий по дисциплине «Микробиология»
студентами, обучающимися по направления 36.03.02 «Зоотехния»



Брянск 2024

УДК 579 (076)

ББК 28.4

Р 98

Рябичева, А. Е. Физиология микроорганизмов: учебно-методическое пособие для проведения лабораторных занятий по дисциплине «Микробиология» студентами, обучающимися по направлению 36.03.02 «Зоотехния» / А. Е. Рябичева, Н. С. Андриюшина. – Брянск: Изд-во Брянский ГАУ, 2024. - 43 с.

Учебно-методическое пособие подготовлено в соответствии с типовой учебной программой по изучению дисциплины «Микробиология» для проведения лабораторных занятий студентами, обучающимися по направлению 36.03.02. «Зоотехния».

Рецензенты:

Е.Е. Адельгейм, доцент кафедры нормальной и патологической морфологии и физиологии животных БГАУ

В.И. Ивашин, директор ГБУ Брянской области «Дубровская зональная вет-лаборатория»

Рекомендовано к изданию решением методической комиссии института ветеринарной медицины и биотехнологии Брянской ГАУ от 21 ноября 2024 года протокол № 3.

© Брянский ГАУ, 2024

© Рябичева А.Е., 2024

© Андриюшина Н.С., 2024

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
Тема 1. Питательные среды. Техника посева микробов. Культивирование и рост микроорганизмов	5
Тема 2. Культуральные и биохимические свойства микробов. Методы выделения чистой культуры аэробов и анаэробов. Принципы идентификации	15
Тема 3. Методы стерилизации. Общая характеристика противомикробных средств	30
Тема 4. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам и бактериофагам	36
Список литературы	42

ВВЕДЕНИЕ

Физиология микробов - это раздел микробиологии, изучающий химический состав микробных клеток, механизмы поступления питательных веществ внутрь клетки, энергетический и конструктивный метаболизм, системы секреции веществ из бактериальной клетки, рост и размножение бактерий.

Изучение физиологии микроорганизмов началось с работ французского ученого Л. Пастера и немецкого ученого Р. Коха, положивших начало физиологическому периоду развития микробиологии.

Л. Пастер доказал, что микроорганизмы отличаются друг от друга не только внешним видом, строением, но и особенностями обмена веществ. Кроме того, они могут вызвать разнообразные химические превращения в природе и быть возбудителями многих болезней. Им последовательно была раскрыта микробная природа спиртового молочнокислого, масляно-кислого и уксуснокислого брожения, а также процессов разложения белковых веществ (гниение) и мочевины. Л. Пастер открыл и научно обосновал анаэробный тип дыхания у микроорганизмов.

Работая над решением проблемы о самопроизвольном зарождении жизни, Л. Пастер экспериментально доказал невозможность самопроизвольного зарождения микробов в стерильной среде и впервые предложил методы стерилизации питательных сред и посуды при высокой температуре, что в дальнейшем открыло путь к разработке методов консервирования пищевых продуктов путём термической обработке в автоклавах.

Л. Пастер первым доказал, что каждая инфекционная болезнь людей и животных вызывается определенным возбудителем. С его именем связаны крупнейшие достижения в области ветеринарии и медицины.

Огромные заслуги в развитии микробиологии Роберта Коха (1843-1910), который открыл возбудителей туберкулёза, холеры и многих других заразных болезней. Р. Кох впервые применил плотные питательные среды для выращивания микроорганизмов и метод выделения из них чистых культур, изобрёл иммерсионный объектив к микроскопу, разработал методы окрашивания микроорганизмов анилиновыми красками для изучения их морфологии, применил микрофотографирование, а также стерилизацию субстратов текучим паром.

В результате изучения раздела физиология микроорганизмов студенты должны знать: способы посева микроорганизмов на питательные среды, классификацию питательных сред, требования предъявляемые к питательным средам, культуральные и биохимические свойства бактерий, методы выделения чистых культур.

ТЕМА 1

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ. ТЕХНИКА ПОСЕВА МИКРОБОВ. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель занятия: ознакомить студентов с рецептами и методиками приготовления питательных сред, с методами культивирования микроорганизмов. Освоить технику посева микроорганизмов на плотные и жидкие питательные среды.

Материалы и оборудование: колбы, воронки, марля, гигроскопическая вата, пробирки с ватными пробками, градуированные пипетки различной емкости, электроплитка, набор полуфабрикатов питательных сред, весы, чашки Петри, пробирки, бактериологические петли, стеклянные шпатели, анаэроустат, эксикатор, термостат, стерильные пипетки Пастера, шпатели, бактериологические петли, питательные среды, плакаты, резентации.

Содержание и методика работы

Требования, предъявляемые к питательным средам

1. В среде должны быть все необходимые для роста и развития химические элементы;

2. Среда должна быть сбалансирована по химическому составу. Это значит, что соотношение химических элементов питательной среды и главным образом соотношение органических элементов - С:N должно примерно соответствовать этому соотношению в клетке;

3. Среды должны иметь достаточную влажность, обеспечивающую возможность диффузии питательных веществ в клетку. Для грибов эта влажность обеспечивается содержанием влаги в субстрате не менее 12 %, для бактерий – не менее 20 %.

4. Среда должна иметь определенное значение pH среды. Среди микроорганизмов различают *ацидофилы* (кислотолюбивые микроорганизмы), *алкалофилы* (щелочелюбивые микроорганизмы) и *нейтрофилы* (лучше всего растут в нейтральной среде с pH около 7,0). К ацидофилам относятся грибы и дрожжи. Большинство бактерий – нейтрофилы, для которых активная кислотность среды около 4 ед. pH является губительной. Следует помнить, что при стерилизации среды и в процессе культивирования микроорганизмов, кислотность среды может сильно изменяться. Во избежание изменения pH в среду добавляют буферные системы (например: фосфатный буфер), CaCO₃ (для нейтрализации образующихся в результате культивирования органических кислот), вещества органической природы, обладающие буферными свойствами (например: аминокислоты, полипептиды, белки) и др.;

5. Среды должны быть изотоничными для микробной клетки, т. е. осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки.

6. Среды должны обладать определенным окислительно-восстановительным потенциалом (r_{h_2}), определяющим насыщение ее кислородом. По шкале от 0 до 41 этим индексом можно обозначить любую степень аэробности: насыщенный

кислородом раствор обозначают $rh_2=41$, насыщенный водородом $rh_2=0$. Обязательные анаэробы размножаются при rh_2 не выше 5, аэробы – не ниже 10.

7. *Среды должны быть стерильными*, что обеспечивает рост чистых культур микроорганизмов.

Классификация питательных сред

По составу различают синтетические и натуральные питательные среды.

Синтетические среды представляют собой водные растворы определенных химически чистых соединений в установленных дозировках, т.е. их состав полностью известен. Однако лишь для немногих, не требовательных к питанию микроорганизмов, используют синтетические питательные среды.

Натуральные или *естественные* среды состоят из продуктов растительного или животного происхождения и имеют сложный неопределенный химический состав. К ним относятся мясопептонный бульон (МПБ) и мясопептонный агар (МПА), солодовое сусло и сусло-агар, обезжиренное или гидролизованное молоко, отвары различных овощей и т.д.

По целевому назначению питательные среды делят на основные, селективные и дифференциально-диагностические.

Основными являются среды, которые применяют для выращивания многих бактерий. Это МПБ, триптические гидролизаты мясных, рыбных продуктов, казеина. Такие среды служат основой для приготовления сложных питательных сред.

Селективные среды предназначены для избирательного выделения и накопления микроорганизмов определенного вида (или определенной группы) из объектов, содержащих разнообразную микрофлору. Сопутствующие микроорганизмы или совсем не растут на таких средах, или развитие их сильно подавлено. Разработка селективных сред основана на биологических особенностях, отличающих данные микроорганизмы от многих других.

Дифференциально-диагностические среды позволяют по возможности быстро установить и отличить (дифференцировать) одни виды или группы микроорганизмов от других. Их состав подбирается с таким расчетом, чтобы он позволил четко выявить наиболее характерные свойства данного вида. Часто это достигается введением в среды специальных красителей-индикаторов, которые окрашивают колонии выявляемых микроорганизмов в определенный цвет. В частности, для культивирования бактерий группы кишечной палочки используют дифференциально-диагностические среды Эндо, Плоскирева, Левина и др.

По физическому состоянию среды разделяют на жидкие, полужидкие, плотные, сухие.

Жидкие среды (бульоны) используют для накопления биомассы микроорганизмов или продуктов их метаболизма, а также для выявления физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов.

Полужидкие среды содержат от 0,08 до 0,7 % агара.

Плотные среды готовят из жидких путем добавления к ним желирующих веществ – желатина или агара (1,5–2,0 %). Оба эти вещества при растворении в горячей воде образуют коллоидный раствор, дающий при охлаждении плотный студень (гель). Студнеобразные среды можно вновь расплавлять нагреванием. Плотные среды используют для выделения чистых культур микроорганизмов, в диагностических целях (описание выросших на среде колоний), для количественного учета микроорганизмов, определения антагонистической, протеолитической активности и т. д.

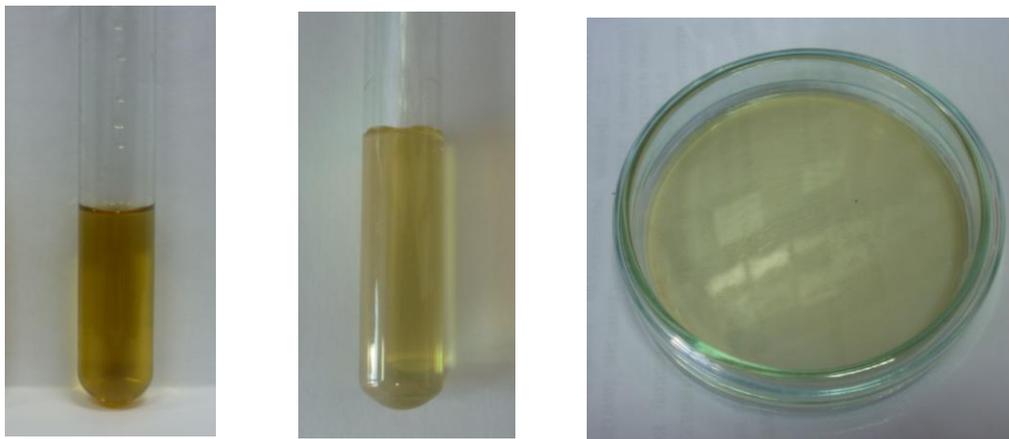


Рисунок 1 - Питательные среды: а – МПБ, б – МПЖ, в – МПА

Сухие питательные среды, выпускаемые специальными предприятиями, используют в микробиологических целях путем добавления в них воды с последующей стерилизацией.

Техника посевов микроорганизмов на питательные среды

Для работы с микроорганизмами используют специальные бактериологические петли, иглы, шпатели, пипетки. Посевы всегда проводят около пламени горелки. Около работающего с чистой культурой нельзя делать резких движений, ходить, кашлять и т.п., так как движение воздуха увеличивает опасность попадания посторонних микроорганизмов в пробирку с культурой. Поэтому посевы и пересевы микроорганизмов рекомендуется проводить в боксе.

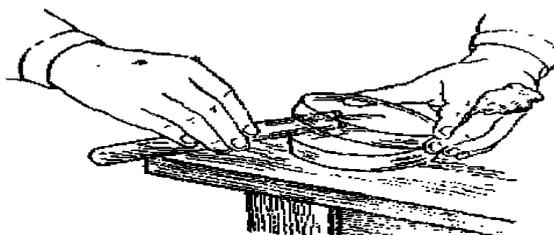


Рисунок 2 - Правила разливания питательной среды в чашки Петри

Посев в жидкую питательную среду. Посев производят петлей или градуированной пипеткой. Посевной материал бактериологической петлей осторожно вносят в пробирку и легко встряхивают в верхнем слое питательной среды или растирают по стенке, смывая его жидкой средой.

Стерильную пипетку фламбируют (обжигают) в пламени горелки, опускают в пробирку с культурой, отбирают определенное количество материала и переносят его в пробирку со свежей питательной средой, выпуская жидкость по стенке пробирки, или вносят пипетку вглубь среды и выдувают содержащийся в ней материал.

Посев штрихом в пробирку со скошенным агаром. Пробирку с культурой и пробирку со скошенным питательным агаром берут в левую руку и держат в наклонном положении. В правую руку берут бактериологическую иглу и прокалывают ее в пламени спиртовки до покраснения, затем проносят сквозь пламя иглодержатель. Мизинцем правой руки вынимают пробки из обеих пробирок, обжигают края пробирок. Петлю вводят в пробирку с культурой, охлаждают ее о края пробирки и осторожно снимают небольшое количество микробной культуры. Петлю с посевным материалом быстро переносят в пробирку со стерильной средой и опускают почти до дна, где скапливается небольшое количество конденсационной влаги. Слегка касаясь агара, проводят зигзагообразную линию, при этом петлю не отрывают от поверхности питательной среды. После посева петлю вынимают из пробирки и обжигают вместе с остатками посевного материала.

Затем обжигают края пробирок и внутренние концы пробок, после чего пробирки закрывают. На наружной поверхности пробирки пишут дату посева и наименование культуры.

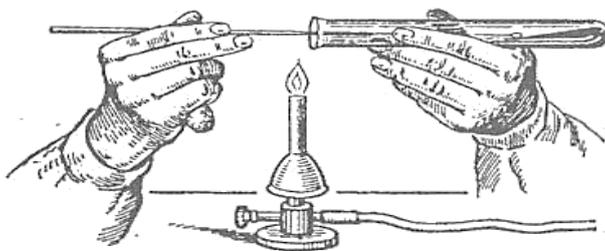


Рисунок 3 - Посев микроорганизмов «штрихом» на скошенный агар

Посев уколом. Профламбированной бактериологической иглой берут исследуемую культуру. Пробирку со столбиком питательной среды берут в правую руку, переворачивают вверх дном, вынимают из нее пробку, прижимая ее мизинцем к ладони. Подняв пробирку на уровень глаз, в центре столбика прокалывают плотную среду иглой снизу вверх на всю глубину. Затем иглу извлекают и обжигают вместе с остатками посевного материала, пробирку закрывают пробкой, подписывают и помещают в термостат для выращивания.

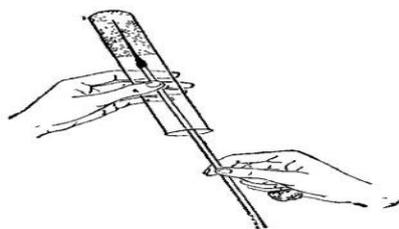


Рисунок 4 - Посев уколом на плотную питательную среду

Посев на поверхность среды в чашку Петри. В чашки Петри заливают расплавленный агар, дают ему застыть и подсушивают в термостате. Посев проводят бактериологической петлей или шпателем Дригальского (стеклянная палочка, согнутая в виде треугольника). При использовании петли посев осуществляют штриховым методом. Крышку чашки Петри слегка приоткрывают настолько, чтобы в образующуюся щель проходила петля. Петлю кладут плашмя на питательную среду, чтобы не поцарапать ее, и наносят микробную культуру зигзагообразными движениями (штрихом) по всей поверхности агара, не отрывая от среды, что дает возможность получить изолированные колонии.

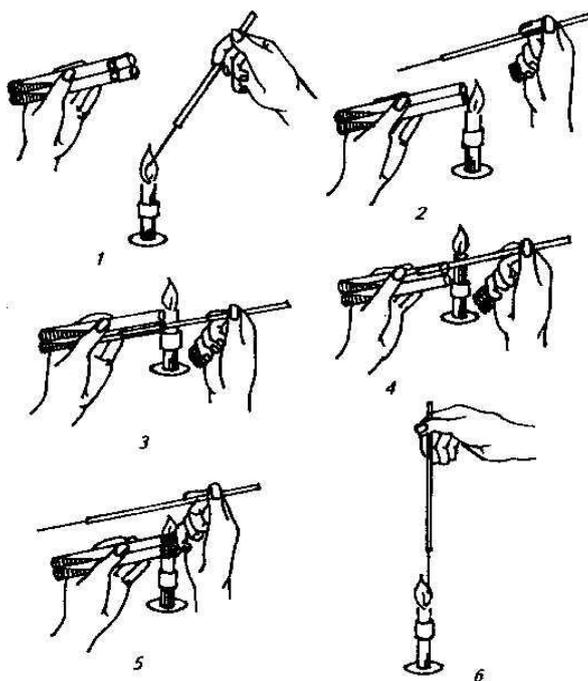


Рисунок 5 - Пересев культуры микроорганизмов в пробирку

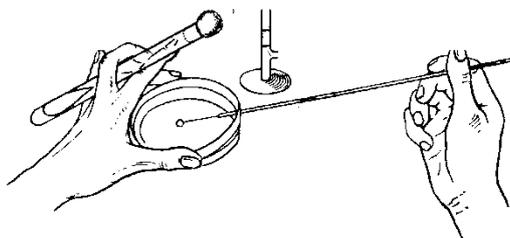


Рисунок 6 - Посев на плотную питательную среду в чашки Петри

Посевы «газоном» производят шпателем. Для этого, приоткрыв левой рукой крышку чашки Петри, петлей или пипеткой наносят посевной материал на поверхность питательного агара. Затем проводят шпатель сквозь пламя горелки, остужают его о внутреннюю сторону крышки и растирают материал по всей поверхности среды. После посева шпатель вынимают и обжигают вместе с остатками посевного материала. После инкубации посевов в чашке появляется равномерный газон выросшей культуры.

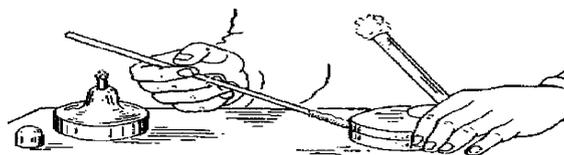


Рисунок 7 - Посев на агар в чашки Петри шпателем Дригальского

Глубинный посев в чашку Петри. Определенное количество подготовленного к посеву исследуемого материала ($1,0$ или $0,1 \text{ см}^3$) вносят пипеткой в пустую чашку Петри. Из пробирки или колбы с расплавленной и остуженной до 45°C питательной средой вынимают пробку, обжигают края в пламени горелки и, слегка приоткрыв крышку, выливают на дно чашки.

Пробирки и чашки с посевами помещают в термостат с температурой, оптимальной для конкретного микроорганизма. Как правило, мезофильные бактерии выращивают при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$, термофильные бактерии – при $40\text{--}55^\circ\text{C}$, дрожжи и плесени – при $30\pm 1^\circ\text{C}$.

Культивирование и рост микроорганизмов

Выращивание микроорганизмов на питательных средах называется *культивированием*, а развившиеся в таких средах микроорганизмы – *культурой*. При культивировании происходит рост культуры – физиологический процесс, в результате которого увеличивается *биомасса* – масса клеточного вещества данного микроорганизма.

Чистой культурой микроорганизма называют культуру, которая представлена потомством одной клетки. Естественным путем получить чистую культуру почти невозможно, поэтому ее получают искусственно. Для выделения чистой культуры используют плотные питательные среды, на которых каждая клетка вырастает в виде *изолированной колонии* – популяции микроорганизмов одного вида.

Перед выделением чистой культуры из какого-либо пищевого продукта или природного субстрата (например: почвы, воды), в котором данный микроорганизм находится в небольших количествах, вначале получают накопительные культуры, проводя культивирование в элективных условиях.

Накопительные культуры состоят преимущественно из клеток микроорганизмов одного вида. *Элективные (накопительные) условия* – условия, способ-

ствующие развитию одной культуры и ограничивающие развитие сопутствующих микроорганизмов. Создать накопительные условия можно путем использования накопительных сред. Примером селективных условий может быть повышенная температура (для выделения термоустойчивых форм бактерий), повышенная кислотность, повышенная концентрация соли и т.д.

Инкубация – культивирование микроорганизмов при определенной температуре.

Хранят чистые культуры обычно на плотных питательных средах в пробирках. При этом постоянно необходимо делать пересевы на свежую питательную среду.

К другим способам хранения чистых культур относятся сохранение их на накопительной среде под слоем вазелинового масла и хранение в лиофилизированном состоянии (сушка под вакуумом замороженных клеток микроорганизмов).

В пищевой промышленности применяют чистые культуры дрожжей, молочнокислых, уксуснокислых, пропионовокислых бактерий, обладающих ценными свойствами для производства. В последнее время находят успешное применение многокомпонентные чистые культуры, состоящие из двух и более видов микроорганизмов.

Работа по получению и поддержанию чистых культур промышленных микроорганизмов осуществляется в научно-исследовательских лабораториях. Там они выделяются из различных субстратов, изучаются, и наиболее продуктивные, пригодные для производства, хранятся в коллекции музея чистых культур, откуда рассылаются отраслевыми научно-исследовательскими институтами на предприятия. В заводской лаборатории микробиолог подготавливает культуру для производственного цикла, проверяет ее биологическую чистоту, активность.

Способ культивирования зависит от конечной цели культивирования (целью является либо накопление биомассы, либо получение определенного продукта жизнедеятельности – метаболита).

Поверхностное культивирование заключается в выращивании аэробных микроорганизмов на поверхности жидких и сыпучих питательных сред. При этом микроорганизмы получают кислород непосредственно из воздуха. При поверхностном культивировании на жидких средах микроорганизмы растут в виде пленок. Осуществляется поверхностное культивирование в специальных ваннах – *кюветах*.

Глубинное культивирование проводится на жидких питательных средах, в которых микроорганизмы развиваются во всем объеме питательной среды. Сочетание питательной среды и растущих в ней микроорганизмов называют *культуральной жидкостью*. Осуществляется глубинное культивирование в специальных аппаратах – *ферментаторах*, снабженных мешалками и системой подвода стерильного воздуха для обеспечения роста аэробных микроорганизмов. *Аэрирование* – продувание стерильного воздуха через культуральную жидкость.

При *периодическом культивировании* весь объем питательной среды засевают чистой культурой, которую выращивают в оптимальных условиях определенный период времени до накопления нужного количества целевого продукта. Следует отметить, что, так как культивирование ведется на невозобновляемой

питательной среде (в стационарных условиях), то клетки все время находятся в меняющихся условиях. Таким образом, периодическую систему можно рассматривать как замкнутую систему.

При *непрерывном культивировании* культура находится в специальном аппарате, куда постоянно притекает питательная среда и откуда с такой же скоростью отводится культуральная жидкость. Для микроорганизма создаются неизменные условия среды, поэтому непрерывную систему можно рассматривать как открытую систему.

Поверхностное культивирование может быть только периодическим, в то время как глубинное культивирование может осуществляться и периодическим, и непрерывным способом.

При периодическом способе культивирования популяция микроорганизмов проходит 7 стадий (фаз) роста (рис. 8).

1. *Лаг-фаза*. В этот период культура адаптируется к новой среде обитания. Активируются ферментные системы, возрастает количество нуклеиновых кислот, клетка готовится к интенсивному синтезу белков и других соединений. Клетки не размножаются (скорость размножения равна нулю). Концентрация живых клеток постоянна и равна количеству внесенных клеток. Продолжительность этой фазы зависит от физиологических особенностей микроорганизма и от состава питательной среды.

2. *Фаза ускорения роста*. Эта фаза характеризуется началом деления клеток, увеличением общей массы и постоянным увеличением скорости роста культуры. Эта фаза обычно непродолжительна.

3. *Экспоненциальная (логарифмическая) фаза роста*. В этот период микроорганизмы размножаются с постоянной максимальной скоростью. При этом логарифм числа клеток линейно зависит от времени. К концу этой фазы среда истощается вследствие катаболических и анаболических процессов, в среде накапливаются продукты жизнедеятельности микроорганизмов. Возникает и пространственная ограниченность, так как клетки мешают друг другу.

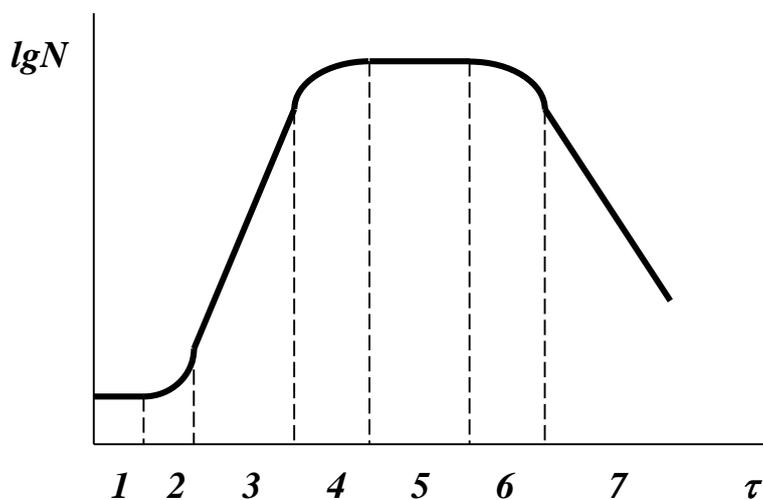


Рисунок 8 - Кривая роста статической культуры:
 N – концентрация жизнеспособных клеток;
 τ – продолжительность культивирования

4. *Фаза замедления роста.* В этот период снижается скорость роста, небольшая часть клеток гибнет. Скорость роста выше скорости отмирания.

5. *Стационарная фаза.* Количество живых клеток достигает максимума. Скорость роста равна скорости отмирания клеток, поэтому концентрация жизнеспособных клеток остается постоянной.

6. *Фаза ускорения отмирания.* Количество отмерших клеток (скорость отмирания) становится больше количества образовавшихся клеток.

7. *Фаза отмирания.* Масса живых клеток значительно уменьшается, так как в среде нет питательных веществ, а запасные вещества клетки исчерпываются.

При непрерывном способе культивирования культура поддерживается в какой-то фазе роста.

Если цель культивирования – получение биомассы продуцента, процесс целесообразно вести в режиме логарифмической фазы, когда микроорганизм способен обеспечить максимальную скорость роста популяции.

Для поддержания культуры в логарифмической фазе культивирование микробной популяции проводят в условиях хемостата или турбидостата.

Рост в хемостате. Хемостат состоит из сосуда, в который вводят с постоянной скоростью питательный раствор. По мере поступления питательного раствора из него вытекает суспензия микроорганизмов с той же скоростью. При культивировании в условиях хемостата поддерживается постоянная концентрация одного из компонентов среды (например, углерода). Благодаря этому в условиях хемостата поддерживается постоянная скорость роста культуры. Культура микроорганизма находится в условиях динамического равновесия.

Рост в турбидостате. Работа турбидостата основана на поддержании постоянной концентрации живых клеток. В сосуде для культивирования все питательные вещества содержатся в избытке, а скорость роста бактерий приближается к максимальной.

Если же целью культивирования является получение метаболита (например, этилового спирта), выход которого в среду обитания не соответствует логарифмической фазе роста, применяется способ непрерывного выращивания в двух или нескольких последовательно соединенных аппаратах, что позволяет как бы расчленить процесс на несколько стадий.

Контрольные вопросы

1. Как классифицируют питательные среды по составу компонентов и назначению?

2. Какие среды позволяют получить преимущественный рост одних микробов при одновременном подавлении роста других?

3. Какими методами производят посев микроорганизмов на питательные среды?

4. Как классифицируют питательные среды по составу компонентов и назначению?

5. Что такое «культивирование»?

6. Какие способы культивирования микроорганизмов Вы знаете?

7. Чем поверхностное культивирование отличается от глубинного?
8. Что такое «чистая культура» микроорганизма?
9. Как получают и хранят чистые культуры?
10. Дать определение «накопительной культуре» микроорганизма.
11. Каким образом можно получить накопительную культуру?
12. Охарактеризовать логарифмическую фазу роста периодической культуры.
13. Как поддерживают условия хемостата при росте непрерывной культуры?
14. Как поддерживают условия турбидостата при росте непрерывной культуры?
15. Чем отличается периодическое культивирование от непрерывного?
16. Охарактеризуйте стационарную фазу роста периодической культуры.
17. Какие микроорганизмы можно культивировать поверхностным способом?
18. Каким образом осуществляется культивирование микроорганизмов глубинным способом?

ТЕМА 2

КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИКРОБОВ. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ АЭРОБОВ И АНАЭРОБОВ. ПРИНЦИПЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ

Цель занятия: ознакомиться с основными культуральными свойствами микроорганизмов, с лабораторными методами определения ферментативной активности, используемыми при идентификации, со способами выделения микроорганизмов чистых культур аэробов и анаэробов, освоить некоторые методы, оценить диагностическую значимость получения чистой культуры. Освоить некоторые методы определения биохимических свойств микробов. Усвоить, в чем значимость определения культуральных и биохимических свойств микроорганизмов.

Материалы и оборудование: культуры сальмонелл и стафилококка в полужидком агаре, культуры корневидного микроба и сенной палочки на МПА, в МПБ. Посевы с этими микроорганизмами на агаре в чашках Петри, пробирки с чистыми культурами золотистого стафилококка, сальмонелл, эшерихий, стерильные пастеровские пипетки, 5% раствор перекиси водорода, стерильные пинцеты, стерильные питательные среды: полужидкий МПА с глюкозой, лактозой, сахарозой и индикатором ВР (состоит из смеси водного голубого и розоловой кислоты), или пробирки с жидкими средами Гисса – индикатором Андраде с углеводами и поплавками, молоко с метиленовым синим и с лакмусом, МПА, МПБ, МПЖ, чашки Петри с агаром Эндо и Левина и кровавым агаром, среды Симонса и Клигера, индикаторные бумажки для определения сероводорода, индола, аммиака, пробирки с питательными средами: МПБ с глюкозой, лактозой, сахарозой, молоко с лакмусом, молоко с метиленовым синим, МПБ с закрепленными индикаторными бумажками для определения сероводорода, индола, аммиака, две чашки Петри с агаром Эндо и Левина, пастеровские стерильные пипетки, резиновые груши, пробирки со смесью культур, чашки Петри с МПА, плакаты, микроанаэроостаты, эксикаторы, аппарат Аристовского, питательные среды, бактериологические петли, спиртовки, плакаты.

Содержание и методика работы

Культуральные свойства микробов

Культуральные признаки микробов определяются характером роста их на питательных средах. Будучи постоянными, для каждого вида микроба, они являются важным диагностическим признаком.

Рост микробов на плотной питательной среде.

Для изучения свойств колоний микробы культивируют на плотных питательных средах в чашках Петри. При посеве материала стараются получить изолированный рост колоний. Чашки с посевом просматривают сначала невооруженным глазом или через лупу, затем помещают их на столик микроскопа вверх

дном и просматривают колонии в проходящем свете с объективом малого увеличения и с суженной диафрагмой. Колонии характеризуют по величине, форме, контуру края, рельефу, поверхности, цвету, структуре и консистенции.

Величина колонии определяется ее диаметром. В зависимости от диаметра различают колонии точечные (диаметр меньше 1 мм), мелкие (диаметр 1—2 мм), средние (диаметр 2—4 мм) и крупные (диаметр 4—6 мм и более).

Форма колонии бывает правильная — круглая, неправильная — амебовидная, ризоидная — корневидная, напоминающая переплетающиеся корни деревьев.

Характер контура края определяют при рассмотрении колонии под лупой или микроскопом с малым увеличением. Различают ровные края в виде четко выраженной линии и неровные. Последние делят на:

1. фестончатый край, состоящий из крупных, слегка округлых или уплощенных зубцов правильной формы;
2. волнистый край, который несколько отличается от фестончатого тем, что крупные зубцы его выражены нечетко;
3. эрозированный, или зазубренный, край, состоящий из острых зубцов различной величины и формы;
4. бахромчатый край, имеющий нежные ворсинки.

В некоторых случаях четко выраженная линия, отграничивающая колонию от поверхности среды, отсутствует. Такой край колонии называется расплывчатым.

Рельеф (профиль) колонии характеризуется приподнятостью ее над поверхностью питательной среды и контуром формы в вертикальном разрезе. Определяется рельеф колонии невооруженным глазом или с лупой при рассматривании сверху и сбоку.

Различают:

- 1) каплеобразные и куполообразные колонии правильной круглой формы с различно выраженной степенью выпуклости, которые в вертикальном разрезе представляют собой сегмент шара и отличаются только длиной радиуса. Колонии слабовыпуклые имеют большую длину радиуса; куполообразные — меньшую;
- 2) колонии плосковыпуклые с плоским верхом, пологими или круто обрывающимися краями; имеют в вертикальном разрезе форму трапеции;
- 3) колонии конусообразные, имеющие в вертикальном разрезе форму треугольника;
- 4) колонии с приподнятой в виде соска серединой и валиком по периферии;
- 5) колонии с вдавленным центром;
- 6) колонии плоские, стелющиеся по поверхности среды.

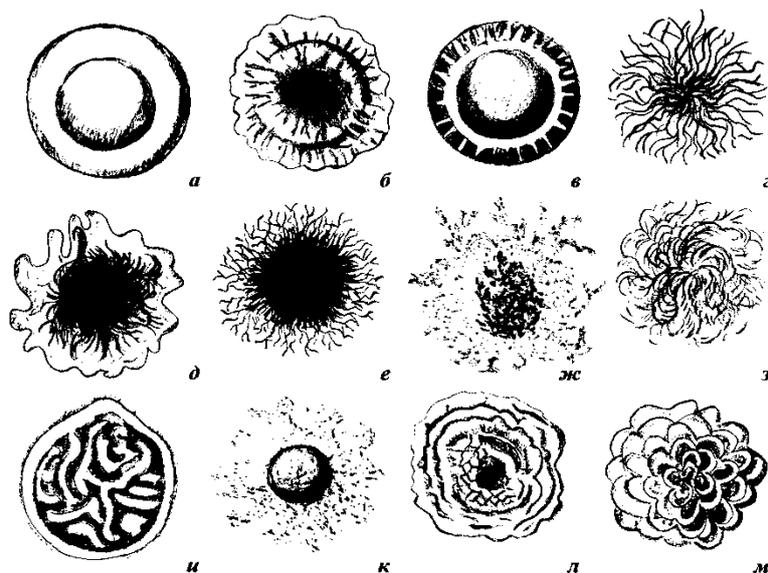


Рисунок 9 - Форма колоний: *а* – круглая; *б* – круглая с фестончатым краем; *в* – круглая с валиком по краю; *г*; *д* – ризоидная; *е* – с ризоидным краем; *ж* – амебовидная; *з* – нитевидная; *и* – складчатая; *к* – неправильная; *л* – концентрическая; *м* – сложная

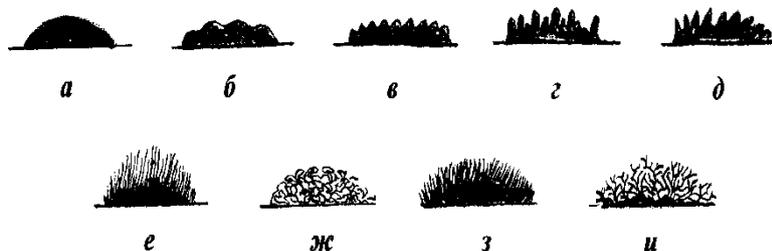


Рисунок 10 - Край колоний: *а* - гладкий; *б* – волнистый; *в* – зубчатый; *г* – лопастный; *д* – неправильный; *е* – реснитчатый; *ж* – нитчатый; *з* – ворсинчатый; *и* - ветвистый

Поверхность колонии изучают с помощью лупы или под микроскопом при малом увеличении. Поверхность колоний бывает матовая или блестящая с глянцем, сухая или влажная, гладкая или шероховатая. Гладкие колонии обозначают буквой S (smooth), шероховатые — буквой R (rough), что означает соответственно “гладкий” и “шероховатый”. Механизм формирования гладких и шероховатых форм колоний обусловлен различием процессов клеточного деления. Микробные клетки в колониях S-форм располагаются, соприкасаясь своими боковыми поверхностями, клетки R-форм, сохраняя при делении цитоплазматические мостики, образуют цепочки, которые, накладываясь, друг на друга, обуславливают шероховатую поверхность и неровный край колонии.

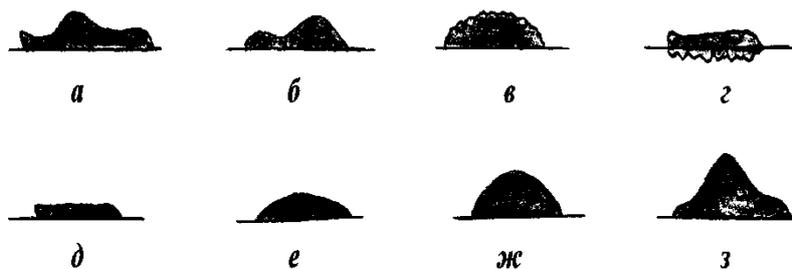


Рисунок 11 - Профиль колоний: *а* – изогнутый; *б* – кратерообразный; *в* – бугристый; *г* – врастающий в агар; *д* – плоский; *е* – выпуклый; *ж* – каплевидный; *з* – конусовидный

Цвет колонии определяется пигментом, который продуцирует культура микробов. Преобладающее большинство патогенных бактерий пигмента не образует, вследствие чего колонии их бесцветны или молочно-мутного цвета, похожи на опал. В проходящем свете такие колонии в большей или меньшей степени прозрачны. Пигментообразующие виды микробов дают колонии различных цветов: кремовые, желтые, золотисто-оранжевые, синие, красные, сиреневые, черные и др.

Структура колоний определяется в проходящем свете при слабом увеличении микроскопа, суженной диафрагме или при несколько опущенном конденсоре. У пигментированных колоний и колоний, не пропускающих света, она не определяется.

По характеру структуры различают следующие виды колоний:

- 1) гиалиновые — бесцветные, прозрачные, без видимой определенной структуры;
- 2) зернистые, которые в зависимости от величины зерен разделяются на мелко- и грубозернистые;
- 3) нитевидные или волокнистые, характеризующиеся наличием длинных, густо переплетающихся нитей в толще колонии.

Колонии бывают однородные и неоднородные. Строение первых одинаково во всех частях, у вторых центральная часть отличается от периферической или отдельные сектора имеют строение, неодинаковое с остальной массой.

Консистенцию колонии, определяющую ее физическое состояние, исследуют посредством прикосновения или взятия из нее части материала бактериальной петлей. По характеру консистенции колонии бывают:

- 1) пастообразные, легко снимающиеся и размывающиеся по поверхности питательной среды наподобие сливочного масла;
- 2) вязкие или слизистые, прилипающие и тянущиеся за петлей;
- 3) волокнистые или кожистые, плотные, снимающиеся с поверхности питательной среды в виде упругой пленки, соответствующей величине и форме колонии;
- 4) хрупкие, сухие, рассыпающиеся при прикосновении петли.

Особенности микробного роста на жидких питательных средах.

На жидких питательных средах характер роста микробов менее разнообразен, чем на плотных питательных средах. Однако и здесь выявлены следующие формы роста бактерий.

1. **Рост бактерий с равномерным помутнением среды**, цвет которой остается неизменным или изменяется в соответствии с цветом водорастворимого пигмента, образующегося в культуре микроба. Такой рост характерен для многих патогенных бактерий, относящихся к группе факультативных анаэробов.

2. **Придонный рост** бактерий характеризуется образованием осадка на дне пробирки с жидкой питательной средой. Осадок может быть скудным или обильным, крошковидным, гомогенным, волокнистым или в виде крупных рыхлых хлопьев, по консистенции вязким, слизистым, хрупким или пастообразным. Питательная среда над осадком может быть прозрачной или мутной. Цвет осадка и среды, находящейся над ним, определяется наличием пигмента, продуцируемого культурой микробов. Если культура пигмента не образует, цвет среды не изменяется, а осадок приобретает, как правило, серовато-белый или желтоватый цвет. Придонный рост специфичен для бактерий с анаэробным типом дыхания.

3. **Пристеночный рост** бактерий выражается в том, что питательная среда, находящаяся в пробирке, остается совершенно прозрачной. Бактерии растут, образуя более или менее крупные рыхлые хлопья или, наоборот, компактные зерна, прикрепленные к внутренней поверхности стенок сосуда, с которых в зависимости от вида бактерий снимаются легко или с трудом.

4. **Поверхностный рост** бактерий характеризуется появлением на поверхности жидкой питательной среды пленки, внешний вид и характер которой могут быть различны:

а) пленка тонкая, нежная, бесцветная, имеет вид едва заметного налета, исчезающего при встряхивании пробирки и взбалтывании среды;

б) пленка влажная, толстая, хорошо видимая простым глазом, вязкой, слизистой консистенции, прилипает к петле и тянется за ней;

в) пленка плотная, сухая, внешним видом напоминает кусочки кожи и при попытке взятия из нее материала снимается целиком в виде круглого диска, соответствующего диаметру пробирки:

г) пленка плотная, сухая, со сморщенной, а иногда бородавчатой поверхностью, краями прикрепленная к стенкам сосуда; при взбалтывании жидкости или прикосновении бактериальной петли разбивается на кусочки, погружающиеся вглубь жидкости.

Цвет пленки, как и питательной среды, зависит от пигмента, вырабатываемого растущей культурой микробов. Рост бактерий в виде поверхностной пленки характерен для микробов-аэрофилов.

Рост на полужидкой питательной среде

Для выявления особенностей микробного роста на полужидкой питательной среде исследуемую культуру засевают в столбик 0,2—0,5% полужидкого агара. Для того чтобы особенности роста проявлялись наиболее четко, прокол среды делают в непосредственной близости к стенке пробирки. Посев, произведенный таким образом, дает возможность выявить подвижные расы микробов и дифференцировать их от неподвижных.

Подвижные микробы в столбике полужидкого агара вызывают выраженное помутнение, распространяющееся более или менее равномерно по всей толщине среды.

Неподвижные формы микробов растут только по ходу прокола среды, напоминая сосульки цилиндрической или конической формы. При этом окружающая среда остается совершенно прозрачной.

Биохимические свойства микробов

По биохимическим признакам бактерий исследуют их отношение к кислороду, ферментативную активность, способность расщеплять различные углеводы, накапливающиеся продукты метаболизма.

Отношение к кислороду воздуха. По отношению к кислороду воздуха микроорганизмы делят на облигатные аэробы, микроаэрофилы, факультативные анаэробы и облигатные анаэробы. Об отношении бактерий к кислороду судят по росту культуры при посеве уколом в столбик с питательным агаром. Аэробы развиваются в верхней части укола, анаэробы – в нижней части, а факультативные анаэробы – равномерно по всему уколу.

Среди биохимических свойств культуры наиболее важно определение их ферментативной активности.

Использование углеводов и спиртов культурами микроорганизмов определяют путем посева 0,1–0,2 см³ суспензии исследуемых клеток в пробирки с жидкой или полужидкой средой, содержащей углеводов и индикатор. Для обнаружения образования газа при расщеплении углеводов в жидкую среду опускают поплавки. Набор сред с углеводами и индикатором называют «цветным» рядом Гисса. Название «цветной» ряд связано с тем, что под действием ферментов клеток одни сахара расщепляются с накоплением кислоты или щелочи, за счет чего изменяется цвет индикатора и среды, другие сахара не расщепляются, и цвет среды не изменяется. Короткий ряд Гисса включает среды с глюкозой, лактозой, сахарозой, мальтозой и маннитом. В длинный ряд дополнительно вводят среды с арабинозой, ксилозой, рамнозой, галактозой и др., полисахариды (инулин, крахмал, декстрин), спирты (глицерин, дульцит, инозит).

Засеянные пробирки помещают в термостат при оптимальной температуре. Результаты учитывают через 2–4 суток (для медленно растущих микроорганизмов через 7–10 суток). Отмечают изменение цвета индикатора или отсутствие изменения цвета среды, а также появление или отсутствие газа в поплавке.



Рисунок 12 - Рост *S. typhi* на средах Гисса



Рисунок 13 - Рост *E. coli* на средах Гисса

На основании полученных данных делают вывод, какие сахара ассимилирует исследуемая культура бактерий.

Протеолитическая активность. Микроорганизмы, обладающие протеолитической активностью, разжижают желатину, пептонизируют молоко. Для определения этого признака культуру исследуемых бактерий засевают уколом в пробирки с желатиной и культивируют в течение 4–10 сут. при комнатной температуре, отмечая при этом скорость разжижения и его характер: послойный, воронкообразный, пузырьчатый и т. п. (рис. 14).



Рисунок 14 - Варианты разжижения желатины

Каталазная активность. Фермент каталазу образуют многие аэробные микроорганизмы. Для проведения исследования каплю 10%-го раствора пероксида водорода наносят на 24-часовую колонию микроорганизма, выросшую на плотной среде в чашке Петри. Выделение кислорода в виде пузырьков газа свидетельствует о наличии в клетках бактерий каталазы.

Характер роста в молоке. Обезжиренное молоко разводят водой в соотношении 4:1, добавляют индикатор бромкрезоловый пурпурный (2 см³ 1,6 %-го спиртового раствора на 1 дм³ молока) или лакмус (10 см³ 4 %-го раствора на 1 дм³ молока), разливают в пробирки по 8–10 см³ и стерилизуют в автоклаве при

0,05 МПа в течение 20 мин. Пробирки с молоком засевают исследуемой культурой бактерий и культивируют 6–14 сут. при оптимальной температуре. Образование микроорганизмами кислот при расщеплении лактозы отмечают по изменению цвета индикатора. Если кислота накапливается в значительном количестве, то образуется сгусток. Бактерии, обладающие активными протеазами, расщепляют казеин, вызывая пептонизацию молока.

Образование индола. Некоторые микроорганизмы обладают способностью расщеплять аминокислоту триптофан с образованием индола, что также является диагностическим признаком при определении вида бактерий. Для определения индола применяют метод Мореля. Пробирки с 8–10 см³ стерильного мясопептонного бульона с добавлением 0,01 % триптофана (или без него) засевают исследуемой культурой бактерий. Под ватной пробкой укрепляют полоску фильтровальной бумаги, пропитанную щавелевой кислотой. Пробирки инкубируют при оптимальной температуре в течение 24 ч. При образовании индола нижняя часть полоски окрашивается в розовый цвет.

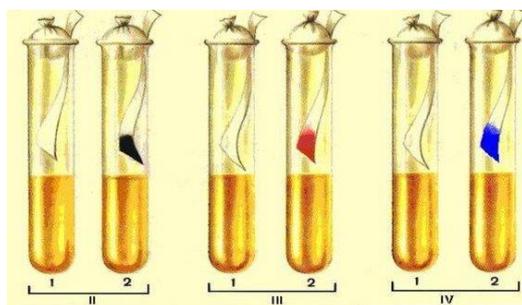


Рисунок 15 - Определение протеолитической активности бактерий
Выявление образования сероводорода (под цифрой II),
образования индола (под цифрой III), образования аммиака (под цифрой IV)
пропитанной соответствующим раствором

Образование аммиака. Аммонификация белковых веществ под влиянием ферментов микроорганизмов сопровождается выделением аммиака. Эту способность бактерий устанавливают путем засева исследуемой культуры в пробирки с мясопептонным бульоном, которые инкубируют в термостате при 37 °С в течение 2–3 сут. Образование аммиака устанавливают по изменению окраски полоски лакмусовой бумажки, укрепленной между пробкой и горлышком пробирки так, чтобы полоска не касалась питательной среды. Выделение аммиака определяется изменением цвета лакмусовой бумажки из красного в синий.

Образование сероводорода. При расщеплении микроорганизмами серосодержащих аминокислот (цистеин, метионин) образуется сероводород. Для определения образования сероводорода пробирки с мясопептонным бульоном засевают исследуемой культурой бактерий и под пробкой укрепляют полоску фильтровальной бумаги, пропитанную раствором ацетата свинца. Засеянные пробирки помещают в термостат при оптимальной температуре на 7–10 сут. Выделение сероводорода фиксируют по почернению полоски вследствие образования сернистого свинца.

Выделение чистой культуры аэробных микроорганизмов

Чистой культурой микробов называют популяцию микроорганизмов, принадлежащих к одному виду, т.е. видимый рост микробных клеток одного вида, выращенных на жидкой или плотной питательной среде.

Культуры микроорганизмов одного вида, выделенные из разных источников или одного источника, называют штаммами. Кроме того, многие виды микробов отличаются друг от друга по способности ферментировать определенные углеводы, по чувствительности к специфическим бактериофагам и др. Их называют типами, или биотипами (биоварами), а по антигенным признакам - сероварами (серотипами).

Культура, полученная в результате размножения одной микробной клетки, извлеченной с помощью манипулятора или другим путем, называется клоном. Такого рода культуры используют главным образом в производственных и научно-исследовательских целях.

Бактерии одного вида, выросшие в результате размножения одной или нескольких клеток в виде изолированного скопления микробной массы, составляют колонию.

Чистые культуры микроорганизмов необходимы для изучения свойств отдельных видов, типов и даже клонов, для определения их родовой, видовой и типовой принадлежности (для идентификации), а также для приготовления лечебных (сывороток, глобулинов), профилактических (вакцин), диагностических (антигены, антитела, аллергены) препаратов, получения в производственных условиях спирта, витаминов, органических кислот (лимонная и др.), ферментов, антибиотиков и других веществ. Таким образом, выделение чистых культур является обязательным этапом любого бактериологического исследования.

Для выделения чистых культур микробов из материалов, содержащих обильную смешанную микрофлору, предложено много различных методов в зависимости от целей использования и свойств изучаемого материала. В большинстве их чистую культуру получают из одной клетки с последующим ее пересевом.

Наиболее часто используется **метод Дригальского** - метод пластинчатого посева. Его еще называют фракционным, т.е. посева осуществляют по частям, фракциям. Берут 4 чашки Петри с МПА (или другой плотной питательной средой, лучше с селективной, с учетом биологических свойств выделяемого возбудителя болезни, брожения, гниения и др.), в первую из них, приподняв крышку, стерильной пастеровской пипеткой вносят каплю жидкости со смесью культур, тщательно растирают посевной материал стерильным шпателем (рис. 26) по всей поверхности питательной среды (шпатель можно приготовить на пламени спиртовки из другой или этой же пастеровской пипетки), затем шпатель с оставшимися на нем микроорганизмами переносят во вторую чашку, снова засевают на поверхности среды микробов и т.д. При наличии двух чашек Петри с МПА дно их делят восковым карандашом пополам на два сектора, при наличии одной - на четыре сектора. Затем чашки переворачивают, заворачивают в ту же бумагу и инкубируют в термостате при 37 °С 1—2 суток. Как правило, в последнем секторе образуются отдельные колонии. Их изучают, отвивают на МПА и МПБ для

идентификации вида. Причем посев производят от колоний, отличающихся друг от друга по культуральным свойствам (цвету, величине, форме и др.), так как каждый вид микробов образует характерные колонии.

Выделение чистой культуры из смеси микробов можно сделать посевом петлей-штрихом. Простерилизованной на пламени горелки и охлажденной петлей берут материал для посева и осторожно, приподняв крышку чашки Петри с МПА, вводят и на поверхности среды распределяют посевной материал смешанных культур параллельными штрихами на расстоянии 0,5 см один от другого от одного края чашки к другому, держа петлю плашмя, но не царапая питательную среду. При избытке посевного материала на петле после первых штрихов ее вводят в среду вертикально для истощения, после чего рассев продолжают. Далее поступают, как описано выше.

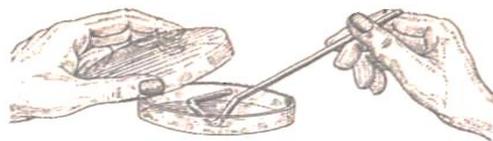


Рисунок 16 - Посев микробиологическим шпателем на МПА в чашках Петри

Метод Коха. Р. Кох в качестве плотной питательной среды использовал МПЖ, сейчас - МПА. Сущность метода: вначале готовят разведения исследуемого материала в расплавленном и остуженном до 43 — 48 °С МПА в пробирках столбиком по 12 — 15 мл, затем содержимое пробирок выливают в стерильные чашки Петри, среду распределяют равномерным слоем, оставляют для застывания, затем чашку переворачивают и заворачивают в бумагу. Через 1 — 2 суток при 37 °С в термостате на поверхности МПА в чашках, где концентрация микробов была наименьшей, вырастают изолированные колонии. Далее поступают, как при использовании фракционного метода исследований. Следует заметить, что в толще МПА аэробы тоже растут до тех пор, пока им хватает растворенного в среде молекулярного кислорода, но затем рост их приостанавливается, поэтому обнаруживают колонии очень мелкие.

Химические методы основаны на применении химических веществ, действующих на одни микроорганизмы бактерицидно, в то время как другие при этом остаются жизнеспособными, после чего производят пересев на селективные или селективные среды. Иногда химические вещества добавляют в питательные среды, что способствует задержке роста (бактериостатическое действие веществ) посторонней микрофлоры.

Метод прогревания. При необходимости выделения споровых форм материал, содержащий споры, прогревают в водяной бане при температуре 80 °С 30 мин для уничтожения истинных бактерий и вегетативных форм бацилл, после чего производят посев на питательные среды.

Биологический метод основан на заражении лабораторных и других животных с целью выделения патогенных культур после падежа: как правило, из паренхиматозных и других органов выделяют чистую культуру, т.е. организм животных служит своеобразным фильтром для болезнетворных микробов.

Выделение чистой культуры анаэробных микроорганизмов

Термин анаэриоз был введен в 1861 г. Л. Пастером, впервые открывшим анаэробный спороносный сахаро-литический микроб *Cl. butyricum*. В микробиологии различают строгие (облигатные) и условные (факультативные) анаэробы. Последние могут размножаться в питательных средах как при доступе кислорода воздуха, так и при его отсутствии. Кислород и необходимую для жизнедеятельности энергию анаэробы получают при разложении сложных органических соединений.

Анаэриоз можно создавать непосредственно в питательных средах или при помощи физических, химических, биологических и комбинированных методов защиты анаэробных посевов от атмосферного воздуха, используя специальные приборы.

Для культивирования анаэробных микроорганизмов используют жидкие и плотные питательные среды. Питательные среды должны быть защищены от свободного доступа атмосферного воздуха и удовлетворять потребности в анаэробном обмене веществ у культивируемых микробов. Из жидких питательных сред в практике ветеринарных лабораторий наиболее широко применяют среду Китта — Тароци. Нередко применяют и другие мясные и казеиновые гидролизатные среды (казеиново-дрожжевую, казеиново-кислотную, мясо-казеиновую, бульон Хоттингера и др.). Жидкие среды наливают в пробирки высоким столбиком, затем на поверхность наслаивают вазелиновое масло. Слой масла толщиной 5 — 8 мм предотвращает доступ атмосферного воздуха. Для редукиции и абсорбции кислорода в питательные среды добавляют редуцирующие и легко окисляемые вещества: кусочки животных тканей (печень, яичный белок, мозг, мышцы, кровь), углеводы (глюкоза, лактоза), аскорбиновую и пировиноградную кислоты, цистеин, муравьинокислый натрий и др. Из плотных сред чаще всего для культивирования анаэробов используется кровяной агар с глюкозой по Цейслеру в чашках Петри, среду Вильсона — Блэра, МПА с глюкозой.

Непосредственно перед посевом патологического материала или микробной культуры жидкие питательные среды (которые могут быть подвергнуты кипячению) кипятят на водяной бане 10—15 мин для удаления воздуха, растворенного в них, и затем быстро охлаждают до + 40 — 45 °С.

В полужидких средах с содержанием 0,25 — 0,75 % агар-агара рост анаэробов достигается благодаря коллоидальному состоянию среды, поэтому особого ограждения анаэробов от атмосферного воздуха в этом случае не требуется.

Техника посева анаэробов на питательные среды в основном аналогична той, которая применяется при работе с аэробными микроорганизмами. Особенностью является то, что при этом требуется большое количество (0,3 — 0,6 мл) патматериала, который вносят пастеровскими пипетками в глубину среды (на жидкие - под слой вазелинового масла). На плотные и полужидкие среды можно производить посев уколom до дна пробирки. На такие среды, как МПА с глюкозой, Вильсона—Блэра, посевы обычно проводят в расплавленную и охлажденную до 45 °С среду, тщательно перемешивая ее с патматериалом. После высева среды выдерживают под струей холодной воды для ускорения застывания.

Посевы в пробирках на специальных жидких и плотных питательных средах можно выращивать в термостате без особых ограждений от атмосферного воздуха. Посевы же в чашки с кровяным агаром необходимо быстро помещать в анаэробные условия, так как строгие анаэробы при доступе кислорода быстро погибают.

Наиболее надежным и простым методом создания анаэробноза являются **физические методы**, основанные на механическом удалении воздуха из плотно закрывающихся сосудов. Для этого пользуются электрическими вакуумными насосами. Ручной насос Комовского создает небольшое разрежение, и, пользуясь им, получать рост строгих анаэробов не представляется возможным.

Для культивирования анаэробов на плотных питательных средах в чашках выпускаются специальные микроанаэростаты (рис.32), которые представляют собой переносные металлические сосуды цилиндрической формы с герметически закрывающейся крышкой, краном для соединения с вакуумным насосом и манометром для контроля разрежения. После заполнения микроанаэростата чашками Петри с посевами из него удаляют воздух (отрицательное давление 0,5 — 0,8 атм.) под контролем манометра, закрывают кран и переносят в обычный термостат.

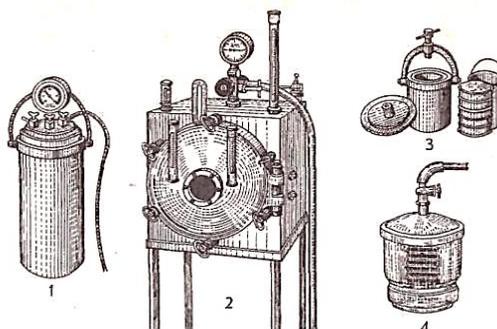


Рисунок 17 - Приборы для создания условий анаэробноза:
1- анаэростат портативный; 2 - анаэростат стационарный;
3 - аппарат Аристовского; 4 - вакуумный эксикатор

Выпускают также стационарные анаэростаты (вакуумные термостаты), которые имеют систему выкачивания воздуха вакуумным насосом, манометр для контроля разрежения, герметически закрывающуюся дверцу и устройство для поддержания заданной температуры. При отсутствии специальных анаэростатов можно использовать стеклянные эксикаторы или другие сосуды с притертой крышкой и краном. Притертые поверхности для обеспечения герметичности смазывают вазелином или специальной замазкой, приготовленной путем смешивания при кипячении равных частей вазелина и воска. Иногда воздух в анаэростатах вытесняют при помощи индифферентного для анаэробов газа - водорода, азота, углекислого газа и др.

Химические методы создания анаэробных условий основаны на поглощении кислорода из замкнутого сосуда (аппарат Аристовского, анаэростат, эксикатор и др.) при помощи реактивов. Для этих целей чаще применяют аппарат Аристовского - металлический цилиндр, диаметр которого соответствует диаметру

чашки Петри. Аппарат герметически закрывается крышкой, внутри располагается ведерко для чашек. Для поглощения кислорода используется смесь гидросульфита натрия с карбонатом натрия. Гидросульфит натрия тонким слоем насыпают в 2 чашки Петри на слой карбоната натрия и увлажняют при помощи пульверизатора. Не закрывая крышками, одну из чашек помещают на дно ведерка, вторую сверху. Между ними располагают чашки с посевами анаэробных микроорганизмов. Прибор герметически закрывают и ставят в термостат. В результате химического взаимодействия гидросульфита натрия с карбонатом натрия происходит связывание кислорода и таким образом в сосуде создаются анаэробные условия. При помощи химического метода возможно получение поверхностного роста отдельных колоний строгих анаэробов.

Биологические методы основаны на раздельном культивировании в одном сосуде анаэробов и аэробов. Например, по методу Фортнера в чашку Петри толстым слоем наливают глюкозо-красный агар и после застывания из середины стерильно вырезают полоску агара шириной 1 — 1,5 см, разделяя таким образом среду на две половины. На одну из них засевают культуру облигатного аэроба (*Bas. subtilis*), на другую - культуру анаэроба или исследуемый материал. Используют и специальные чашки, дно которых разделено стеклянным валиком на две половины. Чашку герметически заклеивают лейкопластырем или заливают парафином и помещают в термостат. В первую очередь развиваются аэробные бактерии. Когда они израсходуют весь кислород, начинают размножаться анаэробы. Если культивирование происходит на жидких питательных средах, то открытые пробирки с посевами аэробов и анаэробов помещают в эксикатор, герметически его закрывают и ставят в термостат. Однако этим методом не удается получать рост строгих анаэробов и в лабораторной практике им пользуются редко.

Комбинированные методы основаны на сочетании физического с химическим или биологическим методами.

Для получения чистой культуры анаэробов используют специальные методы.

Метод Цейсслера сводится к фракционному посеву на чашки с глюкозо-красным агаром. Культивирование производят в анаэробных условиях при температуре 37 — 38 °С. Получив отдельные изолированные колонии микроорганизмов, пересевают их в пробирки с МППБ.

При выделении чистой культуры спорообразующих анаэробов (*Cl. perfringens*, *Cl. tetani*, *Cl. botulinum*) патологический материал вначале прогревают на водяной бане при 60 — 65 °С в течение 30 мин или при 80 °С 10—15 мин, а затем производят посев в МППБ, культивируя в условиях термостата, и в дальнейшем поступают, как по методу Цейсслера.

Метод Виньяля—Вейона. Изолированные колонии строгих анаэробов можно получать по данному методу в МПА с 1%-ным раствором глюкозы. Для этого несколько пробирок со средой расплавляют и охлаждают до 42 — 45 °С, затем засевают их исследуемым материалом в разных разведениях, тщательно перемешивают и после застывания ставят в обычный термостат. Чтобы получить изолированную колонию, пробирки надпиливают и извлекают ее петлей или пипеткой. Лучшей разновидностью является метод Виньяля—Вейона, основанный

на том, что подготовленный, как указано выше, материал, набирают в пастеровские пипетки или трубки Вейона (стеклянные трубки длиной 30 см, диаметром 3 — 6 мм с одного конца вытянуты в капилляр, а на другом конце, закрытом ватной пробкой, имеют перетяжку), капиллярный конец которых после заполнения засеянным агаром запаивают.

Метод Перетца. Для разведения материала запаянную пастеровскую пипетку погружают вначале в этот материал, затем в 3 пробирки с 10 мл физраствора и в 3 пробирки с 20 мл охлажденного до 45 — 50 °С МПА с глюкозой (10 %), к которому добавлено 0,1 мл 8%-ного раствора аскорбиновой кислоты (на 10%-ном карбонате натрия). Содержимое пробирок быстро перемешивают и выливают в 3 чашки Петри под стеклянные пластинки (6х6 см), размещенные перед стерилизацией на стеклянных палочках. Через 12 — 18 ч инкубации в термостате под пластинкой вырастают колонии анаэробов. Их изучают и, сдвинув пластинку стерильным пинцетом, пересевают на другую питательную среду.

Метод заражения лабораторных животных. Животному (преимущественно морским свинкам) подкожно или внутримышечно вводят материал, содержащий анаэробные микроорганизмы. В результате оно погибает от заболевания, вызванного патогенным анаэробом. Путем посева материала из органов и тканей павшего животного выделяют чистую культуру данного микроорганизма.

Принципы идентификации

Основная задача бактериологического диагностического исследования — это определение таксономического положения выделенного микроорганизма путем сравнения его свойств со свойствами известных видов.

В рутинной бактериологической практике микроорганизм идентифицируют, изучая его фенотипические признаки (морфологические, тинкториальные, культуральные, биохимические, патогенные). Стали получать распространение некоторые методы идентификации по генотипическим признакам, которые ранее в основном применяли в научной работе для классификации микроорганизмов с неясным таксономическим положением.

В бактериологии для идентификации используют определители микроорганизмов. Наиболее популярный — определитель бактерий Берджи — включает в себя описание свойств известных видов микроорганизмов. Бактерии в этом руководстве по ограниченному числу морфологических и физиологических признаков объединены в большие группы. В пределах этих групп при помощи нескольких дифференцирующих признаков бактерии подразделены на семейства, роды и виды. Распределение микроорганизмов в этом определителе не отражает иерархической классификации, а преследует сугубо практическую цель — как можно быстрее и экономичнее установить таксономическое положение изучаемого микроорганизма.

Идентификация неизвестного микроорганизма представляет собой процесс последовательного его отождествления с той или иной большой группой микробов, характеризующихся и общими свойствами, затем с семейством в пределах группы, далее с тем или иным родом в пределах установленного семейства, и на

конечном этапе исследуемый микроорганизм отождествляют (идентифицируют) по совокупности морфологических, тинкториальных, культуральных, биохимических, патогенных свойств с каким-либо видом в пределах рода. В случае необходимости внутри вида устанавливают принадлежность культуры к биовару, серовару, фаговару. Работа с определителем Берджи предполагает использование достаточно большого количества тестов, характеризующих различные свойства микроорганизма. В практических диагностических лабораториях, исходя из эпизоотологических, клинических и патологоанатомических данных, обычно проводят бактериологические исследования, заранее ориентированные на обнаружение возбудителя определенной инфекционной болезни, по схеме, предусмотренной официальной инструкцией.

Контрольные вопросы

1. Какие признаки используются при определении вида бактерий?
2. По каким признакам характеризуют колонии бактерий на плотной питательной среде?
3. Как характеризуется рост бактерий в жидкой среде?
4. Как выявляется у бактерий протеолитическая активность?
5. Как определить способность бактерий сбраживать сахара?
6. Какие изменения могут наблюдаться при развитии бактерий в молоке и как их объяснить?
7. По каким признакам устанавливают образование бактериями аммиака, сероводорода, индол
8. Дайте определение понятиям чистая культура, вид, штамм, тип, биовар, серовар.
9. Для каких целей получают чистую культуру микроорганизмов?
10. Какие методы выделения чистых культур вы знаете и какие из них наиболее рациональны с вашей точки зрения и почему (дайте обоснование).
11. Методы выделения чистой культуры анаэробов.
12. Методы создания анаэробных условий при культивировании анаэробных микроорганизмов.
13. Наиболее употребимые среды и принцип их изготовления для культивирования анаэробов.

ТЕМА 3

МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТИВОМИКРОБНЫХ СРЕДСТВ

Цель работы: ознакомить студентов с назначением и основными методами стерилизации, применяемыми в микробиологии.

Материалы и оборудование: автоклав, сушильный шкаф, аппарат Коха, керамические, асбестовые и мембранные фильтры, бактерицидные лампы, пипетки, чашки Петри, шпатели, пробирки, колбы, предметные стекла, пергаментная бумага, вата, марля, петли и иглы бактериологические, шпатели Дригальского, ножницы, пинцеты, штативы, плакаты.

Содержание и методика работы

Стерилизация (от лат. *sterilis* – бесплодный) в микробиологической практике и пищевой промышленности означает уничтожение в материалах всех вегетативных клеток микроорганизмов и их спор.

Физические методы стерилизации

Фламбирование (прокаливание) – стерилизация путем прокалывания мелких предметов в пламени спиртовки или горелки (предметные стекла, бактериологические петли, иглы, пинцеты, ланцеты и т.п.). В пламени обжигают также горлышки колб, пробирок при пересевах культур и розливе питательных сред.

Кипячение применяют для стерилизации металлических инструментов, игл, резиновых трубок. Инструменты кипятят в специальных металлических стерилизаторах с крышками в течение 30–40 мин. Однако даже весьма продолжительное кипячение не обеспечивает полной стерильности объекта, так как споры ряда анаэробных клостридий могут выдерживать кипячение в течение 3 ч.

Стерилизация сухим жаром. Стеклянную посуду (пипетки, пробирки, колбы, чашки Петри др.) выдерживают в сухожаровом шкафу при температуре 160...180⁰С в течение 1,0–1,5 ч. При такой обработке погибают вегетативные клетки и споры микроорганизмов.

Посуду перед стерилизацией моют и высушивают. Пробирки и колбы закрывают ватно-марлевыми пробками. Пробирки заворачивают в бумагу по 10–20 штук. На колбы надевают бумажные колпачки, предохраняющие горлышко от пыли. Пипетки помещают в специальные стеклянные или металлические пеналы или заворачивают в бумагу. При работе пипетки вынимают из пенала только за верхний конец, в который вставлен тампон. Чашки Петри заворачивают в бумагу (каждую отдельно или по 2–3 шт.). Посуду, подготовленную для стерилизации, загружают в сушильный шкаф не слишком плотно, чтобы обеспечить равномерный ее нагрев. По окончании стерилизации шкаф отключают, но не открывают до тех пор, пока температура в нем не снизится до 100...70 ⁰С, чтобы предохранить посуду от растрескивания. Для сохранения стерильности посуду разворачивают непосредственно перед работой.

Стерилизация паром под давлением – один из наиболее распространенных

и эффективных методов, основанный на том, что пар, образующийся при кипячении воды, скапливается в замкнутом пространстве и повышает давление. При увеличении давления повышается температура пара (табл. 1).

Таблица 1 - Соотношение показаний манометра и температуры насыщенного пара

Показания манометра, МПа	Температура насыщенного пара, °С	Показания манометра, МПа	Температура насыщенного пара, °С
0,00	100	0,15	128
0,05	112	0,20	134
0,10	121	0,30	144

Стерилизацию проводят в специальных герметически закрывающихся двухстенных аппаратах – автоклавах. В автоклавах стерилизуют питательные среды, физиологические растворы, резиновые предметы, стеклянную посуду с резиновыми пробками. Режим стерилизации (температура и продолжительность обработки) определяется составом питательной среды, значением рН. Среда, содержащая сахара, молоко, витамины, стерилизуют при давлении 0,05 МПа в течение 15–20 мин, мясopептонные среды – при давлении 0,10 МПа в течение 20–30 мин. Время стерилизации отсчитывают от момента установления необходимого давления.

При низком значении рН некоторые вещества, входящие в состав питательной среды, в процессе стерилизации подвергаются гидролизу. Во избежание этого растворы некоторых компонентов (аминокислоты, витамины) стерилизуют отдельно и добавляют в среду после стерилизации.

Стерилизация текущим паром (дробная стерилизация) – метод, применяемый для обеспложивания питательных сред, изменяющих свой состав при воздействии температур выше 100°С. Сущность дробной стерилизации состоит в том, что нагревание среды проводят при температуре 100°С по 15–30 мин в течение трех дней подряд. После первого прогревания погибают вегетативные клетки, некоторые споры при этом сохраняются и затем прорастают. Образовавшиеся из термоустойчивых спор вегетативные формы погибают при повторном нагревании. Дробную стерилизацию проводят в аппарате Коха или в автоклаве при открытом спускном кране.

Тиндализация – дробная стерилизация материалов, легко разрушающихся при высокой температуре (сыворотки, витамины, некоторые антибиотики). Стерилизацию проводят прогреванием объекта при температуре 60–65 °С в течение 60 мин подряд 5–6 дней.

Стерилизация облучением. Стерилизация ультрафиолетовыми лучами применяется для уничтожения микроорганизмов в воздухе помещений, на поверхности пищевых продуктов, на линиях упаковки. Ее проводят с помощью бактерицидных ламп различной мощности (длина волны 253–265 нм). Ионизирующее излучение применяют для стерилизации некоторых упаковочных материалов, используемых в пищевой промышленности.

Механические методы стерилизации

Фильтрование через бактериальные фильтры. Фильтрование через мелкопористые фильтры применяют в тех случаях, когда повышенная температура может резко изменить качество стерилизуемых материалов. Кроме того, стерилизация фильтрованием используется для очистки бактериальных токсинов и других продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

Существуют два основных типа фильтров: глубинные и мембранные.

Глубинные фильтры состоят из волокнистых материалов. Частицы задерживаются в них в результате адсорбции и механического захвата в материале фильтра. Бактериальные фильтры изготавливаются из разного материала и с разным диаметром пор, что указывается на упаковке. Для стерилизации фильтрованием используют пластинчатые асбестовые фильтры Зейтца, свечи Шамберлана, изготовленные из каолина с примесью кварцевого песка, свечи Беркефельда из инфузорной земли и асбеста.

Мембранные фильтры имеют непрерывную структуру, они состоят из нитроклетчатки, и захват ими частиц определяется размером пор. Мембранные фильтры обозначают номерами от 1 до 5 в зависимости от диаметра пор (350–1200 нм).

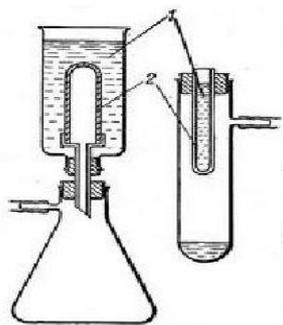


Рисунок 18 - Монтаж свечей Шамберлана (схема):
1 – фильтруемая жидкость; 2 – фильтровальная свеча

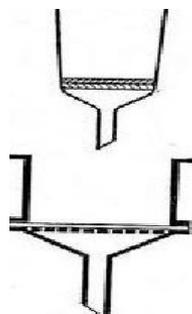


Рисунок 19 - Стеклянные фильтры с пластинками
из мелкопористого стекла (схема)

Стерилизацию фильтрованием осуществляют под вакуумом с использованием вакуумного или водоструйного насоса. Перед началом работы фильтры закрепляют в специальном держателе, который соединяют с колбой Бунзена. Установку для фильтрования стерилизуют в автоклаве в течение 30–40 мин при 0,15 МПа. Мембранные и асбестовые фильтры используют однократно. Свечи Шамберлана и Беркефельда после окончания фильтрования промывают дистиллированной водой, просасывая ее в обратном направлении, и обрабатывают для повторного использования.

Химические средства стерилизации

Уничтожение микроорганизмов при помощи химических веществ называется *дезинфекцией* (от лат. *infektia* – инфекция и франц. отрицательной приставки *des*). Химические вещества применяются для уничтожения патогенных микроорганизмов в объектах внешней среды – на рабочем месте, в помещениях, на рабочей одежде, руках, технологическом оборудовании и инвентаре.

К веществам, используемым с целью дезинфекции, предъявляется целый ряд требований:

- они должны хорошо растворяться в воде;
- в короткие сроки проявлять бактерицидное действие;
- не оказывать токсического действия на человека и животных;
- не вызывать порчу обеззараживаемых предметов.

Дезинфицирующие вещества подразделяют на несколько групп:

1. *Хлорсодержащие соединения (хлорная известь, натрия гипохлорит, хлорамин, пантоцид, хлордезинсульфохлорантин и др.).*
2. *Соединения на основе йода и брома (йодопирин, дибромантин).*
3. *Окислители (пероксид водорода, перманганат калия и др.).*
4. *Фенолы и их производные (фенол, лизол, креолин, гексахлорофен).*
5. *Соли тяжелых металлов (мертиолят натрия, сулема).*

Антимикробным действием обладают также кислоты и их соли (борная, салициловая), щелочи, спирты (70%-й раствор этанола) альдегиды (формальдегид).

Выпускаются также бактерицидные мыла: феноловое, дегтярное, «Гигиена», содержащее 3–5 % гексахлорофена.

Общая характеристика противомикробных средств

Значительное количество заболеваний человека вызывают бактерии, вирусы, грибы, спирохеты, а также некоторые гельминты. Вещества, которые обезвреживают возбудителей в окружающей среде или в организме человека, называются противомикробными средствами.

Фармакологический эффект веществ этой группы – бактериостатический (способность прекращать рост и размножение микроорганизмов) или бактерицидный (свойство обезвреживать микроорганизмы).

Противомикробные средства делят на две группы:

I. Антисептические и дезинфицирующие средства

Препараты, не проявляют выборочной противомикробного действия и имеют значительную токсичность для человека.

Антисептические средства способны привести к гибели или прекратить рост и развитие микроорганизмов на поверхности тела человека (коже или слизистых оболочках).

Дезинфекционные средства обезвреживают патогенные микроорганизмы в окружающей среде, их применяют для обработки помещений, белья, посуды, медицинских инструментов, аппаратуры, предметов ухода за больными.

Классификация антисептических и дезинфицирующих средств

I. Антисептические и дезинфицирующие средства неорганической природы

1. Галогены (галоиды)

1.1. Препараты, содержащие хлор, - хлорная известь, хлорамин Б, хлоргексидин биглюконат, хлорантоин, натрия гипохлорид

1.2. Препараты, содержащие йод - раствор йода спиртовой, йодонатом, йодоформ (трийодметан), раствор Люголя, йод-дицерин, йодиол, повидон-йод (бетадин)

2. Окислители - раствор перекиси водорода (водорода пероксида) разведен и концентрированный, калия перманганат, бензоилпе-гидроксид (окси 5, 10)

3. Кислоты и основания - кислота борная, бензойная кислота, раствор аммиака, натрия тетраборат (бура)

4. Соли тяжелых металлов - ртути дихлорид (сулема), серебра нитрат, колларгол, протаргол, цинка сульфат, дерматол, ксероформ

II. Антисептические и дезинфицирующие средства органического происхождения

1. Фенолы - фенол чистый (кислота карболовая), деготь березовый, резорцин, Трикрезол, поликрезулен (ваготил)

2. Дегте и смолы - ихтиол (ихтаммол), винизоль

3. Красители - бриллиантовый зеленый, метиленовый синий, этакридину лактат (риванол)

4. Производные нитрофурана - фурацилин (Нитрофурал), фуропласт, фурагин (фуразидин)

5. Альдегиды и спирты - спирт этиловый, формальдегид (формалин), Лизоформ

6. Детергенты - мыло зеленое, Церигель, этоний, декаметоксин (септефрил), мирамистин.

II. Химиотерапевтические препараты

Препараты, которые оказывают выборочную противомикробное действие, проявляют значительный спектр терапевтического действия. их применяют для лечения и профилактики инфекционных заболеваний.

Для контроля стерилизаций существуют биологические и химические индикаторы. Изменению окраски индикатора указывает на то, полностью ли прошел цикл стерилизации.

Контрольные вопросы

1. Какие методы стерилизации Вы знаете?
2. Как подготовить лабораторную посуду для стерилизации?
3. Какие факторы определяют режим стерилизации?
4. В каких случаях используют химические методы стерилизации?
5. Какие требования предъявляют к дезинфицирующим веществам?
6. Какие вещества используют для дезинфекции?
7. На какие группы делят противомикробные средства?
8. Перечислите классификацию антисептических и дезинфицирующих средств?

За единицу действия других антибиотиков принимаются минимальные количества микрограммов каждого из них, подавляющие рост соответствующего тест-микроба в 1 мл питательной среды.

Антибиотики широко применяются при лечении многих инфекционных заболеваний животных и человека. Одним из основных элементов рационального их применения в ветеринарии при инфекционных болезнях животных является определение чувствительности выделенного возбудителя к этим препаратам. Это необходимо для того, чтобы рекомендовать наиболее эффективный из предлагаемых при данном заболевании.

Установлено, что большинство антибиотиков в 1 мг вещества содержат 1000 ЕД. Единица биологической активности у разных антибиотиков неодинакова: 1 ЕД пенициллина эквивалентна 0,6 мкг, стрептомицина - 1 мкг, неомицина - 0,3 мкг чистого вещества.

Весовое количество антибиотика, эквивалентное 1 ЕД, называют международной единицей (МЕ) действия.

Чувствительность микроба (возбудителя болезни) к антибиотикам выражается задержкой его роста или гибелью от минимальной концентрации препарата (мкг, ЕД/мл) в течение 16 — 18 ч.

Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам

Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам определяют следующими методами:

1. Методом серийных разведений в жидкой или плотной питательной среде.
2. Методом диффузии с применением дисков, содержащих антибиотики.

Методом серийных разведений определяют концентрацию антибиотика в 1 мл питательной среды, подавляющую рост выделенного возбудителя или тест-микроба.

Вначале готовят основное разведение антибиотика (пенициллина) с таким расчетом, чтобы в 1 мл МПБ было 16 ЕД/мл. 2 мл такого МПБ вносят в первую пробирку, содержащую 2 мл, т.е. в 1 мл МПБ будет 8 ЕД/мл, затем 2 мл такого МПБ вносят во вторую пробирку, где получают 4 ЕД/мл в 1 мл, и так делают последовательные разведения антибиотика, получая ряд пробирок с убывающей его концентрацией. Затем в каждую пробирку вносят по 0,2 мл 1 млн. взвеси микробов, концентрация которых в рабочих пробирках будет составлять 100 тыс. микробных клеток в 1 мл среды. Пробирки ставят в термостат при 37 °С на 16— 18 ч. При учете результатов отмечают пробирку, в которой отсутствует рост (МПБ остается прозрачным), — концентрация антибиотика в этой пробирке будет бактериостатической.



Рисунок 20 - Определение чувствительности к антибиотикам методом серийных разведений

Бактериостатической концентрацией антибиотика называют наименьшую его концентрацию, при которой наблюдается угнетение роста и размножения бактерий.

Для определения бактерицидной активности антибиотика из пробирок с отсутствием видимого роста делают посев в пробирки с МПА. Если после инкубирования в термостате в них не появится рост, это значит, что проявилось бактерицидное действие антибиотика.

Чувствительность микроба к антибиотику выражают средней арифметической из концентрации антибиотика в двух смежных пробирках — последней, с прозрачной средой и первой — с помутневшей.

Метод диффузии в агар с применением дисков. Для получения сплошного роста производят посев 1 — 2 мл микробной взвеси, содержащей по оптическому стандарту 500 млн. микробных тел в 1 мл. Осторожным покачиванием чашки взвесь распределяют равномерным слоем по всей ее поверхности, после чего избыток жидкости отсасывают пастеровской пипеткой и сливают в банку с дезраствором, а чашку с засеянной средой подсушивают в термостате.

На поверхность чашек с подсушенной и засеянной питательной средой стерильным остроконечным пинцетом накладывают диски, пропитанные антибиотиками. Последние представляют собой кружки фильтровальной бумаги диаметром 10 мм, пропитанные различными антибиотиками и высушенные под вакуумом. Диски накладывают по одному на поверхность засеянной питательной среды и, не сдвигая с места, слегка прижимают браншами пинцета, чтобы они всей поверхностью плотно прилегали к поверхности агара. Диски должны находиться на равном расстоянии друг от друга и на расстоянии 2,5 мм от центра чашки. Каждая чашка может быть использована для испытания штамма по отношению к 4 — 5 антибиотикам.

Для большей достоверности получаемых результатов испытание с каждой культурой следует производить параллельно на двух чашках.

Антибиотическое вещество, диффундируя в агар, формирует вокруг диска зону угнетения роста бактерий. Процесс диффузии антибиотика диска в агар заканчивается через 3 — 4 ч после нанесения диска. Наибольшая концентрация

антибиотика находится в центре - в месте расположения диска, по направлению к периферии содержание его снижается.

Засеянные чашки с нанесенными на них дисками оставляют при комнатной температуре на 30—60 мин, а затем помещают в термостат на 16—18 ч при 37 °С вверх дном, чтобы избежать попадания конденсационной воды на поверхность посева.

Бактерии, чувствительные к антибиотику, при испытании образуют вокруг соответствующего диска зоны угнетения роста, четко выделяющиеся на фоне сплошного микробного роста. Величина зон угнетения роста определяет степень чувствительности микроба к антибиотикам. Измерение зоны угнетения производят с помощью циркуля или миллиметровой линейки. Измеряемый диаметр зоны должен проходить через центр диска. Иногда зона угнетения имеет овальную форму. В таких случаях измеряют наибольший и наименьший ее диаметры и вычисляют среднюю величину, которая и принимается за показатель.

Между степенью чувствительности микроба к антибиотику и размером диаметра зоны угнетения имеются следующие соотношения:

Степень чувствительности микроба к антибиотику	Размер зоны угнетения
Высокочувствительные	Больше 26 мм
Чувствительные	15 — 25 мм
Малочувствительные	11 — 14 мм
Устойчивые	10 мм



Рисунок 21 - Определение чувствительности бактерий к антибиотикам методом «бумажных дисков»

Чтобы эти соотношения были стандартными при испытании микроба с различными антибиотиками, концентрации последних при пропитывании дисков подбирают таким образом, чтобы они с одинаково чувствительными микробами давали примерно одинаковые диаметры зон угнетения.

Бактериофаги - группа вирусов, паразитирующих на бактериях. Бактериофаги в зависимости от типа вызываемой инфекции делятся на вирулентные

и умеренные. Вирулентные бактериофаги дают литическую продуктивную инфекцию, в результате чего образуется новая генерация фага. Литический цикл состоит из фаз адсорбции на рецепторах клеточной стенки, инфицирования клетки нуклеиновой кислотой или цельным фагом, репликации нуклеиновой кислоты и синтеза белка головки и отростка, сборки фаговых частиц и выхода фага с лизисом бактерии-хозяина.

На жидких средах лизис проявляется в просветлении бактериальной суспензии, на плотных - в формировании участков

отсутствия роста, которые называют "стерильными" пятнами, бляшками или негативными колониями. Размеры и формы этих образований имеют дифференциально-диагностическое значение.

Бактериофаги обладают специфичностью действия. Литический спектр их может охватывать все особи того или иного вида. Такие фаги называют универсальными, или поливалентными, их применяют при идентификации соответствующих бактерий, а также фаготерапии и фагопрофилактике. Типовые фаги способны лизировать лишь группу особей того или иного вида (фаговар), на чем основано типирование бактерий.

В качестве индикаторного признака, определяющего видовую принадлежность микроба и его фаготипаж, служит феномен лизиса данной культуры на плотной питательной среде при совместном культивировании ее с заведомо определенным специфическим бактериофагом.

Техника выявления бактериофага на плотной среде

Бульонную культуру высевают на агар в чашках Петри: одну каплю культуры растирают стеклянным шпателем по всей поверхности агара, чашки помещают в термостат при 37 °С на 3 — 4 ч. Затем в чашку с подрощенной культурой вносят одну каплю бактериофага и вновь помещают в термостат на сутки. По истечении этого времени в контрольной чашке без фага отмечается сплошной рост бактерий по всей поверхности среды, в чашке с добавленным фагом наблюдается задержка роста бактерий в местах нанесения фага. Можно использовать метод "стекающей дорожки".

Техника фаготипирования микробов

В основу фаготипирования положен принцип совместного выращивания типлируемой культуры с типовым бактериофагом. Наступление лизиса является индикаторным признаком, определяющим типовую принадлежность бактерий.

Для фаготипирования бактерий рекомендуется применять хорошо подсушенный 1,5%-ный МПА с 5% глицерина. Суточную агаровую культуру испытуемого штамма отсевают на бульон и помещают в термостат при 37 °С. С появлением хорошо заметного роста культуру набирают в пастеровскую пипетку с тонко оттянутым капилляром и наносят небольшими каплями на поверхность хорошо подсушенной питательной среды. На поверхности агара перед нанесением культуры намечают кружки диаметром 5 — 8 мм. На одной чашке можно

нанести 32 — 34 таких кружка. На кружок наносится капля исследуемой культуры, избыток которой стекает в бороздку вокруг капли. После подсыхания капля наносят соответствующие типовые фаги. Учет результатов фаготипирования может быть проведен предварительно через 6 — 8 ч инкубации чашек, окончательный — через 20 — 24 ч.

Типовые фаги употребляются для типирования в критическом тест-разведении, так как концентрированный фаг может дать неспецифический лизис бактериальных культур. За критическое тест-разведение фага принимается максимальное десятикратное разведение его, еще дающее сливной лизис индикаторной культуры. Обычно в критическом тест-разведении фаги содержат в 1 мл около 10 частиц.

Можно проводить фаготипирование в чашках с агаром, на поверхности которого выращена исследуемая культура. Чашка делится на участки по числу типовых фагов, на которые наносятся капли типовых фагов пастеровской пипеткой или петлей диаметром около 4 мм.

Учет фаготипирования производят как в проходящем, так и в падающем свете. Интенсивность лизиса отмечают с помощью четырехкратной системы.

++++ — характеризуют полный лизис культуры. В месте нанесения капли бактериофага образуется пятно, совершенно прозрачное в проходящем свете с резко очерченным краем и абсолютно гладкой поверхностью агара.

+++ — неполный лизис. В месте нанесения капли образуется прозрачное в проходящем свете пятно с четкими краями и матовой слегка шероховатой поверхностью.

++ — слабо выраженный лизис, характеризуется значительным просветлением культуры в месте нанесения капли, контуры края слабо очерчены.

+ — намечающийся лизис, незначительное просветление культуры в месте нанесения капли бактериофага, контуры зоны просветления расплывчатые.

Положительной реакцией, определяющей фаготип, являются +++++ и +++.

Отсутствие лизиса культуры с любым из примененных бактериофагов указывает на то, что в имеющемся наборе для типирования культуры нет соответствующего фага.

Контрольные вопросы

1. Что собой представляют антибиотики?
2. Классификация антибиотиков по происхождению.
3. Действие антибиотиков на бактериальную клетку.
4. Чем характеризуется бактериостатическое и бактерицидное воздействие антибиотиков на бактериальную клетку?
5. Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам.
6. Единицы измерения активности антибиотиков.
7. Что собой представляют бактериофаги?
8. Практическое использование бактериофагов.
9. Техника определения чувствительности (фаготипирование) бактериофагов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Микробиология [Электронный ресурс]: учеб. пособие / Н.С. Величкович, О.В. Козлова, Е.Ю. Агаркова, Д.Н. Калугина. 2-е изд., перераб. и доп. Кемерово: КемГУ, 2023. 199 с. // Лань: электронно-библиотечная система. — Режим доступа: URL: <https://e.lanbook.com/book/409484>
2. Микробиология [Электронный ресурс]: учеб. пособие для вузов / Р.Г. Госманов, А.К. Галиуллин, А.Х. Волков, А.И. Ибрагимова. 4-е изд., стер. СПб.: Лань, 2021. 496 с. // Лань: электронно-библиотечная система. — Режим доступа: URL: <https://e.lanbook.com/book/171851>
3. Кисленко В.Н. Ветеринарная микробиология и иммунология: практикум. СПб.: Лань, 2012. 368 с.
4. Петрищева Т.Ю. Практикум по общей микробиологии [Электронный ресурс]: учеб. пособие. Елец: ЕГУ им. И.А. Бунина, 2022. 89 с. // Лань: электронно-библиотечная система. — Режим доступа: URL: <https://e.lanbook.com/book/331916>
5. Ромейко Л.В. Общая микробиология и микробиология: лабораторный практикум [Электронный ресурс]: учеб. пособие. Петропавловск-Камчатский: КамчатГТУ, 2022. 173 с. // Лань: электронно-библиотечная система. — Режим доступа: URL: <https://e.lanbook.com/book/314003>
6. Сахарова О.В., Сахарова Т.Г. Общая микробиология и общая санитарная микробиология [Электронный ресурс]. 3-е изд., стер. СПб.: Лань, 2023. 224 с. // Лань: электронно-библиотечная система. — Режим доступа: URL: <https://e.lanbook.com/book/346448>
7. Шапиро Я.С. Микробиология [Электронный ресурс]. 6-е изд., стер. СПб.: Лань, 2024. 308 с. // Лань: электронно-библиотечная система. — Режим доступа: URL: <https://e.lanbook.com/book/386048>

Учебное издание

Рябичева Ангелина Евгеньевна
Андрюшина Надежда Сигизмундовна

ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

учебно-методическое пособие
для проведения лабораторных занятий по дисциплине «Микробиология»
студентами, обучающимися по направления 36.03.02 «Зоотехния»

Редактор Лебедева Е.М.

Подписано к печати 09.12.2024 г. Формат 60x84. 1/16.
Бумага офсетная. Усл. п. 2,49. Тираж 25 экз. Изд. № 7776.

Издательство Брянского государственного аграрного университета
243365, Брянская обл., Выгоничский район, с. Кокино, Брянский ГАУ