

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования "Ивановская государственная медицинская академия"
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кафедра микробиологии и вирусологии

Культивирование бактерий

Учебное пособие по курсу Общая микробиология для обучающихся
по специальности «Лечебное дело» и «Педиатрия»

Иваново 2023

УДК: 57.083.13+615.012.6:542.9(07)

ББК: 28.4

Рецензенты:

Доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии с вирусологией и иммунологией ФГБОУ ВО "Ярославский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации **Малафеева Э.В.**

Заведующий кафедрой детских инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России, д-р мед. наук, профессор, **Баликин В.Ф.**

Пособие посвящено одному из важных разделов микробиологии: культивированию бактерий. Настоящее издание составлено с учетом образовательных программ высшего профессионального образования и примерных учебных и рабочих программ дисциплины «Микробиология». Пособие предназначено для самостоятельной внеаудиторной подготовки студентов 2 курса лечебного и педиатрического факультетов по общей микробиологии. Издание составлено в соответствии с Федеральным государственным образовательным стандартом высшего образования по направлению подготовки специальности «Лечебное дело» и «Педиатрия».

Адресовано студентам различных специальностей.

УДК: 57.083.13+615.012.6:542.9(07)

ББК:28.4

Утверждено центральным координационно-методическим советом ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России в качестве учебного пособия для студентов, обучающихся по специальности ПЕДИАТРИЯ 31.05.02 и ЛЕЧЕБНОЕ ДЕЛО 35.05.01 по дисциплине «Микробиология».

© ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России, 2023

Составители сотрудники кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России: Кузнецов О.Ю., Кириленко М.А.

Рекомендуемая литература

Основная литература:

1. Воробьев А. А., Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. - М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2008. С. 704.

2. Покровский В. И., Поздеев О. К. Медицинская микробиология, М.: ГЭОТР Медицина, 1988 г. С. 1200.

Дополнительная литература:

Блажевич О. В., Культивирование клеток, курс лекций для студентов специальности G310101 «БИОЛОГИЯ» (направление «Биотехнология» G 31 01 01-03) Минск. БГУ, 2004. С. 77.

Зверев В.В., Бойченко М.Н., Микробиология, вирусология, Учебное пособие, Руководство к практическим занятиям. Москва, 2017. С. 71.

Шлегель Г. Общая микробиология: Пер. с нем.-М.: Мир, 1987.- 567 с., ил.

Методы общей бактериологии Текст : в 3 т. / под ред. Ф. Герхардта и др. ; пер. с англ. под ред. Е. Н. Кондратьевой, Л. В. Калакуцкого. - Москва : Мир, 1983-1984. - 21 см. Т. 2. - 1984. - 469, ил.

Содержание

Культивирование микроорганизмов	4
Условия культивирования бактерий	5
Техника посева микроорганизмов	13
Техника посевов бактерий на плотные питательные среды	14
Посев в столбик полужидкого агара	26
Техника посева в жидкую питательную среду	26
Биологические методы культивирования	26
Выделение чистой культуры бактерий	27
Культивирование анаэробов	34
Методы выделения чистых культур облигатно-анаэробных микроорганизмов	35
Физические методы	35
Химические методы создания анаэробных условий	38
Классификация процессов культивирования микроорганизмов	39
Периодическое культивирование	43
Глубинное периодическое культивирование	47
Продленное периодическое культивирование	49
Многоциклическое культивирование	50
Полунепрерывное культивирование	51
Непрерывное культивирование	52
Хемостатное культивирование	53
Турбидостатный метод культивирования микроорганизмов	56
Синхронно делящиеся культуры микроорганизмов	62
Подсчёт числа клеток	65
Контрольные вопросы	80
Список литературы	85

Культивирование микроорганизмов (*cultur* по латыни - *выращивание*) - это процесс выращивания бактерий, вирусов и других микроорганизмов в искусственных условиях для получения биомассы или их продуктов жизнедеятельности.

Необходимость культивирования микроорганизмов обусловлена несколькими факторами:

1. Изучение биологических свойств микроорганизмов: культивирование позволяет изучать свойства и характеристики микроорганизмов, такие как их рост, метаболизм, устойчивость к антибиотикам и т.д.

2. Производство биопрепаратов, продуктов питания: некоторые микроорганизмы используются для производства пищевых продуктов, лекарственных препаратов, ферментов и других ценных продуктов.

3. Микробиологический контроль (анализ) окружающей среды: культивирование может помочь в анализе образцов почвы, воды или воздуха на присутствие в этих средах микроорганизмов и их оценке свойств, а также при оценке различного рода воздействия данных микроорганизмов на среду обитания человека.

4. Контроль качества: культивирование используется для контроля качества продуктов питания, лекарственных препаратов и других товаров, которые могут быть загрязнены микроорганизмами, которые зачастую повинны в их повреждении.

5. Микробиологический контроль качества и безопасности пищевых продуктов: культивирование помогает контролировать безопасность пищевых продуктов и предотвращать распространение заболеваний, связанных с употреблением некачественной пищи.

6. Разработка вакцин для последующего использования в создании иммунного ответа у человека и сельскохозяйственных животных.

7. Получение антигенных препаратов из чистых культур микроорганизмов для создания экспресс-тестов идентификации присутствия микробов в объектах внешней среды и микробиоме человека.

Существует несколько режимов культивирования микроорганизмов, которые широко используются в различных областях науки и промышленности.

Следует особо отметить, что довольно часто подходы и методы культивирования различных групп микроорганизмов весьма похожи, но иногда они существенно отличаются, поэтому в дальнейшем материале пособия будут рассмотрены вопросы по культивированию бактерий отдельных видов и классов.

Условия культивирования бактерий

Культивирование бактерий 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.***

В лабораторных условиях микроорганизмы культивируют на различных питательных средах, зачастую природного происхождения, что значительно облегчает процесс ее приготовления и, кроме того, такая питательная среда содержит практически все химические вещества, необходимые для их роста.

Для культивирования микроорганизмов основными компонентами любой питательной среды являются соединения углерода и азота, поскольку именно эти соединения определяют специфичность большинства питательных сред. Так же требуются наличие в среде так называемых факторов роста, к которым относятся витамины, аминокислоты и азотистые основания. Микроорганизмам для построения веществ клетки необходимы также сера, фосфор, калий, натрий, железо и другие элементы. Потребности микроорганизмов в этих элементах удовлетворяются обычно за счет добавления минеральных солей.

Таким образом, минеральная основа питательных сред для культивирования многих микроорганизмов может быть близкой и сбалансированной по составу. Готовая питательная среда должна быть изотоничной по концентрации растворенных веществ, иметь оптимальные физико-химические характеристики: влажность, вязкость, реакцию среды (рН), окислительно-восстановительный потенциал.

- **Температура культивирования** 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 °С).

Мезофилы включают бактерии, температурный диапазон роста которых находится между 10 и 45 °С. Оптимальная температура для их культивирования — $25-37$ °С.

Термофилы способны расти при повышенных температурах ($42-50$ °С).

Для поддержания требуемой температуры используют специальные приборы — термостаты.

- **Атмосферу культивирования** (наличие или отсутствие кислорода во время 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.

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. Особенности культивирования анаэробов будут рассмотрены в специальном разделе данного пособия ниже.

Факультативные анаэробы для своего роста используют в своих метаболических процессах кислород. При его отсутствии они используют ферментативный метаболизм или анаэробное дыхание, но в большинстве случаев их культивируют в аэробных условиях.

- **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, исключющие попадание других видов бактерий:** использование стерильной посуды и стерильных питательных сред, особое внимание обращают на соблюдение стерильности при проточном культивировании.

Кроме условий культивирования в ряде случаев, для получения каких либо продуктов (метаболитов, токсинов) жизнедеятельности требуется

учитывать фазы роста популяций бактерий. Данные фазы роста учитываются только для культивирования бактерий на жидких питательных средах (Рис.1).

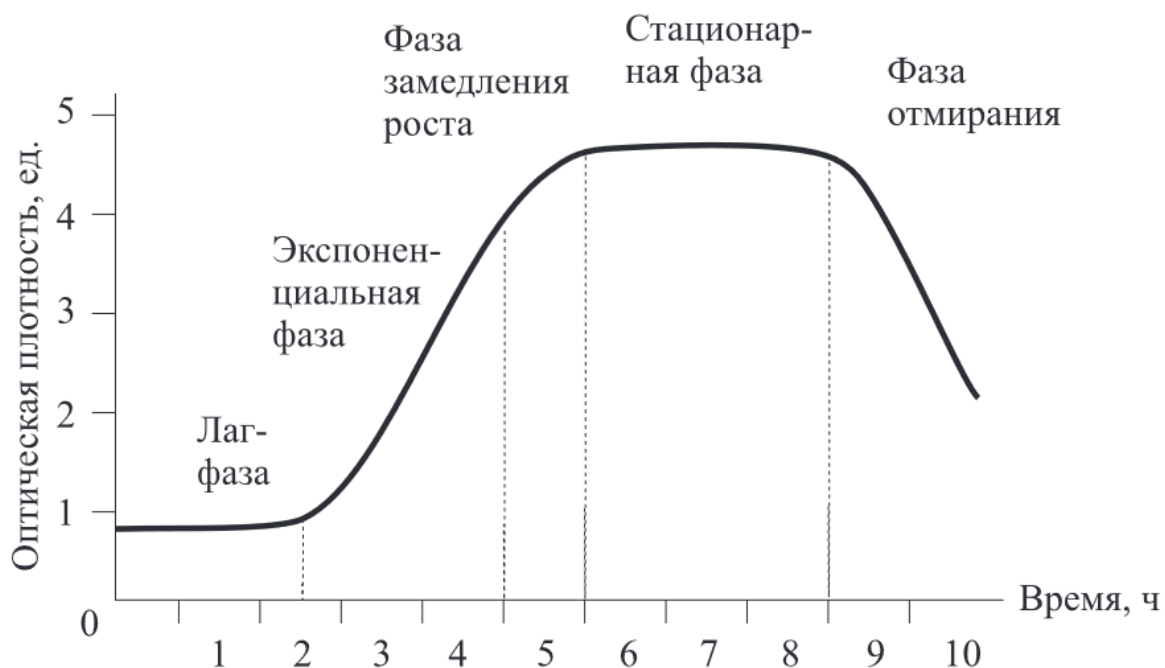


Рис.1. Фазы роста бактериальной популяции в периодической культуре

Выделяют фазы развития микроорганизмов в периодической культуре:

I – Лаг фаза (начального развития), фаза адаптации, приспособления.

Происходит начальный рост микроорганизмов. Внесенные в питательную среду клетки микроорганизмов сразу не начинают размножаться. В этот период клетки приспособляются к условиям и составу среды и окружающим условиям. Продолжительность этой фазы (может длиться от нескольких часов до нескольких суток) зависит от состава питательной среды, рН, температуры, возраста и количества внесенных клеток. В этот период увеличивается количество нуклеиновых кислот,

особенно рибонуклеиновой кислоты (РНК), что необходимо для синтеза белков.

II – Экспоненциальная (логарифмическая или фаза ускоренного роста)

Это стадия интенсивного размножения. Клетки снабжены питательными веществами, не накопили вредных продуктов обмена, поэтому увеличение массы и объема клеток максимальное. В этой фазе большинство клеток является биологически активными и молодыми.

Если культуру в данной фазе развития перенести в другую емкость с аналогичным субстратом, то скорость роста микроорганизмов не изменится. В этом случае лаг-фаза будет отсутствовать. Если же пересев происходит во время другой стадии, то фаза адаптации обязательно будет присутствовать.

Клетки по размеру мелкие, так как почкование опережает рост, но большая поверхность таких клеток обеспечивает высокую скорость биохимических процессов.

На этой стадии культура более чувствительна к действию неблагоприятных факторов, поскольку в данной фазе большинство клеток быстро размножается и практически они все находятся в близких физиологических позициях по чувствительности к различным факторам.

III фаза - Замедления роста

Постепенно происходит накопление продуктов метаболизма обмена веществ клеток, которые в определенных концентрациях могут мешать нормальному протеканию обменных процессов, поэтому скорость размножения постепенно замедляется.

Скорость роста также уменьшается за счет сокращения площади поверхности клеток из-за тесного окружения одних клеток другими, а именно через их поверхность происходят процессы обмена веществ: попадание питательных веществ в клетку и выведение метаболитов.

IV фаза – Стационарная

Период, в течение которого количество живых клеток остается постоянным. В этот период число отмирающих клеток равно числу вновь образующихся. Скорость размножения равна скорости отмирания. Общая биомасса (сумма живых и отмирающих клеток) увеличивается. В этот период в среде накапливаются продукты обмена веществ, которые имеют важное практическое значение (ферменты, антибиотики и др.).

V фаза – Фаза отмирания

Период, когда в результате истощения питательной среды и максимального накопления продуктов метаболизма обмена скорость отмирания клеток намного превышает скорость их размножения. Постепенное увеличение гибели клеток ведет к появлению в окружающей среде большого количества разнообразных ферментов, способствующих усилению этого процесса. В данном случае он приобретает лавинообразный характер. Происходит автолиз - гибель клеток под действием собственных ферментов. В результате этого уменьшается общая численность клеток и концентрация биомассы. Эта фаза является противоположностью логарифмической. Если в логарифмической фазе роста достигается максимальная скорость размножения, то в фазе отмирания – максимальная скорость отмирания. К окончанию данной фазы возможна окончательная гибель всех клеток популяции или переход в покоящееся (некультивируемое) состояние с сохранением физиологического анабиоза.

Однако при добавлении свежих порций питательной среды на любой фазе развития популяции спустя некоторое время может начаться повторно фаза экспоненциального роста с увеличением количества клеток популяции и изменением всех остальных фаз развития на этой питательной среде.

Параметры кривой роста

Под урожаем клеток (X) понимают разность между максимальной и исходной массой бактерий: $X = X_{max} - X_0$. Эту величину выражают в весовых единицах, чаще в граммах.

Особенно важно отношение урожая клеток к количеству потребленного субстрата (X/S). Если обе эти величины выражают в весовых единицах, то отношение X/S , называемое экономическим коэффициентом, обозначают через Y :

$$Y = dX/dS,$$

где dX – увеличение биомассы, соответствующее потреблению субстрата в количестве dS . Более строго экономический коэффициент определяется пределом, к которому стремится данное соотношение при dS , стремящейся к нулю. Важность экономического коэффициента состоит в том, что он выражает количественные потребности организма в пище. Впервые экономический коэффициент был использован М. Ролэном для выражения пищевых потребностей микроскопических мицелиальных грибов ($Y = -dX/dS$). Знак «-» здесь вводился, поскольку значения изменяются в разных направлениях. В настоящее время принято использовать величину Y , обратную предложенной М. Ролэном.

Если же урожай (в граммах) относят к числу молей потребленного субстрата, то экономический коэффициент, называемый в этом случае молярным экономическим коэффициентом, обозначают через Y_m . Молярный экономический коэффициент Y_m позволяет связать урожай клеток с полученным из какого-либо источника энергии (т. е. какого-либо субстрата) количеством АТФ (макроэргические эквиваленты). $Y_{АТФ}$ – энергетический коэффициент, выражаемый в граммах клеточной массы на 1 моль АТФ. Этот коэффициент можно вычислить, если известен путь расщепления данного субстрата и выход АТФ в результате этого расщепления.

Скорость потребления субстрата культурой в данный момент времени выражается соотношением:

$$dS/dT = qX,$$

где X – биомасса, а коэффициент q известен как **метаболический коэффициент**, или **удельная скорость метаболизма**. Метаболический коэффициент аналогичен ферментативной активности. Метаболический коэффициент можно выразить также через экономический коэффициент и удельную скорость роста и представить еще в таком виде:

$$q = \mu/Y.$$

Если удовлетворены все необходимые требования, то предполагается, что в течение единицы времени dt увеличение биомассы dX должно быть пропорционально количеству биомассы X и интервалу времени, т. е.:

$$dX = \mu X dt, \quad \text{откуда}$$

$$dX/dt = \mu X \quad \text{или} \quad \mu = dX/dt \cdot 1/X.$$

Дифференциальное отношение dX/dt выражает скорость роста популяции клеток. Параметр μ , обозначающий скорость роста единицы биомассы ($1/X$) (dX/dt), называется удельной скоростью роста и измеряется в единицах, обратных времени ($1/t$). Этот параметр аналогичен сложным процентам. Так, например, удельная скорость роста 0,1 ч эквивалентна скорости 10 % в 1 час.

Если μ постоянна, то интегрирование уравнения дает:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t,$$

где X_0 – биомасса в начальный момент времени $t = 0$.

Рост популяции клеток, подчиняющийся этому закону, называется экспоненциальным, или логарифмическим, ростом.

Для того чтобы рассчитать время генерации клеток, можно использовать уравнение, учитывая геометрическую прогрессию роста:

$$N = N_0 \cdot 2^n, \text{ откуда } \lg N = \lg N_0 + n \lg 2,$$

где N – число клеток.

Отсюда число клеточных делений (n) составит: $n = (\lg N - \lg N_0) / \lg 2$.

Константу скорости деления, или число клеточных делений в единицу времени, $t - t_0$ можно вычислить по формуле:

$$v = n/t,$$

а время одной генерации (g), по формуле:

$$g = t/n = 1/v.$$

Техника посева микроорганизмов

Бактериологический метод — выделение чистых культур микробов и их последующая идентификация — имеет большое значение в диагностике инфекционных заболеваний, при изучении санитарно-гигиенического состояния объектов внешней среды (вода, воздух, почва, продукты).

Однако первым этапом этого метода является посев или пересев бактериальной культуры на различные типы питательной среды. Материалом для посева могут быть пересеваемые культуры бактерий, различные выделения животных и человека, ткани трупа, вода, почва, продукты питания.

Жидкий материал для посева берут петлей или пипеткой. При взятии петлей жидкость должна образовать в кольце петли тонкую прозрачную пленку - “зеркало”. Пипетками пользуются в том случае, когда материал засевают в большом или точно отмеряемом объеме. Способ взятия плотного материала определяется его консистенцией.

При посевах чаще всего пользуются бактериальной петлей. Все манипуляции, связанные с посевом и выделением микробных культур, производят над пламенем горелки. Бактериальную петлю прокалывают над

пламенем непосредственно перед взятием материала, затем петлю остужают. Для этого при пересеве микробной культуры с пробирки горячую петлю погружают в конденсационную жидкость, а при пересеве с чашек Петри прикасаются к поверхности питательной среды, свободной от микробного роста.

Достаточно остуженная петля не вызывает шипения конденсационной жидкости и не растапливает агар при соприкосновении со средой. После окончания посева петлю прожигают повторно для уничтожения находящейся на ней микробной культуры или инфицированного микроорганизмами материала.

Пипетки и шпатели, используемые для посевов, опускают в дезинфицирующий раствор, которые затем при необходимости автоклавируют. После посева на чашках Петри со стороны дна, на пробирках в верхней трети надписывают название засеянного материала и дату посева.

Техника посевов бактерий на плотные питательные среды.

Посев на скошенный мясопептонный агар (МПА) (Рис. 2).

а) Пробирку берут в левую руку между I и II пальцами, чтобы основание пробирки находилось на поверхности кисти руки и посев должен осуществляться под визуальным контролем.

б) Пробку из пробирки вынимают 5 и 6 пальцами (вместе) правой руки, не прикасаясь к той части пробки, которая входит внутрь пробирки.

в) Остальные пальцы правой руки остаются свободными для взятия бактериальной петли, посредством которой производится посев из одной пробирки в другую. Петлю держат, как писчее перо. После вынимания пробки пробирку с питательной средой держат в наклонном положении во избежание попадания в нее посторонних микроорганизмов из воздуха (ни в коем случае нельзя данную пробку класть на поверхность стола!).

г) Петлю с находящимся на ней пересеваемым материалом вводят в пробирку до дна, опускают плашмя на поверхность питательной среды и скользящими движениями наносят штрих снизу вверх, от одной стенки пробирки к другой.

д) Закрывают пробирку пробкой, предварительно пронесенной несколько раз над пламенем спиртовки (фламбированной).

е) Окончательно прокаливают петлю в пламени спиртовки (фламбируют).

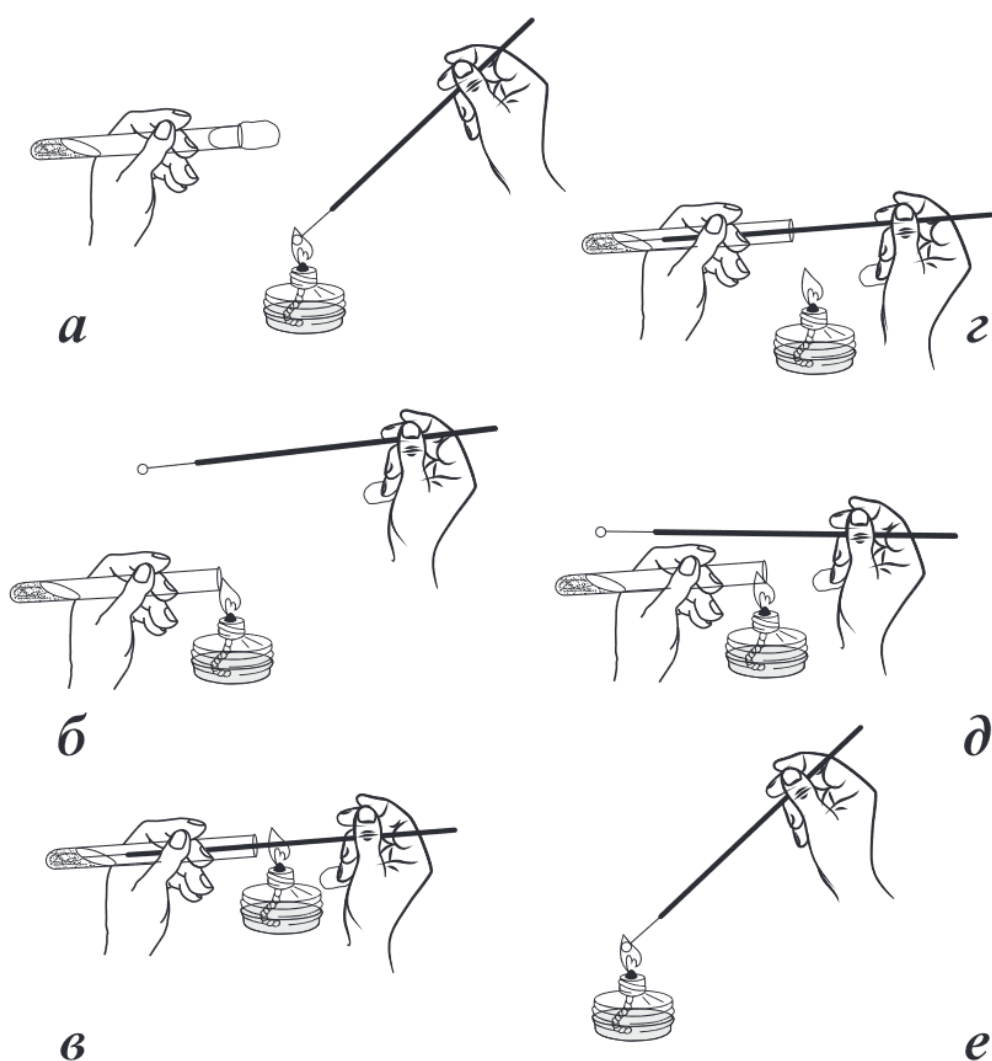


Рис. 2. Посев бактериальной петлей культуры бактерий в пробирку со скошенным мясопептонным агаром (МПА) – рис. Лунгу А.П.

Техника посева бактерий из пробирки в пробирку при посеве на скошенный мясопептонный агар (МПА) (Рис. 3).

а) Пробирки берут в левую руку между 1 и 2 пальцами, чтобы основания пробирок находились на поверхности кисти руки и посев должен осуществляться под визуальным контролем.

б) Пробки из пробирок вынимают 5 и 6 пальцами правой руки, не прикасаясь к той части пробки, которая входит внутрь пробирки.

в) Остальные пальцы правой руки остаются свободными для взятия бактериальной петли, посредством которой производится посев из одной пробирки в другую. Петлю держат, как писчее перо. После вынимания пробки пробирку с питательной средой держат в наклонном положении во избежание попадания в нее посторонних микроорганизмов из воздуха.

г) Петлю с находящимся на ней пересеваемым материалом вводят в пробирку до дна, опускают плашмя на поверхность питательной среды и скользящими движениями наносят штрих снизу вверх, от одной стенки пробирки к другой.

д) Закрывают пробирки пробками.

е) Прокаливают петлю в пламени спиртовки.

Все манипуляции проводят с соблюдением правил асептики для предотвращения контаминации (случайного попадания) из воздушной среды микроорганизмов в открытую пробирку с питательной средой для устранения возможности контаминации.

Данная техника посева используется повсеместно, поскольку это самый простой и надежный способ при получении чистых культур микроорганизмов и их сохранения. Он не требует сложного оборудования и общедоступен для исполнения и при его частом использовании легко приобретает навык практического и безошибочного применения.

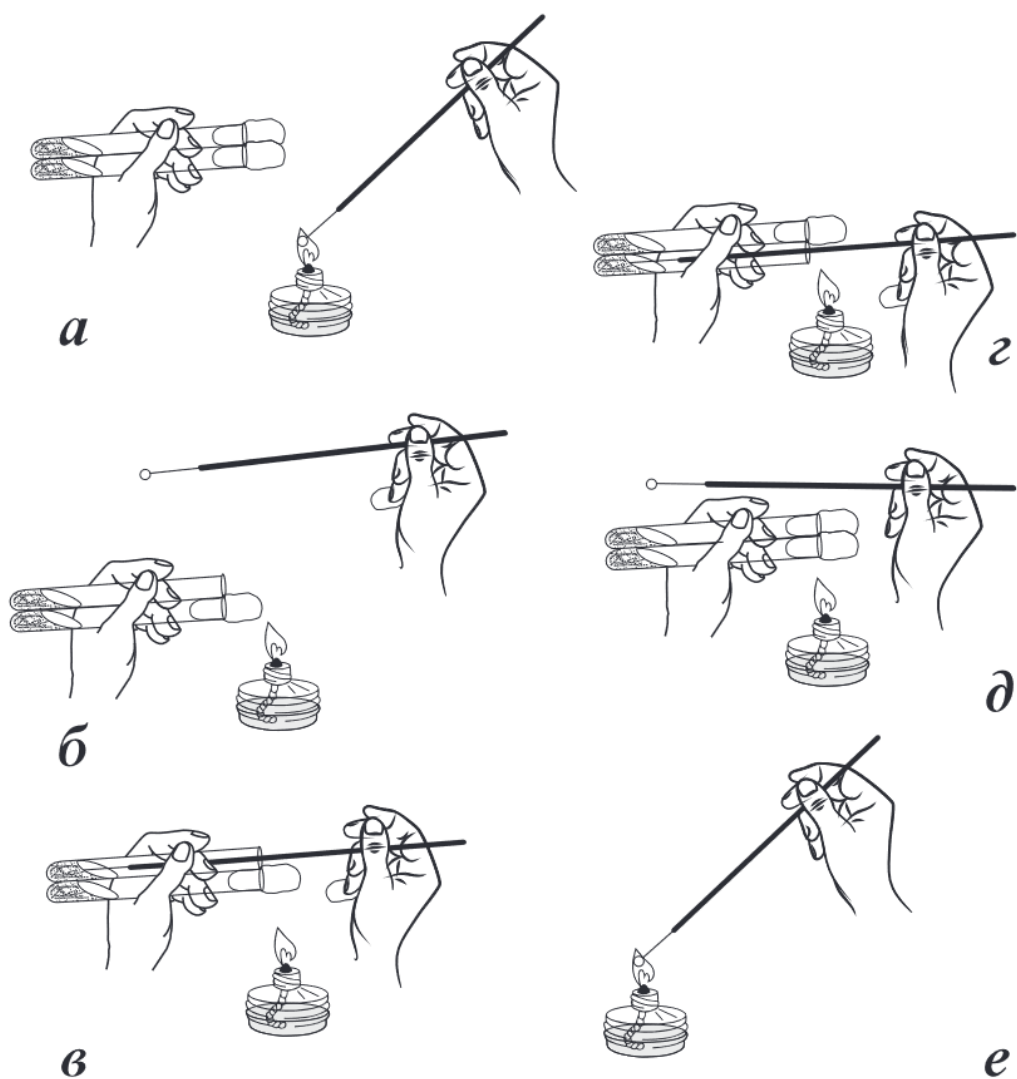


Рис. 3. Пересев бактерий из пробирки в пробирку при посеве на скошенный мясопептонный агар (МПА) – рис. Лунгу А.П.

Посев уколом в столбик питательной среды производят в пробирку со средой, застывшей в виде столбика. Пробирку берут в левую руку, как обычно, и в центре столбика до дна пробирки вкалывают петлю с находящимся на ней материалом (Рис. 4).

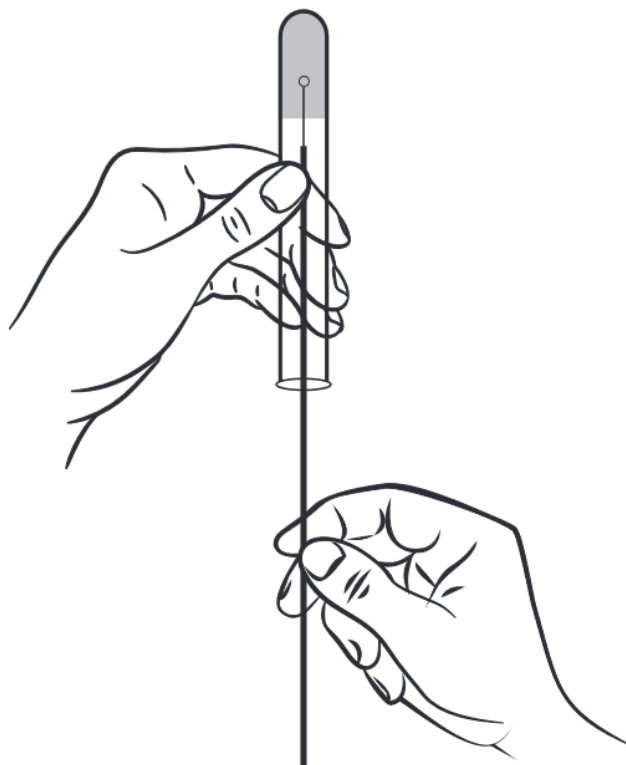


Рис. 4. Посев уколом в столбик плотной питательной среды – рис. Лунгу А.П..

При посеве на поверхность плотной питательной среды (Рис.5).

Чашку Петри обычно держат в левой руке. Дно ее с одной стороны придерживают 1 и II пальцами, а с другой —IV и V пальцами. Крышку, приоткрытую настолько, чтобы в образовавшуюся щель свободно проходили петля или шпатель, фиксируют 1 и III или 1 и II пальцами (Рис. 5). Пробка, вынутая из пробирки с бактериальной культурой держат все время в правой руке, зажав мизинцем в кисти мизинцем.

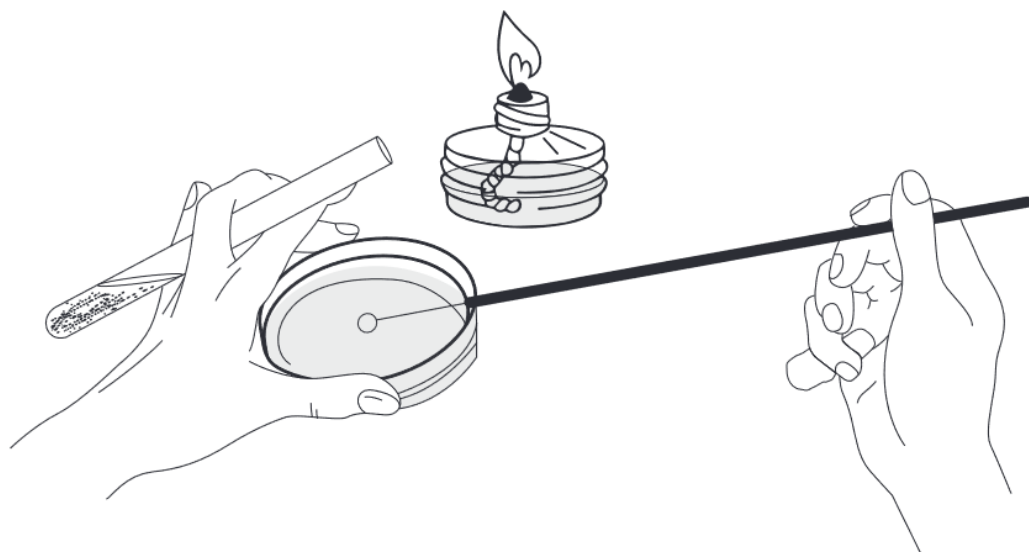


Рис.5. Посев на поверхность плотной питательной среды.

Небольшое количество исследуемого материала втирают бактериальной петлей в поверхность питательной среды у края чашки. Затем петлю прожигают, чтобы уничтожить избыток находящегося на ней материала. Линию посева начинают с того места, в котором находится материал. Бактериальную петлю кладут плашмя на питательную среду, чтобы не поцарапать ее поверхности, и проводят штрихи по всей среде или по секторам, разграфив предварительно дно чашки (при условии, что среда прозрачна) на несколько равных частей.

Нужно стараться, чтобы штрихи, наносимые петлей, располагались как можно ближе друг к другу, так как это удлиняет общую линию посева и дает возможность для равномерного распределения засеваемого материала по поверхности плотной питательной среды можно пользоваться вместо петли шпателем.

Метод посева штрихом в чашки удобен для получения отдельных колоний.

Посев можно проводить штрихом, используя бактериологическую петлю. Петлей осуществляют посев в первую, во вторую, третью и т.д. чашки. Как правило, в первой чашке после культивирования посева появляется рост микробов в виде сплошного (обильного) роста, в последующих чашках содержание микроорганизмов снижается и образуются изолированные колонии, из которых отсевом можно легко выделить чистую культуру.

Метод истощающего штриха (Рис. 6). В целях экономии сред и посуды можно пользоваться одной чашкой:

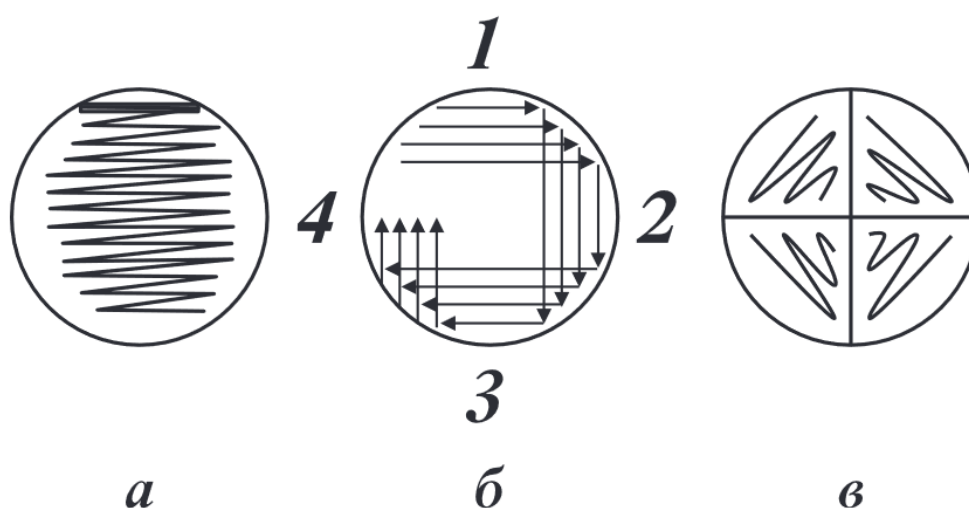


Рис. 6. Выполнение посева методом истощающего штриха (детальное описание ниже по тексту).

- берут петлей материал и свободно без нажатия на петлю (скользя ею) производят ряд параллельных зигзагообразных штрихов по всей поверхности плотной среды от одного края к другому (Рис. 6 а);
- берут петлей материал и проводят ею несколько рядов на питательной среде (б 1), затем чашку переворачивают на 90^0 и делают еще несколько штрихов (б 2), далее повторяют тоже самое еще два раза (б 3, б 4), как показано на рис. 6;
- берут петлей материал и предварительно разделив чашку на сектора (Рис. 6 в) последовательно засевают их штрихом. Для этого материал берут петлей и проводят ею ряд параллельных штрихов сначала по поверхности первого сектора, а затем последовательно оставшимися на петле клетками засевают все другие сектора.

При каждом последующем штрихе происходит уменьшение количества засеваемых клеток. В том месте, где на агар попало большое количество микробных клеток, рост микроорганизмов будет в виде сплошного штриха. На секторах с небольшим количеством клеток микроорганизмы вырастают в виде отдельных колоний.

Таким образом, в первых секторах получается сплошной рост, а вдоль последующих штрихов вырастут обособленные колонии, представляющие собой потомство одной клетки.

Посев уколом в чашку Петри.

В данном случае для посева может быть использована проволока без замыкания ее конца в кольцо, т.е. не классический вариант бактериальной петли. Иногда вместо бактериальной петли может быть использована медицинская игла. Посев осуществляется следующим образом – чашка Петри открывается и переворачивается в левой руке таким образом, чтобы дно чашки Петри с агаром (находится вверху) было параллельно рабочему столу,

а посев в агаризованную среду выполнялся бы снизу уколом (рис.). После этого чашка закрывается и размещается на инкубацию.

Таким образом, например, засевают культуру бактерий рода *Proteus sp.* при изучении его динамики роста с образованием волн или спиралей на поверхности агаризованной питательной среды.

Метод посева по секторам (Рис. 7).

а. Для маркировки на обратной стороне чашки Петри карандашом наносят букву Г, разделяющую дно на 3 сектора.

б. Петлей с культурой зигзагом наносят штрихи на поверхности питательной среды в секторе 1, как показано на рисунке а. Для этого крышку чашки сначала приподнимают, а после нанесения штриха сразу закрывают. Петлю стерилизуют в пламени и дают ей остыть (15 с).

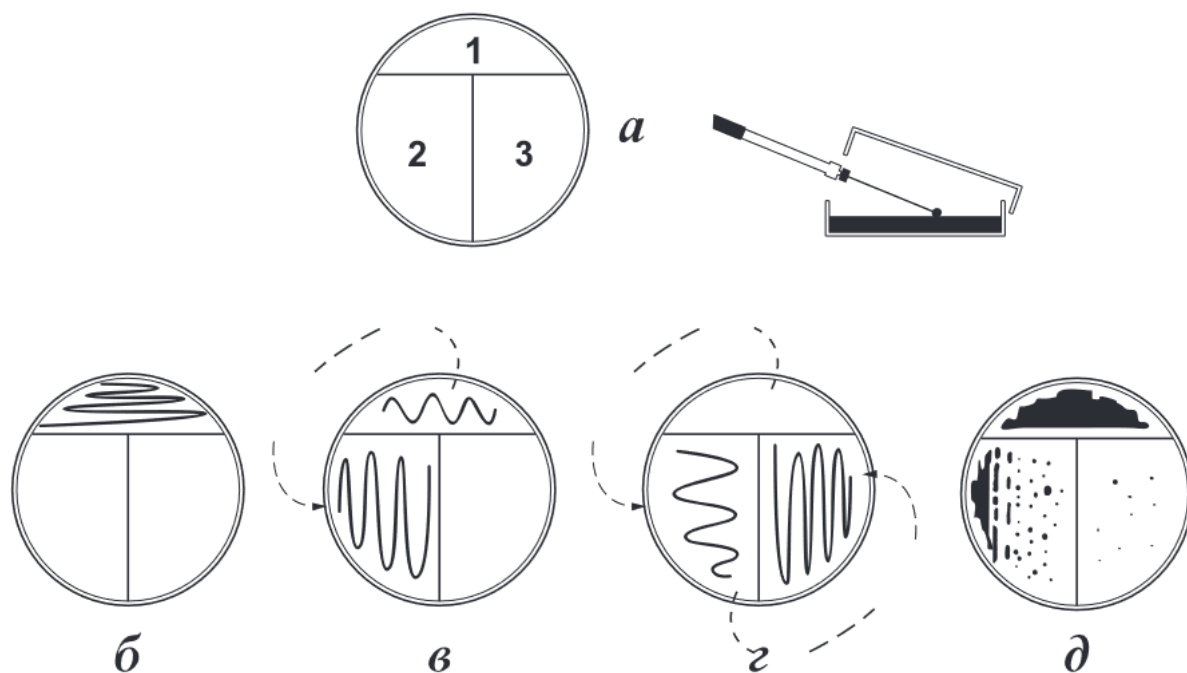


Рис.7. Метод посева по секторам в чашку Петри с агаризованной питательной средой

в. Проводят петлей по поверхности среды в секторе 1, как показано на рисунке, и затем немедленно наносят ею зигзагом штрихи на поверхности среды в секторе - в 2. Прогревают петлю в пламени и дают ей остыть.

г. Проводят петлей по поверхности среды в секторе 2, как показано, и затем наносят ею зигзагом штрихи на поверхности среды в секторе - г 3.

д. Инкубируют опрокинутые вверх дном чашки, как показано на рисунке, для того чтобы конденсирующаяся вода с крышки не попала на поверхность агара.

В секторе 1 вырастает большое число колоний, тогда как в секторах 2 и 3 появляются отдельные хорошо изолированные колонии.

Посев по методу Шукевича (для выделения подвижных бактерий)

Петлю с отобранным материалом вносят в пробирку со скошенным агаром, не касаясь стекла и агара, в конденсационную воду Рис.8 В, С, не распределяя материал по скосу агара. Пробирки помещают в термостат в вертикальном положении Д. Подвижные бактерии будут распространяться вверх по влажной поверхности скоса агара.

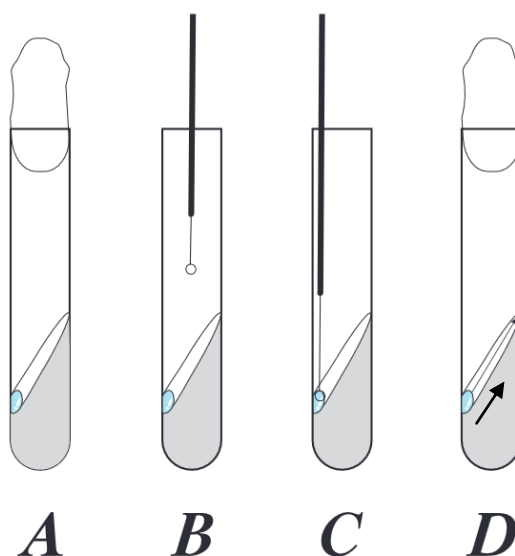


Рис. 8. Посев в каплю конденсированной воды по методу Шукевича

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.

Техника посева по Коху

Из материала, подлежащего посеву в толщу плотной питательной среды, готовят взвесь в стерильной водопроводной воде или в изотоническом растворе. Набирают 0,1—1 мл взвеси в пипетку (в зависимости от степени предполагаемого микробного загрязнения) и выливают в пустую стерильную чашку Петри.

Вслед за этим в чашку заливают 15 - 20 мл мясопептонного агара, расплавленного и остуженного до температуры 40 - 45°C. Вариант быстрой проверки готовности расплавленного застывающего агара - при такой температуре пробирка со средой, приложенная к щеке, не должна вызывать ощущения ожога.

Для равномерного распределения исследуемого материала в питательной среде закрытую чашку с содержимым слегка вращают по поверхности стола. После культивирования посевов производится подсчет колоний, выросших на поверхности и в глубине агара.

Техника посева бактерий по Дригальскому

Посев осуществляют стерильным шпателем (Рис.9 1) на три чашки Петри с плотной питательной средой (Рис. 9). На середину первой чашки пипеткой или бактериологической петлей вносят исследуемый материал, который распределяют по поверхности чашки круговыми движениями шпателя (Рис.9 2), вращая приоткрытую чашку левой рукой. Не стерилизуя, шпатель переносят во вторую, а затем в третью чашку, проводя распределение истощенного материала по их поверхности. На первой чашке

будет наблюдаться обильный рост микробов, на второй и третьей колоний будет меньше (Рис. 9 3).

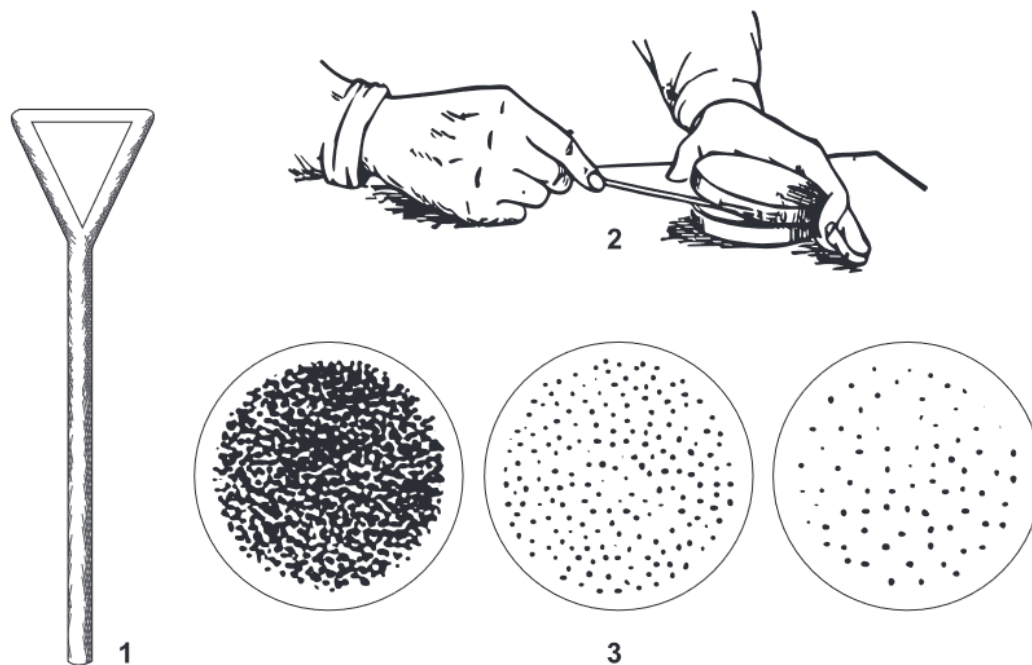


Рис. 9. Техника посева бактерий по Дригальскому.

Посев газоном.

На плотную питательную среду пипеткой наносят каплю материала и шпателем круговыми движениями растирают материал по поверхности среды. При обилии в засеваемом материале микробов они растут в виде пленки, покрывающей всю поверхность питательной среды. Такой характер микробного роста получил название сплошного, или газонного. Посев газоном производят, когда нужно получить большое количество микробной культуры (биомассы или количества клеток) одного вида.

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 с соблюдением правил асептики над пламенем горелки.

Техника посева в жидкую питательную среду

Посев в жидкую среду можно производить бактериологической петлей или пипеткой вблизи пламени горелки.

Обе пробирки держат в слегка наклонном положении, чтобы не замочить ватно-марлевые пробки. Петлю с микробным материалом опускают непосредственно в стерильную среду и ополаскивают. При внесении клеток, взятых петлей из плотной среды, материал тщательно растирают по стенке пробирки у верхнего края жидкой среды, все время смывая его средой.

Если материал вязкий и с петли не снимается, его растирают на стенке сосуда, а затем смывают жидкой средой.

Жидкий материал, набираемый в пастеровскую или градуированную пипетку, вливают в питательную среду.

Биологические методы культивирования

Это методы, основанные на биологических свойствах бактерий:

1) бактериостатический метод, основанный на различном действии некоторых химических веществ (например, 5% серная кислота быстро убивает большинство микробов, а микобактерии туберкулеза выживает в этих условиях) и антибиотиков на бактерии (например, небольшие концентрации пенициллина задерживает рост грамположительных бактерий и не влияет на грамотрицательные;

2) метод прогревания – при прогревании исследуемого материала при 80°C в течение 10-15 минут вегетативные формы бактерий погибают, а споры сохраняются;

3) метод обогащения – исследуемый материал засевают на элективные питательные среды, способствующие росту определенного вида микроорганизмов. Например, культивирование стафилококков на желточно-солевом агаре;

4) культивирование в организме лабораторных животных, например *Treponema pallidum* в яичках кролика.

Выделение чистой культуры бактерий

Чистая культура – популяция микроорганизмов одного вида.

Или чистыми культурами бактерий называют культуры, полученные из одной клетки.

В настоящее время используют понятие колониеобразующие единицы в единице объема (КОЕ / мл). На плотной питательной среде образуется колония из одной клетки - это и есть КОЕ. Данный метод подсчета является физиологическим методом оценки жизнеспособности и очень часто используется в микробиологии.

В природе микроорганизмы практически не встречаются чистые культуры микроорганизмов и они сосуществуют в смешанных популяциях. Исключениями являются культуры микроорганизмов, которые могут размножаться в экстремальных условиях

Выделение чистой культуры – основа бактериологического метода диагностики – золотого стандарта микробиологического исследования.

Выделение чистых культур аэробных бактерий включает 3 этапа

1. посев исследуемого материала с целью разобщения микробных клеток и получения изолированных колоний;

2. пересев колоний с целью накопления чистой культуры;

3. проверка чистоты выделенной культуры микробов и ее идентификация по морфологическим, тинкториальным, культуральным, биохимическим, антигенным свойствам, отношению к бактериофагу.

Для получения роста отдельных колоний исследуемый материал необходимо механически разобщить. Этому 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 этап посев исследуемого материала в целях получения отдельных колоний.

II этап 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 бактерии. После этого делают пересев на скошенный агар или чашку Петри для накопления чистой культуры.

III этап 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 этап 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°C на 24 ч.

Второй день исследования

Засеянные чашки вынимают из термостата и изучают выросшие роста колоний на питательной среде, т.е. их культуральные свойства.

Описание выросших колоний 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. 1).

Таблица 1. Пример формы таблицы для описания результатов культуральных свойств колонии

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

Изучение колоний позволяет определить их тип (S, R, SR).

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 приготавливаю 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 пересев выделенной культуры на кровяной агар, на поверхность которого помещают диски, пропитанные вышеназванными веществами.

Четвертый день исследования

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

Другие методы выделения чистых культур аэробных микроорганизмов.

Подразделяются на 2 группы:

а) методы, основанные на принципе механического разобщения микроорганизмов:

- *посев по методу Дригальского* осуществляется шпателем последовательно на 3 чашки с МПА. В зависимости от содержания

микробных клеток в исследуемом материале, на одной из чашек вырастают отдельные колонии, используемые для выделения чистой культуры микроорганизма;

- **рассев петлей (посев штрихами).** Исследуемый материал петлей засевают последовательно на 4 сектора МПА в чашке Петри, проводя петлей параллельные линии на расстоянии 5 мм одна от другой. На секторах с небольшим количеством клеток вырастают отдельные колонии, описываемые согласно таблице.

б) методы, основанные на биологических свойствах микроорганизмов:

- **метод фильтрации** основан на разделении микроорганизмов по величине путем пропускания исследуемого материала через специальные (миллиметровые) фильтры с определенным диаметром пор;

- **методы, основанные на «ползучих» свойствах микроорганизмов**, например, метод Шукевича для выделения чистой культуры протей. Исследуемый материал засевают в конденсационную воду скошенного МПА, из которой протей как бы «вползает» на его поверхность;

- **метод прогрева**, позволяющий отделить спорообразующие бациллы от неспоровых форм. Для этого исследуемый материал прогревают на водяной бане при 80⁰ С 10-15 мин., при этом вегетативные формы погибают, а споры сохраняются и прорастают;

- **бактериостатический метод** (метод ингибирования роста бактерий определенными химическими веществами или антибиотиками). Например, небольшие концентрации пенициллина задерживают рост грамположительных микроорганизмов, но не влияют на грамотрицательные. Смесь пенициллина и стрептомицина позволяет освободить грибы от бактериальной флоры, а нистатин ингибирует грибы, но не влияет на бактерии;

- **метод обогащения** - посев исследуемого материала засевают на элективные питательные среды, предназначенные для выделения определенного вида микроорганизмов;

- **метод заражения** чувствительных видов лабораторных животных или растений для выделения облигатных патогенных микроорганизмов. После появления у зараженных животных признаков болезни их умерщвляют и производят посев органов и тканей на питательные среды с целью выделения чистой культуры микроорганизмов.

При выделении чистых культур можно использовать методы, основанные не только на механическом разобщении, но и на различии их биологических свойств (метод Шукевича, использование элективных 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.

Культивирование анаэробов

Культивирование анаэробных микроорганизмов сложнее, чем культивирование аэробов, поскольку контакт микроорганизмов с молекулярным кислородом должен быть сведен к минимуму.

Для создания анаэробных условий используются различные методы:

- физические,
- химические
- биологические методы.

Все они основаны на культивировании микроорганизмов в условиях изолированного пространства.

Принципы культивирования облигатно-анаэробных микроорганизмов

1. Забор материала в строго анаэробных условиях (из глубины очага поражения при его вскрытии или пунктировании; кровь засевают во флаконы со средой для анаэробов, не вскрывая их (прокалывая шприцем с кровью резиновую пробку)

2. Использование транспортных сред, предотвращающих токсическое действие кислорода и бескислородных газовых смесей при транспортировке

3. Применение специальных сред для культивирования с добавлением факторов роста (дрожжевой экстракт (0,5%), витамин К, гемин, бараньи эритроциты, лошадиная сыворотка, твин-80, аргинин и др.) и селективных ингибирующих добавок (антибиотики аминогликозиды), имеющих низкий окислительно-восстановительный потенциал.

4. Для культивирования анаэробов необходимо создать с помощью физических, химических и биологических методов условия анаэробноза - пониженного содержания кислорода в среде и окружающем ее пространстве.

Методы выделения чистых культур облигатно-анаэробных микроорганизмов

Физические методы:

• *выращивание анаэробов в высоком столбике питательной среды* после удаления из неё растворенного кислорода длительным кипячением. Среду быстро охлаждают, засевают материал, столбик среды заливают стерильным вазелиновым маслом или парафином. Пробирку закрывают резиновой пробкой.

• *механическое удаление воздуха* из сосудов, в которых выращиваются анаэробные микроорганизмы – анаэроостатов (рис. 33, приложение), с

помощью разрежающих насосов. Анаэроустат представляет собой цилиндр из ударопрочного полимерного материала или металла с хорошо притертой крышкой, снабженный отводящим краном и вакуумметром. После размещения засеянных чашек или пробирок воздух из анаэроустата удаляют с помощью вакуумного насоса;

• **посев в среды, содержащие и легко окисляемые вещества**, которые связывают растворенный в среде кислород. С целью уменьшения содержания кислорода в питательной среде, ее перед посевом кипятят 10—15 мин, затем быстро охлаждают, после чего заливают небольшим количеством стерильного вазелинового масла. Легко окисляемыми веществами являются глюкоза, лактоза и др. Лучшей жидкой питательной средой с редуцирующими веществами является среда Китта — Тароцци, которая с успехом используется для накопления анаэробов при первичном посеве из исследуемого материала и для поддержания роста выделенной чистой культуры анаэробов;

• **посев микроорганизмов в глубину плотных питательных сред** производят по способу Виньяль — Вейона (рис. 7), который состоит в механической защите посевов анаэробов от кислорода воздуха. Для этого берут стеклянную трубку длиной 30 см и диаметром 3—6 мм. Один конец трубки вытягивают в капилляр в виде пастеровской пипетки, а у другого конца делают перетяжку. В оставшийся широкий конец трубки вставляют ватную пробку. В пробирки с расплавленным и охлажденным до 50° С питательным агаром засевают исследуемый материал. Затем насасывают засеянный агар в стерильные трубки Виньяль — Вейона. Капиллярный конец трубки запаивают в пламени горелки и трубки помещают в термостат. Для выделения отдельной колонии трубку надрезают напильником, соблюдая правила асептики, на уровне колонии ломают, а колонию захватывают стерильной петлей и переносят в пробирку с питательной средой для дальнейшего выращивания и изучения в чистом виде;

• **замена воздуха в анаэростатах или эксикаторах индифферентным газом** (азотом, водородом, аргоном, углекислым газом) путем вытеснения его газом из баллона.

• **газогенерирующие системы GasPak** (BD Biosciences, рис. 42,43, 44; приложение), работающие без вакуумных насосов, газовых баллонов, манометров и выпускных клапанов. Представляет собой безводную, свободную от катализаторов, удобную в использовании систему, совместимую с оригинальными герметизируемыми газогенерирующими контейнерами и оригинальными пакетами, позволяя создавать в течение 24 часов оптимальные условия для культивирования анаэробных, микроаэрофильных или капнофильных бактерий. Одноразовый пакет для генерации водорода модифицирован с добавлением возможности продукции диоксида углерода и снабжен внутренним катализатором. Пакет содержит неорганический карбонат, активированный уголь, аскорбиновую кислоту и воду. При извлечении пакета из наружной оболочки он активируется под действием воздуха. Активированный пакет с реагентами и образцы помещают в герметизируемый мешок (анаэростат) или контейнер и герметизируют. Пакет быстро снижает содержание кислорода внутри мешка; одновременно из неорганического карбоната образуется диоксид углерода.

Методы, обеспечивающие анаэробные условия:

- кипячение питательной среды - регенерация;
- посев в высокий столбик агара;
- заполнение среды вазелиновым маслом для уменьшения доступа O_2 .

Для культивирования анаэробов необходимо использовать:

- герметично закрытые сосуды и лабораторная посуда, заполненная инертным газом;
- десикаторы с горящей свечой;
- специальное оборудование для создания анаэробных условий;

- простая и эффективная система "Gazpak", способная химическим путём обеспечивать постоянство газовой смеси с помощью герметичных контейнеров.

К физическим методам создания анаэробных условий относится культивирование в анаэроостате (Рис. 10) - вакуумного аппарата для выращивания микроорганизмов, в котором воздух либо полностью удален, либо заменен газовой смесью. Наиболее часто используемая смесь имеет следующий состав: азот 5% CO₂ и 10% H₂, хотя возможно использовать и обычный природный газ из баллонов для удобства использования и безопасности.



Рис. 10. Анаэроостат для культивирования анаэробов готовый для постановки в термостат. Чашки Петри с посевами находятся на специальной площадке, чтобы их было удобно достать из емкости.

Химические методы создания анаэробных условий

К ним относятся использование химических веществ, поглощающих молекулярный кислород. В лабораторной практике в качестве поглотителей молекулярного кислорода используют щелочной раствор пирогаллола, дитионит натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), металлическое железо, хлорид моновалентной меди и некоторые другие реагенты.

Использование восстановителей, которые добавляются в большинство сред для снижения окислительно-восстановительного потенциала среды: тиогликолят натрия, цистеин, аскорбиновая кислота.

Для контроля устранения кислорода воздуха и правильности культивирования анаэробных микроорганизмов, в том числе и бактерий, используют редокс-индикаторы.

Редокс-индикаторы - это вещества, которые меняют окраску при изменении окислительно-восстановительного потенциала.

Например, резазурин, имеющий синий цвет в окисленном состоянии, а при восстановлении превращается сначала в розовый резозурин (повышение потенциала указывает на присутствие кислорода), а затем - в бесцветный гидрорезозурин.

Окислительно-восстановительные индикаторы можно добавлять непосредственно в питательную среду или помещать в микроанатомическую среду в виде индикаторных полосок, содержащих эти вещества.

Примером **биологического метода создания анаэробных условий** является совместное культивирование с аэробными или факультативно-анаэробными бактериями.

Так, например, на Рис. 11. можно увидеть выполнение **метода Фортнера** - питательная среда в чашке Петри делится желобком на две половины, одна половина засеивается аэробными микроорганизмами, другая - анаэробными. По краям чашка Петри заполняется парафином для

предотвращения попадания внутрь ее кислорода воздуха. Рост анаэробных микроорганизмов начнется только после полного использования кислорода аэробными микроорганизмами.

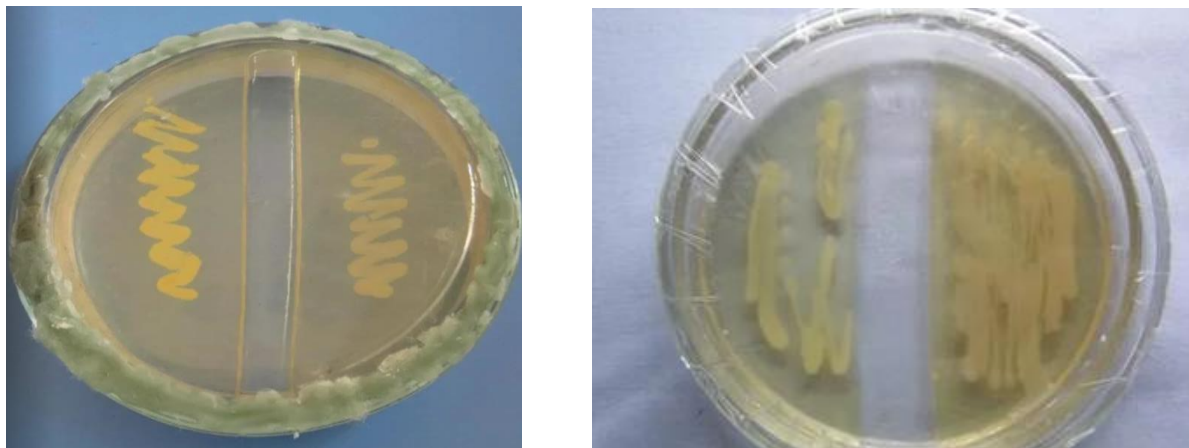


Рис. 11. Метод Фортнера для культивирования анаэробов биологическим методом.

Для культивирования анаэробных бактерий используются и другие методы, ограничивающие доступ воздуха к растущей культуре:

- выращивание в высоком слое среды;
- выращивание в плотной среде;
- культивирование в вязкой среде, в условиях которой диффузия молекулярного кислорода в жидкости уменьшается с увеличением плотности;
- заполнение среды высоким слоем стерильного вазелинового масла или парафина.

Методы выделения чистых культур анаэробов

Существует несколько подходов к получению чистых культур анаэробных бактерий – и значимыми из них являются метод Цейслера и метод Вайнберга.

Метод Цейслера

Испытуемый материал засеивается штриховыми движениями на плотную поверхность среды. Создаются анаэробные условия. И затем посеvy выдерживаются при температуре 37°C в течение 24-72 часа. Изолированные анаэробные колонии пересеивают на среду контроля стерильности или среду Китта-Тароцци.

Метод Вейнберга

Несколько капель исследуемого материала вносят в пробирку, содержащую 45 мл изотонического раствора. Перемешивают герметичным капилляром и переносят в пробирку с сахарным агаром, охлажденным до 45-50 градусов С, разлитым высоким столбиком. После перемешивания еще две пробирки засеивают тем же капилляром на сахарный агар и быстро охлаждают под проточной водой. Выросшие в глубине пробирки колонии переносят на сахарный агар или среду Китта-Тароцци.

Метод Перетца

Приготовьте разведение материала, как указано выше по методу Вайнберга. Пробирки с соответствующим разведением наливают в чашку Петри, на дне которой на двух пробковых палочках стоит стеклянная пластина 6x6см. Среду заливают так, чтобы она заполнила пространство между пластиной и дном чашки. При появлении роста пластину поднимают и повторно засеивают чистые колонии.

Метод Виньяль - Вейона в глубину плотной среды

Берут стеклянную трубку длиной 30 см и диаметром 3-6 мм. Один конец трубки необходимо втянуть в капилляр в виде пипетки Пастера, а на другом конце сделать затяжку. В оставшийся широкий конец трубки вставляется ватная пробка.

Для культивирования микроорганизмов, особенно требовательных к анаэробным условиям (например, *Faecalibacterium prausnitzii*),

используются **пробирки Хангейта** (Рис.12), которые закрываются завинчивающимися пластиковыми крышками со вставкой из бутилкаучука. Специальная завинчивающаяся крышка плотно прижимает перегородку и предотвращает проникновение кислорода из окружающей среды в пробирку во время автоклавирования и культивирования. Материал пробирок - боросиликатное стекло.

Стандартная процедура работы с пробирками Хангейта:

- плотно закрыть пробирку пробкой (перегородкой) и завинчивающейся крышкой и поместить в автоклав;
- после автоклавирования произвести посев с помощью шприца;
- Для этого в расплавленную среду с агаром засевают бактерии при постоянном токе через пробирку с инертного газа, выделяющегося из примеси кислорода.
- Затем пробирку закрывают резиновой пробкой и помещают горизонтально в зажим, который ее вращает, при этом среда равномерно распределяется по стенкам пробирки и застывает тонким слоем.
- инкубировать пробирки необходимо при определенной температуре.



Рис. 12. Культиватор с вращающимися роликами для пробирок Хангейта

Схема изоляции чистой культуры облигатных анаэробов.

Взятие исследуемого материала осуществляется с помощью шприца с притертым поршнем, после чего материал вводится в пробирку с транспортной средой.

Изоляция чистой культуры проводится при строгом соблюдении анаэробных условий на всех этапах исследования.

Этап 1 - получение изолированных колоний.

Приготавливается несколько разведений исследуемого материала и выполняют посев на чашки Петри со средой кровяной агар (КА) или другой питательной средой для культивирования анаэробов.

Этап 2 - получение чистой культуры анаэробов.

На этом этапе изучаются морфологические и культуральные свойства выращенных колоний. Параллельно проводят посеvy каждой выделенной колонии в две чашки Петри с питательной средой, например, КА. Одна чашка инкубируется в аэробных условиях, другая - в анаэробных. Для дальнейшего исследования отбирают культуры, выросшие только в анаэробных условиях (таким образом, исключаются факультативные анаэробы).

Этап 3 - идентификация отобранных облигатных анаэробов.

Биохимическая идентификация проводится в системе Microtest, например, AR1-20A. Суспензию отобранной культуры засевают на пластину с набором биохимических тестов, инкубируют в анаэробных условиях в течение 48 часов, учитывают биохимические свойства культуры по изменению цвета индикаторов системы и определяют ее родовую и/или видовую принадлежность.

Классификация процессов (методов) культивирования микроорганизмов

Выбор процесса культивирования зависит не только от потребностей организма, но и от того, для чего впоследствии будет использована культура, т.е., от конечной цели эксперимента. Известно много процессов культивирования микроорганизмов.

Они различаются по:

- 1) состоянию питательной среды (поверхностные и глубинные);
- 2) наличию или отсутствию перемешивания (динамические или статические);
- 3) содержанию кислорода (аэробные или анаэробные);
- 4) способу действия (закрытые, чаще периодические, и открытые, чаще непрерывные);
- 5) количеству ферментеров (одно-, дву- и многостадийные);
- 6) способу управления (хеостатные, турбидостатные, оксигеностатные, рН-статные и другие).

Культуры микроорганизмов можно подразделять на открытые и закрытые системы.

Открытая система – это система, в которую все компоненты могут поступать или покидать ее.

Простая периодическая культура, содержащая ограниченное первоначальное количество питательного субстрата, служит примером закрытой системы. В закрытой системе скорость роста биомассы должна стремиться к нулю либо из-за недостатка субстрата, либо из-за непереносимости токсичного продукта при его дальнейшем накоплении.

Следовательно, такие системы находятся в неустойчивом состоянии. В отличие от этого в открытых системах всегда есть возможность установления стабильного состояния.

Закрытая система – это система, в которой хотя бы один из существующих компонентов не может ни поступать в систему, ни покидать ее. Следовательно, все непрерывные культуры, в которых происходит, с одной стороны, приток питательной среды, с другой – отток биомассы и других продуктов, являются открытыми системами.

Периодическое культивирование

Периодический метод культивирования предусматривает внесение посевного материала в питательную среду (инокуляция клетками среды) в начале процесса и получение культуры по достижении заданной фазы развития популяции.

Концентрация микроорганизмов в периодической культуре нарастает и останавливается либо из-за лимитирования субстратом, либо из-за ингибирования токсичными продуктами жизнедеятельности. Для этого типа культивирования характерно непрерывное изменение физиологического состояния клеток, вызванное изменениями условий, производимыми жизнедеятельностью самих клеток. Отсюда следует, что периодическая система может поддерживать размножение клеток только в течение ограниченного времени. После фазы экспоненциального (логарифмического) роста популяция начинает испытывать недостаток элементов питания и угнетается продуктами метаболизма, что ведет к нарушению физиологического состояния клеток. Периодические культуры находятся в неустойчивом состоянии, что является серьезным недостатком, особенно когда их применяют при изучении свойств микроорганизмов.

Практически все системы периодического культивирования являются закрытыми, поскольку микроорганизмы в них размножаются и, проходя все

фазы развития без притока питательной среды и оттока культуральной жидкости, осуществляют только газообмен с окружающей средой.

При изучении динамики роста культур микроорганизмов необходимо строго соблюдать некоторые условия:

- 1) жизнеспособность засева;
- 2) наличие в среде культивирования всех необходимых питательных веществ;
- 3) отсутствие в среде ингибиторов, подавляющих рост клеток;
- 4) поддержание в среде оптимальными всех физико-химических условий.

Микроорганизмы при периодическом культивировании выращиваются как на жидкой питательной среде, так и на агаризованной питательной среде в чашках Петри.

Обмен веществами с окружающей средой возможен только через газовую фазу. Периодическое культивирование (периодические культуры) – это метод культивирования микроорганизмов, при котором рост и размножение клеток происходит в циклическом режиме. Это означает, что культура растет, достигает определенного максимума, затем рост задерживается и потом прекращается, а после добавления питательных компонентов в емкость культивирования или переноса клеток из нее в новую среду обитания начинается новый цикл роста.

Этот метод используется чрезвычайно широко в различных областях микробиологии и, пожалуй, является исторически самым первым в процессах культивирования микроорганизмов. Данный метод периодического культивирования очень часто используется при изучении микроорганизмов, позволяя получить чистые культуры отдельных микроорганизмов из смеси множества других, находящихся одновременно в ограниченном жизненном пространстве.

Одной из разновидностей данного метода можно назвать **рост микроорганизмов в иммобилизованных культурах**. В этом случае микроорганизмы вырастают в виде мелких шариков или нитей внутри жидкой питательной среды или сред с присутствием различного рода уплотнителей (агар-агар, каррагенан, пектин, крахмал, полиакриламидный гель и многие другие). Этот метод позволяет изучать метаболизм и другие процессы внутри клеток, получать биологически активные продукты их метаболизма.

Кроме того, периодическое культивирование на богатых питательных средах (плотных и жидких) дают возможность обеспечить оптимальные условия для роста и размножения, что используется при производстве антибиотиков и других биологически активных соединений (ферментов, витаминов, органических кислот и многих других полезных для человека продуктов), которые широко используются в пищевой и фармацевтической промышленности.

Периодическое культивирование имеет ряд преимуществ перед непрерывным культивированием:

1. Увеличение выхода продукции (в частности, накопление метаболитов, например, таких как антибиотики).
2. Снижение затрат на оборудование и энергию.
3. Возможность управления скоростью роста и продукцией с помощью различных факторов, таких как температура, рН, концентрация питательных веществ, и т.д.

Однако периодическое культивирование также имеет свои недостатки:

1. Необходимость точного контроля и управления условиями культивирования для достижения оптимальных результатов.
2. Ограниченная масштабируемость (воспроизведение развивающихся популяций микробов от малых до больших объемах питательной среды), так

как не все условия процесса культивирования могут быть легко воспроизведены повторно при этом.

3. Риск накопления побочных продуктов, которые могут повлиять на качество продукции.

Для периодического культивирования используются различные методы, включая ферментацию, выращивание в ферментных реакторах (биореакторах) для получения клеток (биомассы) и т.д. Важными параметрами для периодического культивирования являются скорость роста, выход продукции, стабильность и устойчивость к факторам окружающей среды.

Таким образом, периодическое культивирование является эффективным методом для получения большого количества продукции от микроорганизмов. Однако, для достижения оптимальных результатов необходимо контролировать условия культивирования и управлять ими, а также учитывать возможные побочные эффекты и ограничения масштабирования.

Попытки управляемого культивирования проводились ранее и продолжают разрабатываться в настоящее время, поскольку сейчас с развитием ИИ, уменьшением размеров (минитюаризацией) и повышением чувствительности различных датчиков становится гораздо значительно легче отслеживать и управлять развитием периодической культуры в режиме реального времени.

Глубинное периодическое культивирование

Для выращивания больших количеств микроорганизмов способом периодического культивирования наиболее часто применяется глубинное выращивание в ферментере с принудительной аэрацией и перемешиванием.

Глубинное культивирование в ферментерах по сравнению со статическим и поверхностным ускорило рост и развитие микроорганизмов за счет устранения «голодной зоны» вокруг микробной клетки и позволило получать гомогенную культуру. Клетки в такой системе равномерно распределены по всему объему ферментера и в каждый момент времени находятся в одинаковых условиях, т. е. питательные субстраты и продукты метаболизма распределены также равномерно. Это смещение особенно важно для изучения процессов роста и развития микробной популяции в целом.

Применение динамических глубинных систем культивирования позволило более рационально получать не только биомассу и эндометаболиты, но и экзопродукты микробного синтеза, выделяемые клеткой в окружающую среду.

Глубинное периодическое культивирование в жидких питательных средах даже без перемешивания позволили избежать недостатков, связанных с примесями агара в смываемой суспензии, и увеличили выход процесса за счет использования больших емкостей для культивирования (бутыли, ферментеры). Применение же для культивирования клеток жидких питательных сред с принудительным перемешиванием культуры с целью выравнивания условий роста в различных частях рабочего объема культивационного сосуда привело к появлению динамических систем глубинного культивирования, оснащенных специальным оборудованием.

Для выращивания больших количеств микроорганизмов способом периодического культивирования наиболее часто применяется глубинное выращивание в ферментере с принудительной аэрацией и перемешиванием.

Глубинное культивирование в ферментерах по сравнению со статическим и поверхностным ускорило рост и развитие микроорганизмов за счет устранения «голодной зоны» вокруг микробной клетки и позволило получать гомогенную культуру «идеального смешения». Клетки в такой

системе равномерно распределены по объему ферментера и в каждый момент времени находятся в одинаковых условиях, т. е. питательные субстраты и продукты метаболизма распределены также равномерно. «Идеальное смешение» особенно важно для изучения процессов роста и развития микробной популяции в целом.

Применение динамических глубинных систем культивирования позволило более рационально получать не только биомассу и эндометаболиты, но и экзопродукты микробного синтеза, выделяемые клеткой в окружающую среду.

Получивший первоначальное распространение в производстве дрожжей и антибиотиков в дальнейшем метод глубинного культивирования зарекомендовал себя как наиболее пригодный для промышленного и лабораторного выращивания микроорганизмов.

Периодические процессы культивирования находят применение в технической микробиологии при получении продуктов второй фазы роста и при культивировании патогенных бактерий в производстве вакцин и анатоксинов.

Дальнейшее усовершенствование процесса глубинного культивирования было направлено на разработку систем контроля условий культивирования.

Продленное периодическое культивирование

Продленный периодический процесс культивирования, как и периодический, предусматривает одноразовую загрузку и разгрузку ферментера. Однако цикл развития микроорганизмов в продленном периодическом процессе удлиняется либо за счет подпитки (периодической или непрерывной), либо за счет длительного удержания клеток в системе (диализная культура).

В периодической культуре, как известно, постепенно накапливаются продукты метаболизма, которые приостанавливают рост. Для увеличения выхода продуктов или с целью повышения концентрации биомассы применяют процесс диализа. Суть этого метода заключается в том, что культура развивается в пространстве, ограниченном полупроницаемой мембраной, а продукты диффундируют во внешний раствор.

К продленным периодическим процессам можно отнести культивирование микроорганизмов в диализной системе с протоком среды, поскольку проток удлиняет период роста и развития микробной популяции, но система не является непрерывной из-за отсутствия оттока биомассы. В диализной системе с протоком среды общая биомасса увеличивается до тех пор, пока плотность культуры не станет такой, что дальнейшее перемешивание биомассы будет невозможным. Таким образом, метод дает возможность выращивать культуру до достижения высокой плотности биомассы.

Многоциклическое культивирование

Многоциклическими процессами культивирования называют такие, в которых цикл выращивания культуры повторяется многократно без многократной стерилизации емкости.

Многоциклическое культивирование можно вести в одном ферментере, многократно повторяя полный цикл развития культуры без перерыва на стерилизацию. В одном ферментере можно повторять и укороченный цикл, заканчивая его, например, экспоненциальной фазой роста.

Процессы, осуществляемые в одном ферментере, называются одностадийными. Возможны и многостадийные многоциклические процессы, основанные на принципе повторного и последовательного периодического культивирования, протекающего в нескольких ферментерах, соединенных в «батарею», с целью длительного использования культуры.

Существует несколько вариантов многоциклического многостадийного культивирования. Один из них заключается в следующем: культура выращивается в одном реакторе; в то время, когда она проходит в своем развитии экспоненциальную фазу, из нее берется инокулят для засева следующего реактора. В первом реакторе культура доращивается до необходимой фазы роста. Когда культура во втором реакторе достигает экспоненциальной фазы, из нее также делается пересев в третий реактор и т. д. Поскольку культура все время пересеивается в экспоненциальной фазе, не происходит ее старения и вырождения. Кроме того, отмечается выигрыш во времени, так как одновременно работают несколько ферментеров.

Многоциклические процессы культивирования микроорганизмов применяют, для получения биомассы и продуктов микробного синтеза – токсинов, антибиотиков, внеклеточных ферментов, аминокислот. Применение подобного метода позволяет сократить в несколько раз затраты труда на производство продукта по сравнению с получением его периодическим способом.

Полунепрерывное культивирование

В полунепрерывных системах полная загрузка и разгрузка ферментера осуществляются однократно, однако в процессе роста культуры часть ее сливается, а освободившийся объем заливается свежей питательной средой. Таким образом, функционирует сливно-доливная система. Следовательно, полунепрерывное культивирование характеризуется частотой и объемом сливаемой выросшей культуры и добавлением свежей питательной среды в рабочую емкость ферментера.

Установившиеся режимы полунепрерывного культивирования характеризуются колебанием концентрации микроорганизмов около одной и той же постоянной величины и постоянством средней удельной скорости роста популяции.

Непрерывное культивирование

В отличие от периодического культивирования в непрерывных процессах питательная среда подается непрерывно, удаление биомассы и продуктов ее жизнедеятельности также осуществляется непрерывно.

Установившиеся режимы непрерывного культивирования характеризуются постоянством концентрации микроорганизмов и удельной скорости роста популяции.

Непрерывное культивирование проводится в открытой динамической системе, которая может быть как гомогенной, так и гетерогенной. Эта система способна к длительной работе в постоянном установившемся режиме.

Гомогенные системы идеального смешения. В системе идеального смешения микроорганизмы растут в культуральной среде, постоянной по своему составу, и, следовательно, в каждый данный момент времени находятся в одном и том же физиологическом состоянии, т. е. в состоянии установившегося динамического равновесия.

По количеству ферментеров (стадий, ступеней) гомогенные системы могут быть одностадийными, двухстадийными и многостадийными.

Основным аппаратом для выращивания непрерывной гомогенной культуры является ферментер идеального смешения с устройством для потока среды и слива культуры, поддерживающим постоянный уровень среды. Концентрация всех продуктов внутри ферментера и в вытекающей жидкости одинакова, а скорость разбавления равна удельной скорости роста в состоянии установившегося равновесия.

Любой периодический процесс культивирования можно перевести в непрерывно-проточный. Непрерывно-проточное культивирование открывает возможности для поддержания постоянных условий роста путем создания такого состава питательной среды, чтобы только один желаемый фактор

лимитировал рост. Если в таком процессе плотность популяции определяется химическим составом среды (концентрацией лимитирующего рост фактора), его называют **хемотратным культивированием** (Рис. 13).

Хемотратное культивирование – это поддержание постоянства химического состава среды внутри ферментера в процессе культивирования микроорганизмов.

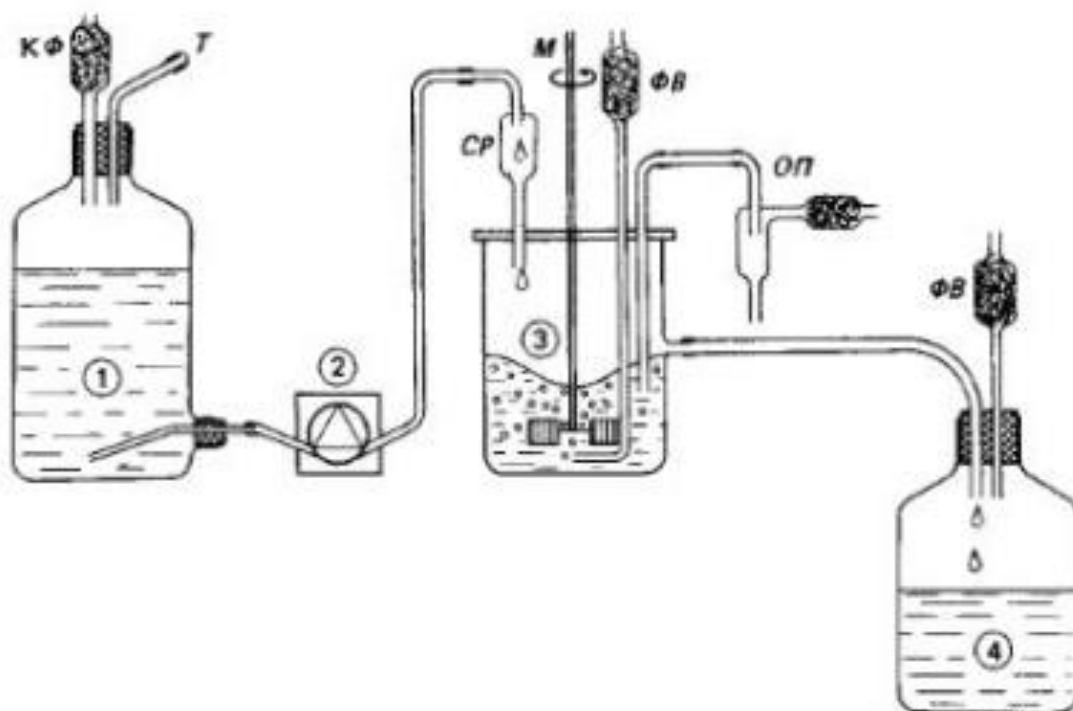


Рис. 13. Принцип непрерывной культуры в хемотрате: 1 - сосуд с питательной средой, снабженный компенсационным фильтром (КФ) и трубкой для дозирования (Т); 2 - перистальтический насос; 3 - хемотрат с притоком питательной среды (СР), мешалкой (М), фильтром для воздуха (ФВ) и приспособлением для отбора проб (ОП); 4 - приемный сосуд с фильтром для выходящего воздуха (ФВ).

Хемостат состоит из сосуда-культиватора, в который из особого резервуара поступает с постоянной скоростью питательный раствор определенного химического состава. Благодаря аэрации и механическому перемешиванию в культиваторе создаются оптимальные условия для снабжения клеток кислородом и для более быстрого и равномерного распределения питательных веществ, поступающих с новыми порциями раствора. По мере поступления в культиватор новых порций питательного раствора из него вытекает бактериальная суспензия.

Обозначим объем сосуда через V (литров). а скорость поступления питательного раствора - скорость притока-через f (литров в час); тогда скорость разведения D будет равна f/V . Величина D , таким образом, отражает объем жидкости, сменяемый за 1 ч. Если бы при запуске хемостата бактерии, находящиеся в культиваторе (x [г/л]), не росли, то они просто вымывались бы из сосуда и скорость вымывания была бы равна -

$$D * x = - dx/dt.$$

Плотность бактериальной суспензии в сосуде снижалась бы в этом случае экспоненциально: $x = x_0 * e^{-Dt}$. Бактерии в культиваторе тоже растут экспоненциально. Скорость прироста определяется выражением $\mu x = dx/dt$, т.е. экспоненциально увеличивается и плотность бактериальной суспензии:

$$x = x_0 * e^{\mu t}$$

Следовательно, скорость изменения плотности суспензии в сосуде dx/dt равна алгебраической сумме величин μx и $- Dx$:

$$dx/dt = \mu x - Dx$$

Если скорость роста μ и скорость разбавления D равны, то потеря результате вымывания клеток и прирост биомассы уравновешивают друг друга, т. е. изменение равно нулю и плотность бактериальной суспензии x

остаётся постоянной. Культура оказывается при этом в состоянии динамического равновесия. Экспоненциальное размножение клеток компенсируется другим экспоненциальным процессом, ведущим к уменьшению их числа.

Рост культуры в хемостате контролируется концентрацией субстратов. На таком ограничении скорости роста концентрацией одного из необходимых субстратов (донора электронов, источника азота, серы или фосфора) основана стабильность системы. Если вследствие этого ограничения истинная скорость роста μ оказывается меньше $\mu_{\text{макс}}$ (максимальной скорости, достижимой при насыщении субстратом), то скорость разбавления D можно менять в широких пределах без того, чтобы это привело к снижению плотности суспензии.

Изменяя концентрацию лимитирующего рост фактора, можно изменять плотность популяции. Изменяя скорость разбавления, можно получать режимы, обеспечивающие различную скорость роста популяции. При медленном протоке среды, т. е. при медленном росте, культура испытывает сильную лимитацию, глубокое голодание по данному субстрату. При быстром протоке среды, т. е. при быстром росте, степень голодания слабая, приближающаяся к условиям экспоненциального роста.

Хемостатное культивирование представляет собой саморегулирующуюся систему, простую в работе: если скорость притока питательной среды в хемостат достаточно долго остаётся постоянной, т.е. работа хемостата регулируется в большей степени автоматически.

Хемостат имеет аналоги в природе. Аналогия заключается в том, что подобные устройства – это открытые непрерывные системы, через которые постоянно идут потоки энергии и веществ.

Поэтому при непрерывном культивировании в лаборатории можно моделировать природные условия (например, в водоеме, в пищеварительном тракте), что поможет изучению вопросов экологии. При этом за короткое

время можно наблюдать явления, происходящие в природе длительное время, и выявить экологические закономерности.

Хемостатный метод культивирования в строго контролируемых условиях химического состава питательной среды является одним из основных для изучения физиологии, биохимии и вообще всех свойств микробных клеток и культур.

Несмотря на частое использование хемостатного метода культивирования микроорганизмов этот метод далеко не единственный, который позволяет получить большое количество биомассы или различных метаболитов (антибиотиков, витаминов, аминокислот и других биологически активных веществ) из среды культивирования микроорганизмов после отделения клеток.

Хотя теоретически взаимосвязь между концентрацией биомассы и скоростью разбавления подчиняется одним и тем же закономерностям в начале культивирования популяций микроорганизмов в хемостате и турбидостате, тем не менее методы управления процессами культивирования для данных методов различны.

Турбидостатный метод культивирования микроорганизмов

Другой широко известный принцип управления процессом культивирования микроорганизмов, в том числе и бактерий – это **турбидостатное культивирование**. Турбидостат (Рис. 14) - это устройство, которое позволяет регулировать количество кислорода, питательных веществ и других факторов в питательной среде. Он состоит из емкости, в которую помещается питательная среда, и системы контроля, которая регулирует параметры среды. В нем подача питательной среды осуществляется по команде фотоэлектрического элемента, регистрирующего оптическую плотность культуры.

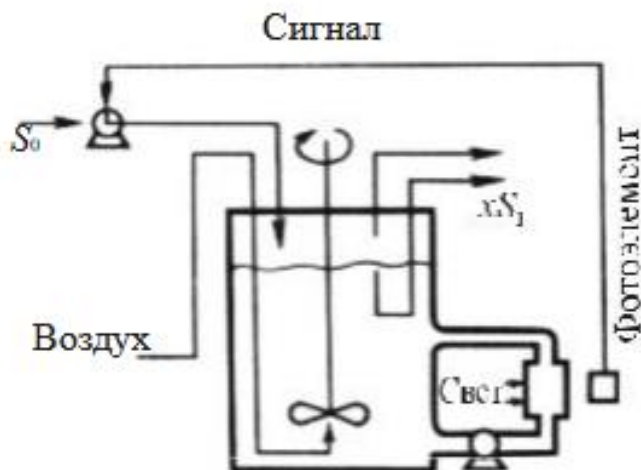


Рис. 14. Принцип получения непрерывной культуры в турбидостате:

S_0 – концентрация субстрата в подаваемой среде; S_1 – концентрация субстрата в вытекающей культуре; X – концентрация клеток

Скорость разбавления устанавливается в соответствии с заданной плотностью популяции, которая определяется целесообразностью сохранять такой темп воспроизведения клеток культивируемой популяции.

Этим турбидостат отличается от хемостата, в котором фиксируется химическое постоянство компонентов питательной среды внутри ферментера, которое регулируется поступлением количества питательных компонентов, определяющих концентрацию биомассы культивируемых микроорганизмов.

Таким образом, культивирование бактерий методом турбидостата - это процесс выращивания бактерий в реологически контролируемой среде, при которой поддерживается постоянный проток питательной среды через ферментер. Культивирование микроорганизмов проходит при поддержании постоянного количества кислорода и питательных веществ на максимуме возможностей по количеству клеток развивающейся культуры.

Метод турбидостатного культивирования позволяет получать стабильные и однородные культуры бактерий по своим характеристикам, что важно для многих научных исследований и производственных процессов, что упрощает анализ и обработку получаемых данных и способствует большему выходу метаболитов, интересующих человека.

Одним из основных преимуществ метода турбидостата является возможность быстрого роста культур. Это особенно важно при проведении экспериментов и тестировании новых штаммов бактерий. Кроме того, турбидостат позволяет контролировать условия культивирования и регулировать их в зависимости от потребностей эксперимента. Например, можно изменять концентрацию питательных веществ, температуру, рН среды и т.д.

Турбидостат позволяет получать скорости роста, равные максимальной скорости, которые применяются при изучении культур, фиксированных в стадии экспоненциального роста. Хемостаты же применяют при скоростях разбавления от самой низкой до максимальной и одновременно с этим удельной скорости роста, которая может стареиться к максимальной. Поскольку в турбидостате скорость роста не фиксирована, при избытке субстрата и постоянных условиях среды в культуре могут отбираться быстро растущие мутанты. Турбидостат также может использоваться для получения мутантов, более устойчивых к ингибирующим рост факторам.

В случае длительного культивирования применение турбидостата связано с определенными трудностями, обусловленными прилипанием клеток к поверхности оптического элемента.

В настоящее время разработаны различные варианты непрерывного культивирования микроорганизмов, работающие по принципу турбидостата – рН-стат, оксистат, СО₂-стат, теплостат, вискозистат и т. д., названия которых соответствуют задаваемому параметру. Любой параметр, который

изменяется в периодической культуре и на который существует датчик, может быть использован для управления ростом по типу турбидостата.

Необходимо отметить, что управляющими параметрами могут быть комплексные параметры, например содержание кислорода и углекислоты в отходящем воздухе, характеризующее дыхательный коэффициент.

Таким образом, культивирование микроорганизмов методом турбидостата является эффективным методом получения качественных и стабильных культур микроорганизмов для научных исследований, производства и других целей.

Однако, метод турбидостатного культивирования требует использования специального оборудования и знаний в области микробиологии. Кроме того, некоторые штаммы бактерий могут быть менее устойчивыми к условиям культивирования, поэтому перед началом эксперимента необходимо провести тестирование микроорганизмов на возможность использования данного метода для конкретной культуры микроорганизмов.

В целом турбидостатное культивирование до начала его использования с конкретным штаммом микроорганизмов должно пройти экспертную оценку по нескольким важным параметрам:

1. Оценка необходимости использования турбидостата:

– Определение оптимальной конструкции турбидостата для его применения в культивировании конкретного вида микроорганизмов (бактерий).

– Цель метода культивирования бактерий на турбидостате (получение биомассы, либо получение метаболитов).

2. Подготовка среды:

– Выбор подходящей среды для культивирования бактерий.

– Подготовка среды путем добавления необходимых компонентов (например, питательных веществ, антибиотиков и т.д.).

3. Выбор и подготовка бактерий:

– Подбор подходящей культуры бактерий для данного метода.

– Разведение бактерий до нужной концентрации.

4. Установка турбидостата:

– Подключение турбидостата к питательной среде.

– Настройка параметров турбидостата (например, скорость подачи воздуха, температура и т.д.) в соответствии с требованиями метода.

5. Культивирование бактерий:

– Начало культивирования бактерий при заданных параметрах турбидостата.

– Мониторинг роста бактерий и оценка их роста в течение времени.

6. Анализ результатов:

– Оценка количества выросших бактерий.

– Изучение свойств выращенных бактерий (например, ферментативная активность, устойчивость к антибиотикам и т.д.).

7. Заключение: – Резюме результатов культивирования бактерий с использованием метода турбидостата.

Системы культивирования полного вытеснения. Этот способ культивирования используется для анаэробных условий. Открытая система полного вытеснения отличается от системы идеального смешения тем, что культура в ней представляет собой поток жидкости через трубку (Рис. 15). Наиболее распространенным аппаратом является трубчатый реактор (ферментер) Он может иметь различную форму (прямую, S-образную, спиральную) и устанавливается горизонтально или вертикально.

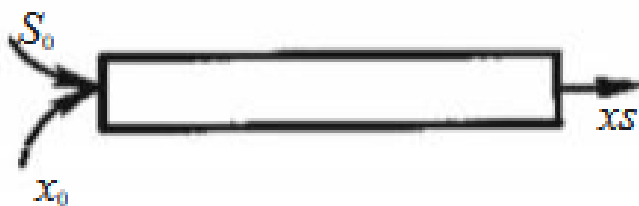


Рис. 15. Трубчатый реактор системы культивирования полного вытеснения, где S_0 – концентрация субстрата в поступающей среде; S – концентрация субстрата в вытекающей среде; X_0 – начальная концентрация биомассы; X_1 – концентрация вытекающей биомассы.

Система полного вытеснения представляет собой пространственный, проточный вариант периодической культуры. Такая культура за время от посева до выгрузки проходит через все стадии периодической культуры, т. е. фазы роста распределены не во времени, а в пространстве, причем каждой части ферментера в установившемся режиме соответствует определенный отрезок кривой роста. Засев осуществляется непрерывно на входе в ферментер одновременно с подачей среды.

По такому принципу ведут стадию брожения при производстве пива в башенных проточных емкостях.

Необходимо отметить, что в настоящее время появились ферментационные аппараты, обеспечивающие процессы с режимом, приближающимся к полному вытеснению и при аэробном культивировании. Это вращающиеся трубчатые реакторы с насадкой или внутренними аэрирующими элементами, а также многосекционные колоночные аппараты.

Системы твердожидкостного типа. К системам твердожидкостного типа относят многофазные системы, в которых культура растет на границе разных фаз: жидкость – твердая фаза, жидкость – твердая фаза – газ. В этих

системах клетки удерживаются путем прилипания к твердой основе – наполнителю и размножаются на нем, образуя пленку биомассы.

В процессах аэробного роста лимитирующими факторами, вероятно, являются кислород и субстрат. В тонких пленках биомассы каждая из прикрепленных к поверхности микробных клеток полностью обеспечена питательной средой и способна расти и размножаться с максимальной экспоненциальной скоростью. По мере того, как клетки образуют более толстую пленку биомассы, рост их лимитируется диффузией субстрата и кислорода внутрь этой пленки.

Таким образом, между периодическим и непрерывным культивированием существует большое разнообразие типов процессов культивирования. Каждый из промежуточных типов можно использовать в зависимости от задачи исследования или цели производства.

Синхронно делящиеся культуры микроорганизмов

Культуры микроорганизмов, даже взятые в один и тот же срок от посева, представляют собой совокупность клеток, находящихся на разных стадиях своего индивидуального развития. Изучение физиологических свойств и метаболической активности таких культур приводит к получению средних результатов.

Стремление получить культуры, все клетки которых в данный момент находятся в одной фазе развития, привело исследователей к разработке метода синхронизации деления микроорганизмов. Этот метод позволяет отдельно и поэтапно изучать физиологические и биохимические процессы, протекающие на разных стадиях развития клетки.

Сущность метода синхронизации заключается в том, что путем различных воздействий микробная популяция искусственно приводится в однородное физиологическое состояние. Наиболее легко определяемым

показателем такого состояния популяции является одновременное (синхронное) деление почти всех клеток культуры.

Периодическое синхронное культивирование.

Периодическое синхронное культивирование. Для синхронизации деления обычно применяют популяции в фазе экспоненциального роста, когда клетки наиболее однородны по продолжительности периода генерации.

Первая группа методов синхронизации заключается в механическом отборе клеток из популяции в зависимости от их объема, массы или определенной формы существования, как это имеет место в случае отбора спор. Применение селективных методов основано на предположении, что такие свойства, как объем и масса клеток, отражают в известной мере определенное физиологическое состояние. Эти методы имеют то преимущество, что не создают никакого препятствия в обмене веществ у отдельных клеток.

Вторая группа методов связана с физическими воздействиями, также ведущими популяцию к синхронному размножению. В этом направлении наибольшее распространение получили температурные воздействия. Синхронизация популяций с помощью изменения температуры культивирования достигается однократным (шок) или многократным (сдвиги температуры между двумя уровнями) действием более высокой или более низкой температуры по сравнению с оптимальной для данного вида микроорганизмов. Такое температурное воздействие, блокируя процесс деления, не останавливает роста и развития клеток, что в конечном итоге приводит популяцию в однородное состояние. После снятия шока от 70 до 90% клеток делится синхронно.

К физическому типу воздействий можно отнести также периодическую смену света и темноты. Этот метод считается наиболее естественным, так как

основан на цикличности развития водорослей в связи с суточной фотопериодичностью.

Третья группа факторов, вызывающих синхронное размножение, основана на изменениях питательной среды путем введения ингибиторов или лишения среды веществ, необходимых для деления.

Можно получить эффект синхронизации, применяя «голодные» среды, из которых полностью удалены важнейшие компоненты или снижено их содержание. Последующее добавление недостающего вещества или перенесение клеток в полноценную среду вызывает синхронное деление.

Непрерывно-синхронное культивирование. Общим и весьма существенным недостатком периодических синхронных культур является быстрая потеря синхронности, наступающая через 2–3 генерации. Причина подобного явления может заключаться в том, что не все клетки популяции делятся, достигнув одного и того же размера, возраста или момента времени, прошедшего после предыдущего деления. Принято считать, что решающая роль принадлежит фазе развития исходной синхронизируемой культуры. Десинхронизация наступает быстрее при воздействии на культуру синхронизирующим агентом в фазе замедления скорости размножения, т. е. более гетерогенную в отношении продолжительности генерации отдельных клеток.

Метод основан на периодическом отборе (сливе) из ферментера половины объема выросшей культуры через промежутки времени, равные одной генерации, и одновременном добавлении такого же количества свежей питательной среды, что обеспечивает импульсную подачу источников питания. Состав среды подбирается таким образом, чтобы при удвоении биомассы происходило исчерпание питательных веществ, вследствие чего рост культуры должен быть приостановлен. Добавление свежей среды приводит к восстановлению роста, т. е. синхронизация деления достигается голоданием клеток по какому-либо лимитирующему рост субстрату.

Лимитирующими факторами могут служить источники азота, углерода, минеральных солей и т. д. Имеются также данные, свидетельствующие о том, что синхронное деление клеток может быть индуцировано изменением рН, температуры и других условий культивирования, оказывающих воздействие на различные метаболические процессы клеток.

Подсчёт числа клеток

Подсчет клеток бактерий - это процесс определения количества бактерий в культуре. Особенно важно определять количество клеток микроорганизмов и, в частности, бактерий в процессе их культивирования. Это необходимо для целенаправленного управления развитием популяций бактерий.

Для этого можно использовать различные методы, такие как микроскопический анализ, использование специальных красителей или измерение оптической плотности культуральной среды.

При микроскопическом анализе необходимо поместить образец на предметное стекло и рассмотреть его под микроскопом. При этом можно подсчитать количество клеток, которые видны в поле зрения. Однако такой метод может быть трудоемким и требует определенных навыков.

Использование специальных красителей позволяет определить количество бактерий в образце путем измерения интенсивности окраски. Например, для подсчета количества колоний бактерий на чашке Петри можно использовать краситель, который изменяет свой цвет в зависимости от количества бактерий.

Измерение оптической плотности также может использоваться для подсчета бактерий. В этом случае образец помещается в специальный раствор, который изменяет свою оптическую плотность в зависимости от

концентрации бактерий. Затем измеряется оптическая плотность образца и на основе этого определяется количество бактерий.

Кроме того, в микробиологической практике часто определяют биомассу - массу сухого вещества клеток, выраженную в граммах, выросшую в определенном объеме питательной среды.

Непосредственный подсчет клеток проводят в счетных камерах, на фиксированных окрашенных мазках и на мембранных фильтрах. При непосредственном подсчете микроорганизмов под микроскопом учитывают, как живые, так и мертвые клетки, что дает несколько завышенные результаты о числе жизнеспособных клеток в субстрате.

Подсчет клеток микроорганизмов в камере Горяева

Камеры счётные — приборы для подсчета форменных элементов крови, мочи и цереброспинальной жидкости, а также микроорганизмов. Предложена К. с. франц. физиологом Малассе (L. Ch. Malassez) в 1874 г.

Камеры счётные представляют собой толстое предметное стекло с углублением, на дне которого выгравирована счетная сетка; над углублением накладывают шлифованное покровное стекло. Постоянная высота счетной камеры обеспечивается плотным притиранием покровного и предметного стекол до образования радужных Ньютоновых колец (полосы интерференции).

Структурными элементами всех типов сеток являются большие и малые квадраты. Сетки различных типов — Тома, Бюркера, Предтеченского, Тюрка, Нейбауэра, Горяева, Фукса — Розенталя и др.— отличаются различным группированием больших и малых квадратов.

Известные величины — высота камеры, площадь сетки и ее делений и разведение взятой для исследования крови — позволяют высчитать количество форменных элементов в определенном объеме (1 мкл) крови (или другой среды).

Различают открытые и закрытые камеры счётные. В закрытой камере покровное стекло притирают после ее заполнения, и при этом все равно в нее могут попасть пузырьки воздуха, что затрудняет подсчет клеток в них.

Открытые К. с. впервые описал С. П. Алферов в 1883 г., затем в 1905 г. Бюркер (К. Burker). Известны открытые счетные камеры Ключарева, Гауссера и Леви, Гельбера, Глауберманна. В настоящее время широко применяются счетные камеры (Горяева и Фукса) имеет объем 3,2 мкл, площадь сетки 16 мм², она состоит из 256 больших квадратов (квадраты, разделенные полосами, не считают).

В камерах Горяева, можно произвести подсчет крупных клеток – форменных элементов крови, дрожжей, одноклеточных водорослей, конидий грибов и некоторых крупных бактерий. Для подсчета клеток бактерий чаще используют счетную камеру Тома - Цейсса с сеткой Тома

Подсчет клеток микроорганизмов в камере Горяева

Предложена русским врачом, профессором Казанского университета Горяевым Н. К. (1875 - 1943).

Счетная камера Горяева (Рис. 16) представляет собой толстое предметное стекло, разделенное четырьмя прорезями на три поперечные площадки. Центральная площадка продольной прорезью делится пополам. На каждой половинке выгравирована сетка. Площадь квадрата сетки и глубина камеры указаны на предметном стекле и равны соответственно 1/25 (большой квадрат) и 1/400 мм² (малый квадрат). Глубина камеры равна 0,1 или 0,2 мм.

Суспензию дрожжей перед подсчетом клеток разбавляют водой в зависимости от предполагаемой их концентрации. На поверхность сетки камеры Горяева наносят небольшую каплю исследуемой суспензии микроорганизмов, накрывают специальным шлифованным покровным

стеклом и притирают его к боковым площадкам до появления так называемых Ньютоновых колец.

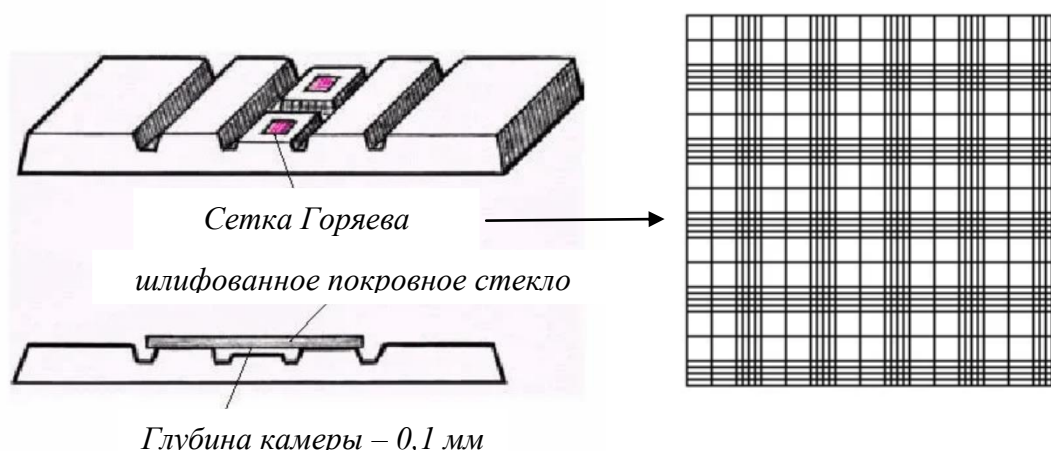


Рис. 16. Камера счета Горяева и сетка камеры Горяева

Подсчет клеток рекомендуется начинать не раньше, чем через 3-5 мин после заполнения камеры, чтобы клетки осели и расположились в одной плоскости. Клетки подсчитывают с объективом 8х или 40х. Для получения достоверных результатов подсчет следует проводить в 10 больших или 20 маленьких квадратах сетки, перемещая последние по диагонали, при этом количество клеток в большом квадрате не должно превышать 20, а в малом - 10. В противном случае суспензию следует развести водопроводной водой.

Количество клеток в 1 см^3 суспензии вычисляют по формуле:

$$C = a \cdot 1000 \cdot n/hS,$$

где C - число клеток в 1 см^3 суспензии; a - среднее число клеток в квадрате сетки; $1000 \text{ мм}^2 = 1 \text{ см}^2$; n - разведение исходной суспензии; h - глубина камеры в мм; S - площадь квадрата сетки в мм^2 .

Непосредственный подсчет клеток под микроскопом (метод Виноградского-Брида).

Данный метод часто используют для подсчета клеток лактобацилл в кисломолочном продукте.

Преимущество этого метода, по сравнению с учетом клеток в счетной камере, заключается в возможности подсчитывать клетки микроорганизмов малых размеров, так как подсчет проводят с использованием иммерсионного объектива.

Препарат для подсчета готовят следующим образом. Хорошо обезжиренное предметное стекло помещают на миллиметровую бумагу, на которой отмечают квадрат площадью 4 см^2 , и обводят его стеклографом или тушью. Готовят суспензию микроорганизмов, для чего 1 см^3 кисломолочного продукта вносят в пробирку с 9 см физиологического раствора ($n = 10$). Затем на предметное стекло наносят микропипеткой строго определенный объем исследуемой суспензии микроорганизмов (обычно 0,01 или 0,02 см³). Тщательно распределяют суспензию бактериологической петлей по всей площади квадрата, отмеченного на стекле.

Препарат подсушивают на воздухе, фиксируют в пламени спиртовки, окрашивают в течение 2 мин метиленовым синим, промывают водой и осушают фильтровальной бумагой. На препарат наносят каплю кедрового масла и рассматривают с иммерсионным объективом. Чтобы результат был достоверным, подсчет числа клеток рекомендуется проводить не менее чем в 20 полях зрения.

Общее количество подсчитанных клеток должно быть не менее 600. В мазке микроорганизмы распределяются неравномерно: в центре их содержится больше, чем по краям. Поэтому для получения среднего значения следует вести подсчет по диаметру мазка, смещая поле зрения от одного конца диаметра к другому.

Количество клеток в 1 см^3 суспензии вычисляют по формуле:

$$C = a \cdot S \cdot n/s \cdot V,$$

где C - число клеток в 1 см^3 суспензии; a - среднее число клеток в одном поле зрения; S - площадь приготовленного мазка (400 мм^2); n - разведение исходной суспензии; s - площадь поля зрения ($0,02 \text{ мм}^2$; V - объем нанесенной на предметное стекло суспензии микроорганизмов ($0,01$ или $0,02 \text{ см}^3$).

Прямой подсчет количества микроорганизмов флуоресцентным методом

Флуоресцентная микроскопия основана на способности некоторых биологических объектов люминесцировать, т. е. светиться при освещении ультрафиолетовым или синим светом вследствие того, что свет люминесценции обладает большей длиной волны, чем поглощенный (правило Стокса). При этом объекты будут светиться желто-зеленым или оранжевым светом. Это собственная или первичная люминесценция.

Поскольку большинство микроорганизмов не обладает собственной люминесценцией, существует несколько способов их обработки для наблюдения в люминесцентном микроскопе. Прежде всего это окрашивание их специальными красителями флуорохромами - сильно разбавленными растворами флуоресцирующих красителей. Из синтетических флуорохромов наилучшие результаты дают акридин желтый или оранжевый, корифосфин, примулин, родамин. Такой вид люминесценции в отличие от первичной носит название наведенной (вторичной).

Люминесцентная микроскопия по сравнению с обычной позволяет:

- сочетать цветное изображение и контрастность объектов;
- исследовать как прозрачные, так и непрозрачные живые объекты;
- изучать морфологию как живых, так и мертвых клеток микроорганизмов;

- исследовать клеточные микроструктуры, избирательно поглощающие различные флуорохромы, и определять функционально-морфологические изменения клеток;
- исследовать различные жизненные процессы в динамике их развития.

Микробные клетки окрашивают акридиновым оранжевым и концентрируют их на фильтрах методом центрифугирования или фильтрования. В проходящем свете с длиной волны 450 нм живые бактерии светятся зеленым светом, а мертвые - оранжево-красным. Подсчет численности бактериальных клеток в ходе микроскопирования ведется одновременно по отдельным морфологическим признакам, что дает возможность охарактеризовать как состав сообщества, так и общую численность микроорганизмов (кл/см³) в исследуемом объекте.

Люминесцентная микроскопия широко используется в медицинской микробиологии для диагностики возбудителей туберкулеза, дифтерии, гонореи, возвратного тифа и др.

Разработан ГОСТ Р 52415-2005 Молоко натуральное коровье - сырое. Люминесцентный метод определения количества мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов.

К главным недостаткам люминесцентной микроскопии относятся низкое разрешение при подсчете мелких бактериальных клеток (размером менее 1 мкм) и, следовательно, пропуск их большей части, большое напряжение зрения при подсчете мелких клеток, а также затемненные условия микроскопирования.

Метод проточной цитометрии

Проточная цитометрия (ПЦ) является современной технологией быстрого оптического измерения параметров клетки, ее органелл и

происходящих в ней процессов. Принцип метода ПЦ основан на регистрации флюоресценции и светорассеяния от каждой отдельно взятой клетки.

Клеточная суспензия, предварительно меченная флюоресцентными красителями, под давлением подается в проточную ячейку, где за счет гидродинамического фокусирования клетки, находясь в ламинарном потоке, выстраиваются в цепочку друг за другом. В момент пересечения клеткой лазерного луча высокочувствительные детекторы регистрируют интенсивность ее флюоресценции и рассеянное лазерное излучение.

В ходе анализа учитывается также уровень флюоресценции химических соединений, входящих в состав клетки (аутофлюоресценция). Полученный сигнал подается в компьютер, обрабатывается, и полученные данные отображаются в виде различных графиков или гистограмм. Аппарат для проведения ПЦ позволяет определять до 5-10 различных параметров клетки, таких как размер, активность ферментов, содержание белков, ДНК, липидов, антигенных веществ.

Метод ПЦ находит самое различное применение, начиная от простого подсчета клеток и определения их жизнеспособности и заканчивая более сложными исследованиями в иммунологии, онкологии, цитологии, гематологии, фармакологии.

Определение количества микроорганизмов методом мембранного фильтрования

Сущность метода состоит в том, что определенный объем исследуемой пробы (питьевой воды, стойких безалкогольных напитков, пастеризованного пива) фильтруют через мембранные фильтры с размером пор от 0,15 до 0,25 мкм. Осевшие на фильтре микроорганизмы окрашивают и подсчитывают под микроскопом с применением окулярного сетчатого микрометра в нескольких полях зрения на определенной площади препарата. Подсчет численности бактериальных клеток в ходе микроскопирования ведется одновременно по

отдельным морфологическим группам, что дает возможность охарактеризовать как состав микробного сообщества, так и (после суммирования данных) общую численность микроорганизмов в исследуемом объекте.

Помимо прямых методов подсчета клеток микроорганизмов в определенном объеме исследуемой жидкости существуют косвенные методы, позволяющие установить и рассчитать численность микроорганизмов в данном объеме.

Косвенные методы основаны на измерении показателей, зависящих от количества клеток (число колониеобразующих единиц, значение мутности суспензии, содержание белка, поглощение кислорода, количество образованной биомассы и др.). Обычно параллельно используют два-три метода определения численности клеток, так как любой способ подсчета имеет свои ограничения. Так, не все клетки способны дать колонии на твердой среде, и не существует питательной среды, подходящей для всех без исключения микроорганизмов.

Определение количества микроорганизмов методом подсчета колоний (чашечный метод)

Чашечный метод широко применяется для определения численности жизнеспособных клеток микроорганизмов в различных естественных субстратах и в лабораторных культурах.

Из косвенных методов наиболее часто применяют получение отдельных колоний на плотных средах по Коху. Поскольку колония — это потомство одной клетки, то, подсчитав выросшие на агаризованной среде колонии, можно узнать число клеток (колониеобразующих единиц, КОЕ) в единице объема исходной суспензии. Однако необходимо учитывать, что для микроорганизмов, образующих цепочки или другие скопления клеток, результаты всегда несколько занижены.

Для получения изолированных колоний готовят десятикратные разведения. Посев можно осуществить по поверхности застывшей агаризованной среды в чашках Петри (Рис. 17) или глубинно (Рис. 18), внося заданный объем суспензии в порцию расплавленной и остуженной до 45°C агаризованной среды и выливая смесь в чашку Петри для застывания. Чашки с посевами помещают в термостат крышками вниз, чтобы конденсационная вода не мешала образованию отдельных колоний. Когда колонии станут хорошо различимыми, проводят их подсчет, учитывая объем внесенной пробы и разведение.

Поэтому при использовании чашечного метода **результат выражают** не числом клеток в единице массы или объема, а **количеством колониобразующих единиц (КОЕ)**. В отличие от прямого подсчета клеток под микроскопом этот метод дает возможность определить только число жизнеспособных клеток. Однако, зачастую именно количество жизнеспособных клеток в популяции растущих клеток важно для оценки ее развития или ингибирования. Поэтому часто в различных исследованиях используют этот метод оценки практически приравнивая КОЕ к общему количеству клеток.

Определение чашечным методом числа микроорганизмов включает следующие этапы: отбор проб и подготовку их к анализу, приготовление серийных разведений микробной суспензии, посев в чашки Петри на плотную среду, инкубацию посевов при оптимальной температуре, подсчет выросших колоний и обработку результатов.

В качестве питательной среды для учета бактерий используют мясопептонный агар, на котором могут расти только сапрофитные аэробные и факультативно анаэробные бактерии, но неспособны расти строго анаэробные. Дрожжи и мицелиальные грибы обычно выращивают на неохмеленном сусло-агаре или питательных средах растительного происхождения с добавлением мальтозы.

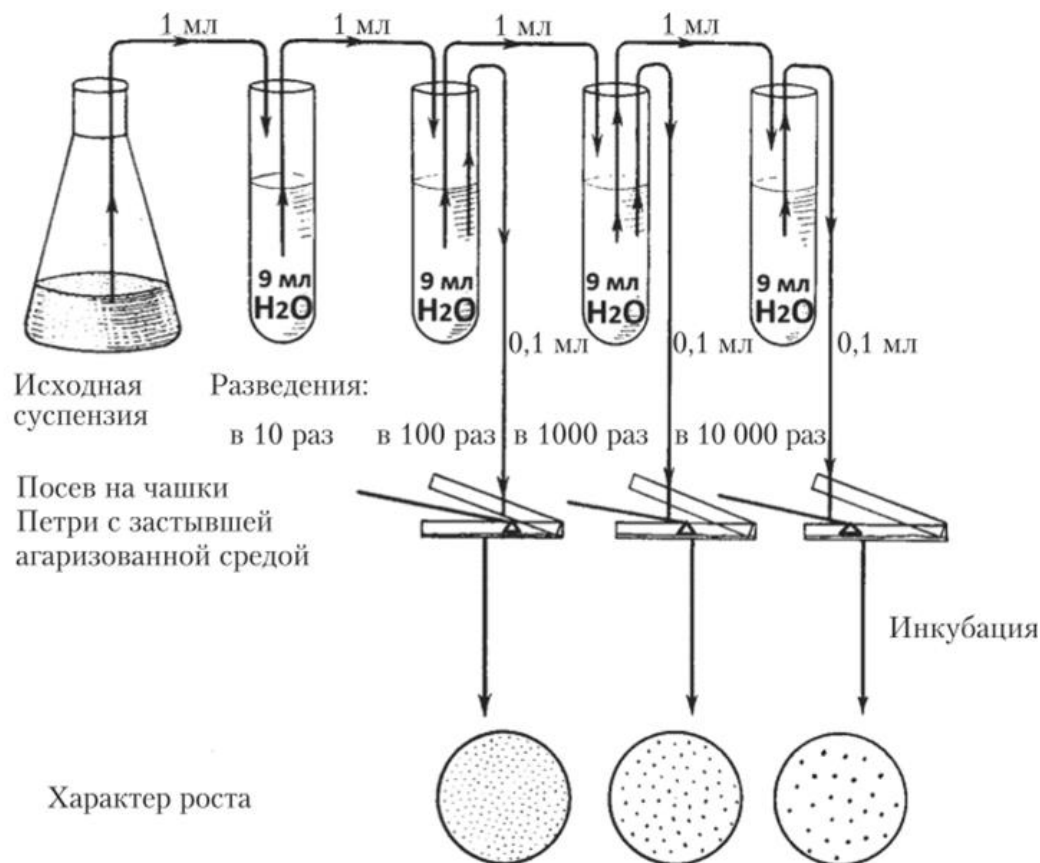


Рис. 17 Схема поверхностного посева по Коху для получения отдельных колоний. Рисунок взят из материалов открытой публикации https://studme.org/267946/geografiya/rost_kultivirovanie_mikroorganizmov

Рост бактерий проходит на поверхности агаризованной питательной среды с образованием колоний, которые впоследствии изучаются по различным признакам в целях последующей идентификации данных микроорганизмов. После этого возможно выделение чистой культуры или количественный подсчет наличия бактерий определенного вида в единице объема исходной суспензии.



Рис. 18. Схема глубинного посева по Коху для получения отдельных колоний. Рисунок взят из материалов открытой публикации https://studme.org/267946/geografiya/rost_kultivirovanie_mikroorganizmov

Если бы рост микроорганизмов не ограничивался доступностью питательных веществ, то через 48 ч микробные клетки образовали бы биомассу, в 150 раз превышающую массу нашей планеты. Быстрее всего из известных микроорганизмов растут фотобактерии, удваивающиеся каждые 8—10 мин. *E. coli* в оптимальных условиях делится через 20 мин. Продуктивность одноклеточных микроорганизмов в 10—100 тыс. раз превышает продуктивность сельскохозяйственных растений и животных.

Учет живых микроорганизмов методом предельных разведений

Метод предельных разведений применяется для установления количества микроорганизмов отдельных физиологических групп (молочнокислых, уксуснокислых бактерий, кишечных палочек и др.). Сущность метода состоит в том, что делается ряд десятикратных разведений исследуемого материала. Количество разведений готовится в зависимости от предполагаемого содержания бактерий в исследуемом объекте таким образом, чтобы в последних разведениях данных бактерий не было. Материалом, взятым из приготовленных разведений, засевают определенное число пробирок с питательной средой. После инкубации при оптимальной температуре визуально устанавливают, в каком наименьшем количестве исследуемого материала еще находятся представители данной группы микроорганизмов.

Например, при определении количества молочнокислых бактерий в кисломолочном продукте готовят ряд его последовательных разведений от 10^{-1} до 10^{-10} . Из каждого разведения в три пробирки со стерилизованным обезжиренным молоком параллельно засевают по 1 см суспензий. Пробирки выдерживают в термостате при оптимальной температуре в течение 18-24 ч, после чего отмечают, в каких пробирках образовался сгусток за счет накопления молочнокислыми бактериями молочной кислоты. В параллельных посевах может получиться не один и тот же результат вследствие неравномерного распределения клеток в исследуемой пробе. В дальнейшем титр определяется с помощью специальных расчетных таблиц.

Если для определения числа живых микроорганизмов используют бульонную питательную среду, то после инкубации пробирки, в которых размножились микроорганизмы, окажутся мутными, а пробирки, засеянные разведениями, в которых уже не содержалось жизнеспособных микроорганизмов, останутся прозрачными. Доля пробирок, оказавшихся мутными при посеве культуры данного разведения, зависит от числа живых

клеток в неразведенной культуре. По числу мутных пробирок в группах, засеянных суспензиями трех последовательных разведений, определяют с помощью соответствующих таблиц наиболее вероятное число клеток микроорганизмов.

Нефелометрический метод определения биомассы

Нефелометрический (турбидиметрический) метод определения биомассы нашел широкое применение в лабораторных микробиологических исследованиях, поскольку позволяет быстро и довольно точно определить концентрацию клеток в суспензии микроорганизмов.

Нефелометрический метод основан на рассеивании пучка света взвешенными в жидкой фазе частицами. Данный метод пригоден лишь для тех микроорганизмов, рост которых вызывает равномерное помутнение среды и при этом не происходит образования мицелия, пленок и других скоплений. Питательная среда, в которой культивируют микроорганизмы, должна быть оптически прозрачной.

Светорассеяние, вызываемое микроорганизмами, выросшими в питательном бульоне, наиболее удобно измерять с помощью фотоэлектроколориметра (ФЭК) или спектрофотометра (СФ) при длине волны от 540 до 650 нм, при которой поглощение света данной суспензией является минимальным.

Зависимость между интенсивностью падающего света (I_0) и прошедшего света I (т.е. света, не рассеянного культурой) при малых концентрациях бактерий подчиняется закону Ламберта-Бера:

$$I = I_0 10^{-\varepsilon/c},$$

где ε - коэффициент экстинкции, l - толщина слоя суспензии, c - концентрация бактерий.

Из этого соотношения следует: $\lg(I_0/I) = \varepsilon lc.$

График зависимости $lg(I_0/I)$ от c (концентрации бактерий) имеет вид прямой, угол наклона которой определяется произведением ϵl . Таким образом, изменение оптической плотности, вызываемое изменением концентрации бактерий на одну единицу, зависит от толщины слоя суспензии l и свойств суспензии, характеризуемых коэффициентом ϵ .

Однако, при высоких концентрациях бактерий закон Ламберта-Бера теряет свою силу.

Для определения числа бактерий нефелометрическим методом строят специальные калибровочные кривые зависимости между величиной светорассеяния и числом клеток (или сухой биомассы в единице объема среды). Для построения калибровочной кривой измеряют на ФЭК или СФ величину светорассеяния суспензии с различным содержанием клеток и в каждой из них определяют количество клеток и биомассы. Полученную зависимость выражают графически, откладывая на оси ординат показания ФЭК, а на оси абсцисс - количество клеток, содержащееся в 1 см^3 суспензии, или биомассу в 1 дм^3 культуральной среды.

Для каждого микроорганизма необходимо строить свою калибровочную кривую, что является довольно затратным процессом как по используемым питательным средам, так и трудозатратам квалифицированного персонала.

Тестовые задания

1. При изучении динамики роста культур микроорганизмов необходимо строго соблюдать некоторые условия:

- а) жизнеспособность засева;
- б) наличие в среде культивирования всех необходимых питательных веществ;
- в) наличие в среде ингибиторов, подавляющих рост клеток;
- г) поддержание в среде всех оптимальных физико-химических условий.

2. Методы получения чистых культур аэробов:

- а) метод Виньяль-Вейона
- б) метод агаровой заливки
- в) метод Дригальского
- г) метод посева истощающим штрихом с обжигом петли

3. Лаг-фаза это:

- а) фаза адаптации и начала интенсивного роста
- б) фаза максимального роста и интенсивного деления
- в) фаза, при которой число бактериальных клеток не увеличивается
- г) фаза, при которой число жизнеспособных клеток неизменно и находится на максимальном уровне

4. Фаза логарифмического роста:

- а) фаза начала адаптации и интенсивного роста
- б) фаза максимального роста и интенсивного деления
- в) фаза, при которой число бактериальных клеток не увеличивается
- г) фаза, при которой число жизнеспособных клеток неизменно и находится на максимальном уровне

5. Культивирование аэробов предусматривает использование:

- а) свечей Шарберлена
- б) аппарата Аристовского
- в) термостата
- г) эксикатора

6. Питательные среды для культивирования анаэробов:

- а) МПА
- б) среда Китт-Тароцци
- в) среда Клауберга
- г) кровяной агар

7. На 2 день при выделении чистой культуры микробов аэробов производят:
- а) посев на среду Гисса
 - б) идентификацию культуры
 - в) посев на скошенный МПА
 - г) посев на МПА
8. К жидким питательным средам относят:
- а) мясопептонный агар
 - б) среда Эндо
 - в) кровяной агар
 - г) мясопептонный бульон
9. Рост в периодической культуре характеризуется
- а) постоянной сменой условий
 - б) увеличением концентрации субстрата
 - в) возрастанием плотности популяции
 - г) уменьшением концентрации субстрата
 - д) уменьшением концентрации клеток
10. Рост в непрерывной культуре характеризуется
- а) постоянной сменой условий
 - б) увеличением концентрации субстрата
 - в) возрастанием плотности популяции
 - г) уменьшением концентрации субстрата
11. Глубинное культивирование в ферментерах по сравнению со статическим и поверхностным имеет ряд отличий
- а) ускоряет рост и развитие микроорганизмов
 - б) замедляет рост и развитие микроорганизмов
 - в) позволяет получать гомогенную культуру «идеального смешения»
 - г) не позволяет получать биомассу
12. Выделение чистой культуры микробов-анаэробов производят по:
- а) Д'Эрелю
 - б) Коху
 - в) Дригальскому
 - г) Цейслеру
13. Определение сахаролитических ферментов производят при посеве на:
- а) среду Вильсон-Блера
 - б) среду Китт-Тароцци
 - в) кровяной агар
 - г) среды Гисса

14. Для культивирования патогенных анаэробов применяется среда:

- а) висмут-сульфит агар
- б) среда Вильсона-Блера
- в) среда Борде-Жангу
- г) среда Леффлера

15. Типы дыхания бактерий:

- а) аэробный и анаэробный
- б) химический и физический
- в) химический и биологический
- г) окислительный и восстановительный

16. Факультативные анаэробы растут:

- а) в кислородной и бескислородной среде
- б) только в кислородной среде
- в) в бескислородной среде
- г) В присутствии инертных газов

17. Чистая культура это:

- а) совокупность микроорганизмов одного вида
- б) совокупность микроорганизмов разных видов
- в) совокупность микроорганизмов одного рода
- г) совокупность микроорганизмов разных родов

18. Термостат используется для:

- а) стимуляции спорообразования бактерий
- б) стерилизации питательных сред
- в) выращивания микроорганизмов
- г) стерилизации хирургических инструментов

19. Сущность бактериологического метода диагностики:

- а) заражение экспериментальных животных
- б) приготовление мазка-препарата и его микроскопии
- в) выделение чистой культуры с последующей идентификацией
- г) определение антигенной структуры

20. Период, в течение которого количество живых клеток остается постоянным

- а) лаг фаза
- б) экспоненциальная
- в) стационарная
- г) отмирания

д) фаза продолжения выживания

21. Облигатные анаэробы

- а) содержат цитохромы
- б) при действии кислорода образуется вода, которая губит клетку
- в) для роста необходим солнечный свет
- г) вегетативные формы в присутствии кислорода погибают

22. Фаза логарифмического роста:

- а) фаза начала адаптации и интенсивного роста
- б) фаза максимального роста и интенсивного деления
- в) фаза, при которой число бактериальных клеток не увеличивается
- г) фаза, при которой число жизнеспособных клеток неизменно и находится на максимальном уровне

23. При снятии петлей изолированной колонии с МПА установлено, что колония слизистая, тянется за петлей. Что можно сказать о микробе:

- а) образует споры
- б) выделяет ацетилметилкарбинол
- в) имеет фермент триптафаназу
- г) обладает слизистой капсулой
- д) обладает лецитиназой
- е) термостабилен

24. Под ростом бактерий понимают:

- а) трансформацию
- б) увеличение числа клеток в популяции
- в) сегрегацию дочерних цепей ДНК
- г) координированное воспроизведение всех компонентов клеток

25. Цель III этапа бактериологического метода:

- а) обнаружение возбудителя в исследуемом материале
- б) получение изолированных колоний
- в) накопление чистой культуры
- г) идентификация чистой культуры

26. Цель IV этапа бактериологического метода:

- а) оценивают результаты биохимических исследований, по ним определяют таксономическое положение микроорганизма
- б) обнаружение возбудителя в исследуемом материале
- в) получение изолированных колоний
- г) идентификация чистой культуры

27. Все ли бактерии, находящиеся в исследуемом объекте, учитываются чашечным методом?

- а) все жизнеспособные
- б) полностью все
- в) только погибшие
- г) делящиеся

28. Какие питательные среды используют для определения в продукте количества бактерий и грибов (дрожжей и плесеней)?

- а) МПА
- б) среда Сабуро
- в) МПБ
- г) 1% пептонный щелочной агар

29. Что такое КОЕ?

- а) метод подсчета бактерий
- б) количество жизнеспособных микроорганизмов в единице объема среды
- в) число погибших, нежизнеспособных бактерий
- г) количество отраженных единиц

30. На чем основан нефелометрический метод определения количества бактерий или биомассы в суспензии?

- а) рассеивание пучка света взвешенными в жидкой фазе частицами
- б) на оценке количества клеток
- г) на оценке количества клеток жизнеспособных клеток

Правильные ответы: 1 а, б, г; 2 в, г; 3 а; 4 б; 5 в; 6 б; 7 в; 8 г; 9 в, г; 10 б, в;
11 а, в; 12 г; 13 г; 14 б; 15 а; 16 а; 17 а; 18 в; 19 в; 20 а; 21 г; 22 б; 23 г; 24 г;
25 в; 26 а; 27 а; 28 б; 29 б; 30 а