

Микробиология, вирусология

Руководство к практическим занятиям

Учебное пособие

**Под редакцией акад. РАН В.В. Зверева
и проф. М.Н. Бойченко**

Министерство образования и науки РФ

Рекомендовано ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия
последипломного образования» Министерства здравоохранения
Российской Федерации в качестве учебного пособия к использованию в
образовательных учреждениях, реализующих образовательные программы
высшего профессионального образования для студентов, обучающихся по
специальности 060101 «Лечебное дело»

Регистрационный номер рецензии 052 от 21 февраля 2015 года
ФГАУ «Федеральный институт развития образования»



Москва
ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА
«ГЭОТАР-Медиа»
2017

Модуль 3

ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Цели модуля

- **Знать:** основные условия культивирования бактерий.
- **Уметь:** выделять чистую культуру бактерий.
- **Владеть:** методами посева на плотные и жидкие питательные среды.

3.1. УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ

Культивирование микроорганизмов проводят с различными целями: для выделения и изучения свойств возбудителя при диагностике инфекционных заболеваний, накопления биомассы при приготовлении вакцин и диагностикумов и др. Культивирование бактерий возможно лишь при создании определенных условий для их жизнедеятельности. Для этого необходимо соблюдать ряд **условий**.

- Наличие полноценной *питательной среды*.
- **Температуру культивирования**, которая влияет на скорость размножения. По отношению к температуре роста бактерии разделяют на три основные группы — психрофилы, мезофилы и термофилы.
 - *Психрофилы* живут и размножаются при пониженных температурах (от -10 до 20°C).
 - *Мезофилы* включают бактерии, температурный диапазон роста которых находится между 10 и 45°C . Оптимальная температура для их культивирования — $25-37^{\circ}\text{C}$.
 - *Термофилы* способны расти при повышенных температурах ($42-50^{\circ}\text{C}$).

Для поддержания требуемой температуры используют специальные приборы — термостаты.

- **Атмосферу культивирования.**

- Для роста и размножения *строгих аэробов* необходим кислород. Аэробы хорошо растут на поверхности агара на чашках Петри или в тонком верхнем слое жидкой среды. *Факультативные анаэробы* культивируют в аналогичных условиях.
- *Микроаэрофилы*, нуждающиеся в пониженной концентрации кислорода, культивируют в атмосфере 5% CO₂ в специальных CO₂-инкубаторах либо посеvy помещают в эксикаторы, в которых устанавливают горящую свечу.
- *Облигатные анаэробы* для своего роста и размножения требуют исключения доступа кислорода воздуха.

- **Время культивирования** зависит от времени генерации. Большинство бактерий культивируют для получения видимого роста в течение 18–48 ч. Для ряда бактерий требуются более длительные сроки культивирования.

- **Освещение.** Для выращивания фототрофных микроорганизмов необходим свет. Некоторые условно-патогенные микобактерии в зависимости от освещенности образуют пигмент, что используют при их идентификации.

- **Условия, исключающие попадание других видов бактерий:** использование стерильной посуды и стерильных питательных сред.

3.2. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

3.2.1. Основные требования, предъявляемые к питательным средам

- Каждая питательная среда должна содержать воду, так как все процессы жизнедеятельности бактерий протекают в воде.
- Для культивирования гетероорганотрофных бактерий в среде должен содержаться органический источник углерода и энергии (углеводы, аминокислоты, органические кислоты, липиды).
- Для биосинтетических процессов бактериям требуются источники азота, серы, фосфаты, микроэлементы. Источником азота служит пептон — продукт неполного гидролиза белков, который также предоставляет аминокислоты для построения бактериальных белков; минеральные вещества бактерии способны утилизировать в виде неорганических солей.
- Поддержание определенного pH имеет значение для предотвращения гибели микроорганизмов от ими же образованных продуктов обмена.

- Среда должна обладать определенным осмотическим давлением. Большинство бактерий способно расти на изотоничных средах, изотоничность которых достигают добавлением раствора натрия хлорида в концентрации 0,87%.
- Питательные среды должны быть стерильными.

3.2.2. Классификация питательных сред

В зависимости от **консистенции** питательные среды могут быть:

- жидкими;
- полужидкими;
- плотными.

Плотность среды достигается добавлением агара. **Агар** — полисахарид, получаемый из водорослей. Он

плавится при температуре 100 °С, но при охлаждении остывает при температуре 42–50 °С. Агар добавляют в концентрации 0,5% для полужидких сред и 1,5–2% для создания плотных сред.

Для посева крови (выделения гемокультуры) используют **двухфазные среды** (рис 3.1). Они состоят из слоя агара, покрывающего одну сторону флакона, и налитого в этот флакон обогащенного ростовыми факторами бульона.

Расплавленный агар разливают в чашки Петри по 10–15 мл, в пробирки — по 7–10 мл. Налитый в пробирки агар можно скосить для получения **скошенного агара**. Для этого после разлива агара пробирки кладут на наклонную поверхность до полного застывания агара (рис. 3.2).

По происхождению различают:

- **естественные среды** — готовят из овощей (картофеля), яиц, молока, сыворотки крови;
- **искусственные среды** — включают переработанные естественные продукты:



Рис. 3.1. Двухфазная среда

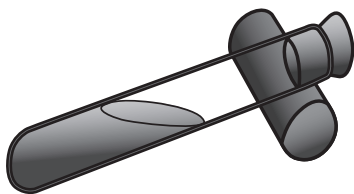


Рис. 3.2. Скошенный агар

мясную воду, печеночный перевар, мозговой экстракт; вещества, полученные из этих продуктов (пептон, дрожжевой экстракт);

- **синтетические среды** — создают из химических соединений с точным химическим составом.

В зависимости от **состава** и **цели** применения различают:

- **основные среды**;
- **специальные среды**, которые в зависимости от состава и цели применения разделяют на:
 - сложные;
 - элективные;
 - дифференциально-диагностические;
 - комбинированные.

К **основным** (простым, универсальным) **средам** относят пептонную воду, питательный бульон, мясопептонный агар. На основе этих простых сред готовят **сложные среды**, например сахарный и сывороточный бульоны, кровяной агар.

В зависимости от **назначения** специальные среды подразделяют на элективные, обогащения, дифференциально-диагностические.

- Под **элективными** понимают **среды**, на которых лучше растет какой-то определенный микроорганизм. Например, щелочной агар, имеющий $\text{pH}=9,0$, служит для выделения холерного вибриона. Другие бактерии, в частности кишечная палочка, из-за высокого pH на этой среде не растут.
- **Среды обогащения** стимулируют рост какого-то определенного микроорганизма, ингибируя рост других. Например, среда, содержащая селенит натрия, стимулирует рост бактерий рода *Salmonella*, ингибируя рост кишечной палочки.
- **Дифференциально-диагностические среды** служат для изучения ферментативной активности бактерий. Они состоят из простой питательной среды с добавлением субстрата, на который должен подействовать фермент, и индикатора, меняющего свой цвет в результате ферментативного превращения субстрата.

Комбинированные питательные среды сочетают в себе элективную среду, подавляющую рост сопутствующей микрофлоры, и дифференциальную среду, диагностирующую ферментативную активность выделяемого микроорганизма. Примером таких сред служат среда Плоскирева и висмут-сульфитный агар, используемые при выделении патогенных кишечных бактерий. Обе эти среды ингибируют рост кишечной палочки.

Прописи некоторых основных питательных сред приведены в приложении.

3.3. МЕТОДЫ ПОСЕВОВ НА ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Инструменты для осуществления посевов: бактериологическая петля, шпатель, специальный ватный тампон (рис. 3.3).

Техника посева по Дригальскому. Посев осуществляют стерильным шпателем на три чашки Петри с плотной питательной средой. На середину первой чашки пипеткой или бактериологической петлей вносят исследуемый материал, который распределяют по поверхности чашки круговыми движениями, вращая приоткрытую чашку левой рукой. Не стерилизуя, шпатель переносят во вторую, а затем в третью чашку, проводя распределение истощенного материала по их поверхности (рис. 3.4).

Метод Коха (количественный метод). Готовят 10-кратные разведения исследуемого материала в стерильном физиологическом растворе. Отбирают по 1 мл из каждого разведения, которые вносят в пробирки с

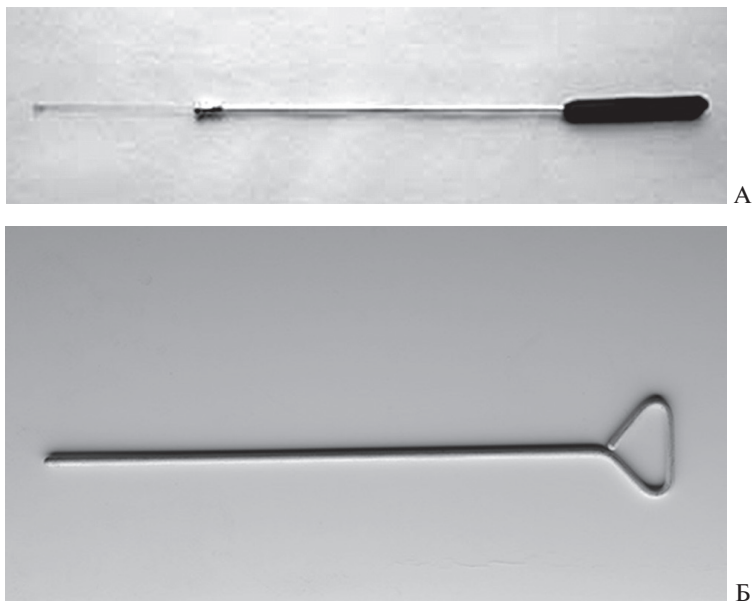


Рис. 3.3. Инструменты для осуществления посевов: А — бактериологическая петля; Б — шпатель

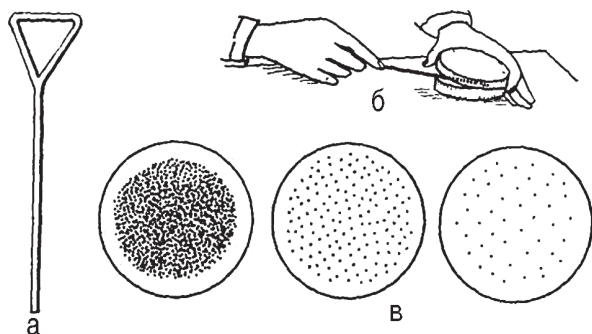


Рис. 3.4. Метод посева по Дригальскому: а — шпатель Дригальского; б — рас-
сев; в — рост микроорганизмов после посева

расплавленным и охлажденным до 45°C агаром. После перемешивания содержимое пробирки выливают в стерильную чашку Петри.

Техника посева петлей секторами. Чашку Петри делят на 4–5 радиальных секторов. Взяв материал стерильной петлей, делают посев одной петлей на всех секторах.

Техника посева петлей по Голду (см. в разделе 3.5).

Техника посева тампоном. Проводят тампоном по диагонали дорожку, затем петлей через дорожку делают засев по обе стороны от нее. Другой способ: тампон вносят к краю агара и круговыми движениями втирают материал с тампона.

Пересев колонии с чашки Петри в пробирку со скошенным агаром. Приподнимают крышку чашки Петри. Стерильной петлей отбирают колонию. Чашку закрывают. В левую руку берут пробирку со скошенным агаром, над пламенем открывают правой рукой пробку, прижимая ее мизинцем к ладони, вводят петлю в пробирку до дна в конденсационную воду, прикасаются к поверхности агара и делают посев штрихом по скошенной части агара. Край пробирки обжигают, закрывают пробкой над пламенем горелки.

Посев по методу Щукевича (для выделения подвижных бактерий). Петлю с отобранным материалом вносят в пробирку со скошенным агаром, не касаясь стекла и агара, в конденсационную воду, не распределяя материал по скосу агара. Пробирки помещают в термостат в вертикальном положении. Подвижные бактерии будут распространяться вверх по влажной поверхности скоса агара.

Посев в столбик полужидкого агара. Стерильной петлей забирают колонию, в левую руку берут пробирку со столбиком среды, над пламенем

горелки открывают мизинцем правой руки пробку и производят укол петлей в среду с поверхности до дна пробирки. Пробирку закрывают пробкой над пламенем горелки.

Посев в жидкую среду. Петлю с инокулятом бактериальной культуры слегка погружают в жидкость и растирают посевной материал по стенке пробирки, после чего смывают его средой. Петлю извлекают, пробирку закрывают, проведя через огонь пробку, петлю прокаливают.

Выполненные посевы помещают в термостат с необходимой для культивирования температурой.

3.4. ФЕРМЕНТЫ БАКТЕРИЙ. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СРЕДЫ

Ферментативную активность бактерий изучают для идентификации выделенной чистой культуры бактерий, в частности, для установления возбудителя инфекционного заболевания, до рода и вида. Для этих целей используют различные дифференциально-диагностические среды, наиболее часто употребляемые из которых указаны в таблице 3.1 и на рисунках 3.5—3.12.

Таблица 3.1. Дифференциально-диагностические среды, используемые для идентификации бактерий

Среда	Цель применения	Механизм действия	Внешний вид положительного результата
Цитратный агар Симмонса	Определяют способность бактерий утилизировать цитрат в качестве единственного источника углерода	Исходный цвет среды — зеленый. Если бактерии утилизируют цитрат, они растут на этой среде, защелачивая ее	Рост бактерий на среде, окрашивание ее в синий цвет (см. рис. 3.5)
Среда Клиглера	Определяют способность бактерий ферментировать глюкозу, лактозу и продуцировать сероводород	Содержит глюкозу (0,1%), лактозу (1%), индикатор фенолрот, сульфат железа, тиосульфат натрия. Сероводород образуется из тиосульфата натрия под действием бактериального фермента	Ферментация глюкозы — желтый столбик. Ферментация лактозы — желтый скок. Образование сероводорода — почернение среды (см. рис. 3.6). При образовании сероводорода индикаторная бумажка чернеет

Продолжение табл. 3.1

Среда	Цель применения	Механизм действия	Внешний вид положительного результата
		тиосульфатредуктазы. Образованный сероводород взаимодействует с сульфидом железа, образуя сульфид железа черного цвета. Вследствие малого количества глюкозы при неспособности бактерий ферментировать лактозу глюкоза быстро расходуется в скошенной части среды, и на ней начинается утилизироваться пептон, в результате защелачивается среда, окрашиваясь в розовый цвет. Продукцию сероводорода можно определить с помощью индикаторной бумажки, пропитанной ацетатом свинца	
Проба на индол	Определяют способность бактерий продуцировать индол	Под влиянием бактериального фермента триптофаназы, присутствующего в среде, триптофан распадается на индол, аммиак и пировиноградную кислоту. Индол образует с реактивом диметиламинобензальдегидом соединение красного цвета. Индолообразование можно определить также с помощью индикаторной бумажки, пропитанной шавелевой кислотой, укрепленной под пробкой пробирки с питательным бульоном (проба Мореля)	Добавление к среде диметиламинобензальдегида (реактива Ковача) вызывает образование кольца красного цвета (см. рис. 3.7). В случае индолообразования индикаторная бумажка краснеет

Продолжение табл. 3.1

Среда	Цель применения	Механизм действия	Внешний вид положительного результата
Среда с мочевиной	Определяют способность бактерий продуцировать уреазу	Продуцируемая бактериями уреазы расщепляет мочевины (диаминокетон) на аммоний и углекислый газ. Аммоний защелачивает среду, изменяя цвет индикатора фенолрота	Среда приобретает розовый цвет (см. рис. 3.8)
Среда Кларка	Глюкозо-фосфатный бульон, используемый для определения у микроорганизмов отношения к реакциям метилрота и Фогеса—Проскауэра	Среда содержит пептон, глюкозу и гидрофосфат калия. При сильном закислении среды в результате ферментации глюкозы муравьинокислым брожением появляется красная окраска. Если в результате ферментации глюкозы образуется ацетонин (ацетилметилкарбинол), то добавление альфа-нафтола в щелочной среде приводит к образованию бордовой окраски	Реакцию ставят в парных пробирках, по окончании роста бактерий в одну из них закапывают индикатор метилрот, а в другую — КОН и альфа-нафтол. Образование красной окраски с индикатором метилротом свидетельствует о положительной реакции метилрота (см.рис. 3.9). Появление бордового цвета после добавления КОН и альфа-нафтола свидетельствует о положительной реакции Фогеса—Проскауэра (см. рис. 3.10)
Среды Гисса	Определяют сахаролитические свойства бактерий	Набор пробирок с питательной средой в жидкой или полужидкой форме, в каждую из которых добавлены определенный углевод (сахар) и индикатор, меняющий окраску в кислой среде. В пробирки с жидкой средой вкладывают стеклянный поплавочек	При ферментации сахаров происходит образование газа и кислот, которые понижают pH, что приводит к изменению цвета индикатора. Газообразование учитывают по образованию пузырьков в полужидкой среде или газа в плашке

Продолжение табл. 3.1

Среда	Цель применения	Механизм действия	Внешний вид положительного результата
Среды с лизином, аргинином и орнитином	Тест на декарбоксилазную активность	Используют питательные среды с добавлением диаминоаминокислот (лизина, аргинина и орнитина) и индикатора, меняющего окраску в щелочной среде	При расщеплении диаминоаминокислот образуются амины и CO_2 , которые защелачивают среду, изменяя окраску индикатора
ФА-тест	Тест на фенилаланиндезаминазную активность	В результате окислительного дезаминирования фенилаланина образуется фенилпировиноградная кислота	Для выявления бесцветной фенилпировиноградной кислоты на поверхность посева добавляют хлорид железа, с которым фенилпировиноградная кислота образует темное окрашивание (см. рис 3.11)
Проба Пизу	Определение цистионазной активности	В столбик питательного агара с цистином и ацетатом свинца уколом засевают исследуемую культуру. Посев инкубируют при температуре 37 °С	При расщеплении цистина образуется сульфид свинца, в результате происходит почернение по ходу посева (см. рис 3.12)
Желатиновый тест	Бактерии, выделяющие фермент желатиназу, вызывают гидролиз аминокислот, входящих в желатину	Бактериальную культуру засевают в столбик с 10-12% мясо-пептонного желатина	Разжижение может иметь различные формы (воронкообразную, перевернутой елочки и др.)
ОФ-тест	Определяют механизм утилизации глюкозы по ферментативному или окислительному пути	Бактериальную культуру засевают уколом в две пробирки с окислительно-ферментативной средой, содержащей питательный агар, глюкозу, индикатор бромтимолсиний. Одну пробирку поверх агара заливают вазелиновым маслом.	Изменение окраски среды только в пробирке без масла свидетельствует об окислительном пути утилизации глюкозы. Изменение окраски в обеих пробирках свидетельствует о преобладании бродильных процессов.

Окончание табл. 3.1

Среда	Цель применения	Механизм действия	Внешний вид положительного результата
		Посевы инкубируют в термостате при температуре 37 °С в течение 3–4 сут	Отсутствие изменения цвета среды свидетельствует об отсутствии утилизации глюкозы

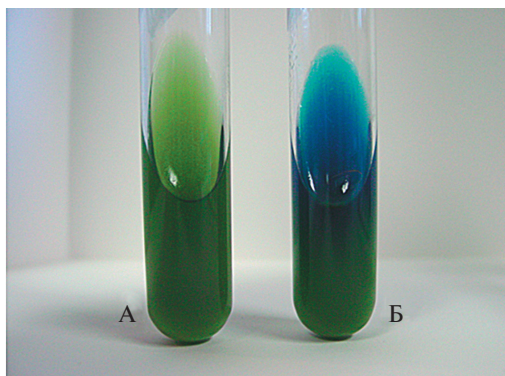


Рис. 3.5. Утилизация цитрата на среде Симмонса: А — до посева; Б — положительный результат

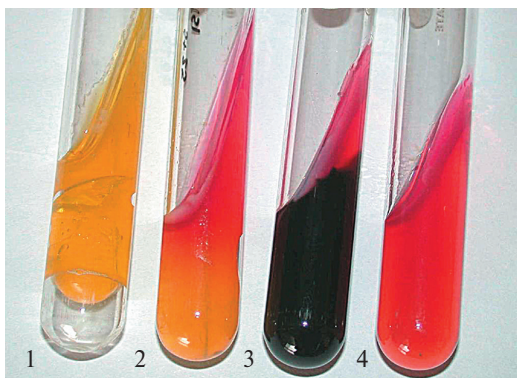


Рис. 3.6. Определение способности продуцировать сероводород и ферментировать глюкозу и лактозу на среде Клигlera: 1 — ферментация глюкозы и лактозы; 2 — ферментация глюкозы и отсутствие ферментации лактозы; 3 — продукция сероводорода, отсутствие ферментации лактозы; 4 — среда до посева

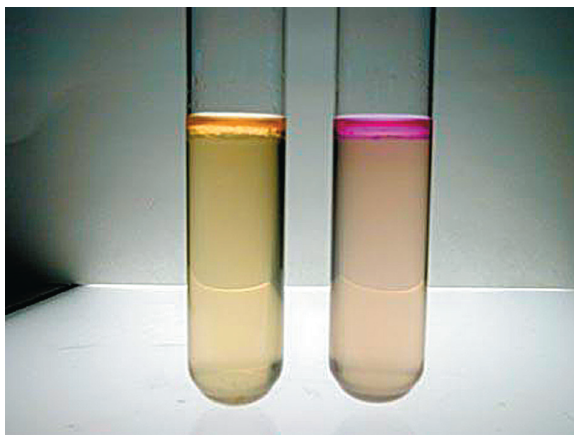


Рис. 3.7. Определение продукции индола с помощью реактива Ковача

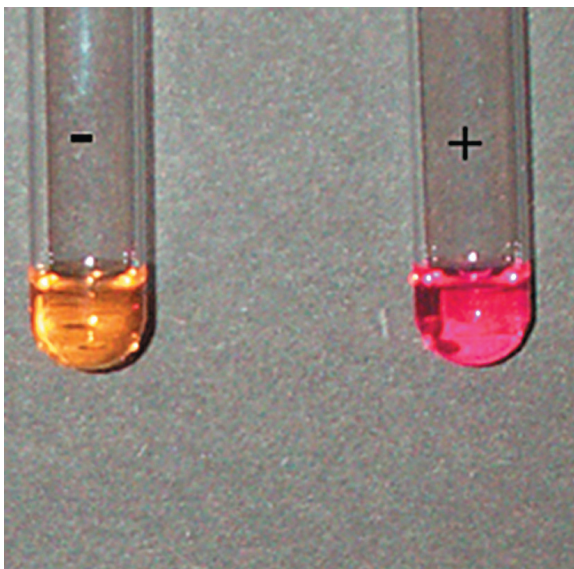


Рис. 3.8. Расщепление мочевины (тест на уреазу)

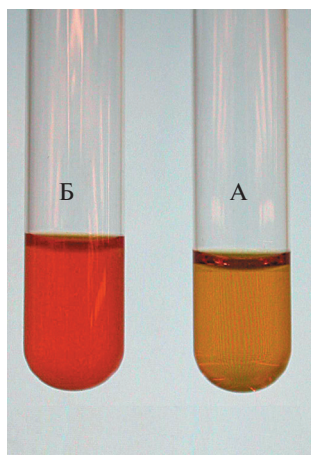


Рис. 3.9. Реакция метил-рота: А — до посева; Б — положительный результат

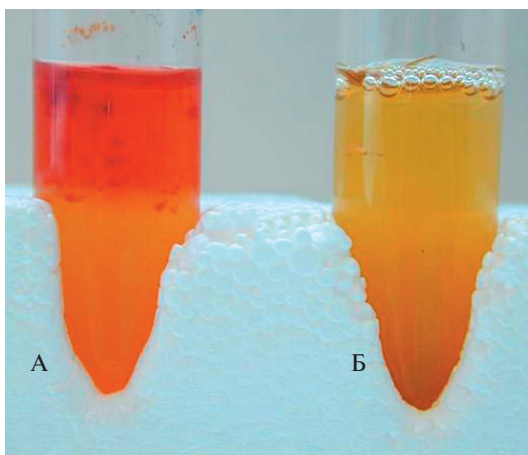


Рис. 3.10. Реакция Фогеса—Проскауэра: А — положительный результат; Б — отрицательный результат

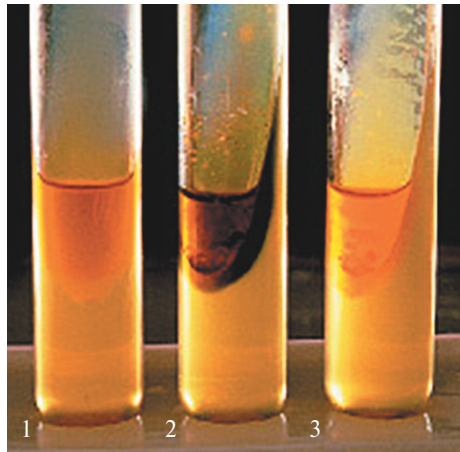


Рис. 3.11. Тест на фенилаланиндезаминазу: 1 — до посева; 2 — положительный результат; 3 — отрицательный результат



Рис. 3.12. Положительная проба Пизу

В настоящее время для биохимической идентификации бактерий часто вместо дифференциально-диагностических сред используют готовые **тест-системы** — полистероловые или картонные планшеты с лунками, в которые помещены сухие дифференциально-диагностические среды или субстраты, на которые должен подействовать искомым бактериальный фермент (рис. 3.13). **Идентификацию** выделенной чистой культуры в тест-системах проводят следующим образом.

- Из выделенной чистой культуры готовят бактериальную суспензию в физиологическом растворе или в прилагаемом буфере.
- Проводят инокуляцию приготовленной суспензии в лунки планшета.
- Инкубируют (обычно при температуре 37 °С в течение 18–24 ч).
- Оценивают результат по изменению окраски дифференциально-диагностических сред в планшете.



Рис. 3.13. Тест-система для биохимической идентификации бактерий

Помимо изучения ферментативной активности, с помощью дифференциально-диагностических сред для идентификации бактерий определяют ферменты, принимающие участие в процессах получения энергии: каталазу, нитратредуктазу, оксидазу.

- **Каталаза** расщепляет перекись водорода на молекулярный кислород и воду. Этим ферментом обладают облигатные аэробы и факультативные анаэробы. Для определения каталазы в пробирку с 2 мл жидкой бактериальной культуры добавляют несколько капель 3% перекиси водорода. Появление пузырьков газа свидетельствует о наличии каталазы.
- **Нитратредуктаза** восстанавливает нитрат в нитрит, при этом нитрат используется конечным акцептором электронов в процессе неокислородного нитратного дыхания, которое характерно для факультативных анаэробов. Определение нитритов проводят крахмало-йодной реакцией, основанной на том, что в кислой среде нитриты окисляют йодистый калий с выделением йода, который при взаимодействии с крахмалом образует синее окрашивание. Для этого культуру выращивают в питательном бульоне с добав-

лением в него KNO_3 , к 2–3 мл культуры добавляют 1 мл реактива, состоящего из равных объемов 10% H_2SO_4 и раствора, содержащего в 100 мл воды 0,5 г йодистого калия и 1 г крахмала. При положительном результате наблюдают синюю окраску.

- **Оксидаза** имеется у бактерий с аэробным типом дыхания. Для ее определения на поверхность выросшей на плотной среде бактериальной культуры добавляют несколько капель 1% спиртового раствора альфа-нафтола, 1% водного раствора метола. Появление лиловой окраски свидетельствует о положительной реакции.

3.5. ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ БАКТЕРИЙ

В природе микроорганизмы существуют в смешанных популяциях. Для изучения свойств микроорганизмов, определения их систематического положения необходимо, прежде всего, изолировать отдельные виды микроорганизмов и вырастить их в виде чистой культуры.

Чистыми культурами бактерий называют культуры, полученные из одной клетки, их выделение — основа всей микробиологической техники. Основу современных методов выделения чистых культур бактерий составляют принципы, заложенные Р. Кохом. Сущность их заключается в получении культуры бактерии из отдельной колонии, которую считают результатом развития одной клетки. Для получения роста отдельных колоний исследуемый материал необходимо механически разобщить. Этого достигают использованием нескольких методов посева (посевом штрихом, посевом петлей по методу Голда, методом предварительного серийного разведения материала, посевом шпателем по Дригальскому). Весь процесс в целом занимает 3–4 дня и состоит из четырех этапов.

- **I** — посев исследуемого материала в целях получения отдельных колоний.
- **II** — проводят учет роста колоний на питательной среде и изучение их культуральных свойств (таких как величина, цвет, форма колоний, их прозрачность, характер поверхности, однородность структуры). Изучение культуральных свойств заканчивают приготовлением мазка из колонии и окраской его по Граму, определяя при этом морфологические и тинкториальные свойства бактерий. После этого делают пересев на скошенный агар или чашку Петри для накопления чистой культуры.

- **III** — проверяют чистоту накопленной культуры (готовят мазок, окрашивают его по Граму и микроскопируют); если накопленная культура чистая, ее идентифицируют по биохимическим свойствам, антигенной структуре. Для биохимической дифференциации используют дифференциально-диагностические среды, содержащие различные субстраты или специальные тест-системы.
- **IV** — оценивают результаты биохимических исследований, по ним определяют таксономическое положение микроорганизма, что является основой антигенной идентификации.

Первый день исследования

Исследуемый материал отбирают петлей диаметром 2 мм и засевают на чашку Петри с питательной средой по методу Голда. Для этого чашку Петри со стороны дна предварительно расчерчивают на четыре квадрата. В первом квадрате делают посев исследуемого материала 20–30 штрихами. Петлю прожигают и проводят четыре перпендикулярных штриха из материала первого квадрата во второй квадрат. Петлю снова прожигают и проводят четыре перпендикулярных штриха из второго квадрата в третий, захватывая последовательно материал от первого, затем второго штриха, далее — третьего и четвертого штрихов. Посевы помещают в термостат с температурой 37 °С на 24 ч.

Второй день исследования

Засеянные чашки вынимают из термостата и изучают выросшие на питательной среде колонии. Вначале проводят описание характера роста колоний на питательной среде, т.е. их культуральные свойства. Описание проводят по следующей схеме.

- Форма колонии: круглая, неправильной формы, розоидная и др.
- Поверхность колонии: гладкая, шероховатая, морщинистая и др.
- Профиль колонии: плоский, выпуклый, кратерообразный.
- Блеск и прозрачность: матовая, блестящая, прозрачная, полупрозрачная, непрозрачная.
- Цвет колонии: бесцветная или пигментированная.
- Край колонии: ровный, волнистый, зубчатый (изучают при малом увеличении микроскопа).
- Структура колонии: однородная, неоднородная.
- Консистенция колонии: мягкая, тягучая, слизистая, хрупкая.

Результат описания культуральных свойств заносят в таблицу (табл. 3.2).

Таблица 3.2. Форма таблицы для описания результатов культуральных свойств колонии

Форма колонии	Поверхность колонии	Профиль колонии	Блеск и прозрачность	Цвет колонии	Край колонии	Структура колонии	Консистенция колонии

После изучения культуральных свойств выросшей колонии из ее половины приготавливают мазок, который окрашивают по методу Грама, микроскопируют, определяя морфологические и тинкториальные свойства колонии.

После определения культуральных, морфологических и тинкториальных свойств выросшей колонии вторую ее половину пересевают на скошенный агар или чашку Петри с плотной питательной средой, посев помещают в термостат.

Третий день исследования

Проверяют чистоту выделенной культуры, для чего приготавливают из посева мазок, который окрашивают по Граму и микроскопируют. Если выделенная культура чистая, приготавливают из нее суспензию в физиологическом растворе. Для этого с посева на чашке Петри отбирают 3–5 колоний и ресуспендируют в 5 мл физиологического раствора. Если культура выделена на скошенном агаре, физиологический раствор наливают в пробирку с посевом и, вращая пробирку между ладонями, делают смыв, который стерильной пипеткой переносят в чистую стерильную пробирку. Полученную взвесь засевают на дифференциально-диагностические среды или специальную тест-систему для биохимической идентификации. Помимо идентификации по биохимическим свойствам, при идентификации кокковых форм бактерий определяют:

- активность плазмокоагулазы (в пробирку с 1 мл цитратной плазмы кролика помещают 2–3 петли культуры стафилококка; пробирку помещают в термостат, результат фиксируют на следующие сутки, проверяя образование сгустка);
- чувствительность к желчи, антибиотику бацитрацину (для идентификации стрептококков); и антибиотик новобиоцину (при идентификации стафилококков), для чего делают посев выделенной культуры на кровяной агар, на поверхность которого помещают диски, пропитанные вышеперечисленными веществами.

Четвертый день исследования

Проводят учет биохимической активности выделенной чистой культуры. По специальным схемам определяют таксономическое положение выделенной чистой культуры. При необходимости проводят внутривидовую идентификацию для эпидемического маркирования рутинными (фаготипированием, колицинотипированием, определением хемоваров) или молекулярными методами. Также определяют чувствительность выделенной чистой культуры к антибиотикам (при необходимости проводят серотипирование выделенной чистой культуры).

При выделении чистых культур можно использовать методы, основанные не только на механическом разобщении, но и на различии их биологических свойств (метод Шукевича, использование селективных питательных сред, атмосферы культивирования). Также используют комбинированный способ, сочетающий механическое и биологическое разобщение. Для выделения чистой культуры бактерий и одновременного определения концентрации этого вида бактерий в исследуемом материале перед посевом проводят серийные разведения этого материала в физиологическом растворе.

3.6. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ АНАЭРОБОВ

Для культивирования анаэробных микроорганизмов необходимо создать бескислородные условия. Этого достигают несколькими методами.

3.6.1. Физические методы

Физические методы основаны на создании вакуума в специальных аппаратах — анаэростатах (рис. 3.14). Анаэростат представляет собой металлический толстостенный цилиндр с хорошо притертой крышкой, снабженной отводным краном и манометром. После помещения в цилиндр засе-



Рис. 3.14. Анаэростат

янных чашек или пробирок крышку плотно закрывают и удаляют воздух с помощью вакуумного насоса (иногда воздух заменяют каким-либо другим газом, например CO_2).

Доступ кислорода в питательную среду можно затруднить, если культивировать анаэробы в глубоких столбиках сахарного агара или среды Вильсона—Блера, налитых в пробирки в расплавленном состоянии и охлажденных до температуры 46°C .

3.6.2. Химические методы

Химические методы заключаются в том, что при культивировании на жидких питательных средах в них добавляют редуцирующие кислород вещества — аскорбиновую или тиогликолевую кислоту. Тиогликолевая среда — универсальная среда для накопления анаэробных бактерий. Для этих целей можно использовать среду Китта—Тароцци, которая состоит из сахарного бульона, налитого в количестве 10 мл в пробирку; на ее дно помещают кусочек вареных паренхиматозных органов (печени), который связывает растворенный в среде кислород, адсорбируя его на себе. Перед употреблением среду кипятят на водяной бане для удаления кислорода, сверху заливают вазелиновым маслом.

Следует помнить, что **при культивировании анаэробов в пробирках они обязательно должны быть закрыты стерильными резиновыми пробками.**

В случае культивирования анаэробных бактерий на плотных питательных средах посевы помещают в герметически закрытые емкости, в которые вносят поглотители кислорода, например пирогаллол или гидросульфит натрия. В настоящее время для этих целей используют систему *Gas Pak*.

Система *Gas Pak* (рис. 3.15) состоит из двух основных компонентов: герметично закрывающегося пластикового контейнера *Gas Pak* с прозрачными стенками и газорегенерирующих пакетов одноразового применения. При вынимании этих пакетов из упаковки происходит их активация, в результате которой создаются анаэробные условия.



Рис. 3.15. Система *Gas Pak*

3.6.3. Биологический метод (метод Фортнера)

Биологический метод основан на одновременном культивировании строгих аэробов и анаэробов на плотной среде в чашках Петри, которые герметически закупоривают. Вначале кислород поглощается строгим аэробом, растущим на одной половине чашки, а затем начинается рост анаэробов, материал на которые посеян на другой половине чашки.

При выделении чистой культуры анаэробных бактерий рост изолированных колоний можно получить при расसेве исследуемого материала по поверхности сахарно-кровяного агара и другой специальной среды для культивирования анаэробов, разлитых в чашки Петри. После посева чашки помещают в анаэроstat или *Gas Pak* и вносят в термостат. После инкубации выросшие колонии пересевают на тиогликолевую среду или среду Китта–Тароцци.

Вопросы для самоконтроля

1. Микроаэрофилы культивируют в атмосфере ...
2. Мезофильные бактерии культивируют при температуре ...
3. Метод Фортнера используют для ...
4. Элективные среды используют для ...
5. Идентификацию выделенной чистой культуры по биохимическим свойствам проводят с помощью ...
6. Определение количества бактерий в единице объема исследуемого материала проводят методом ...