

Приволжский исследовательский медицинский университет

Кафедра эпидемиологии, микробиологии и доказательной
медицины

Культивирование бактерий

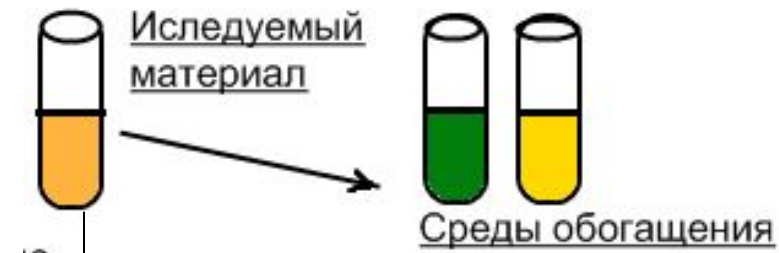
*Лектор: ст. преподаватель каф. эпидемиологии,
микробиологии и доказательной медицины
Александрова Наталья Александровна*

Культивирование бактерий с их последующей идентификацией лежит в основе **бактериологического анализа** (культуральный метод исследования).

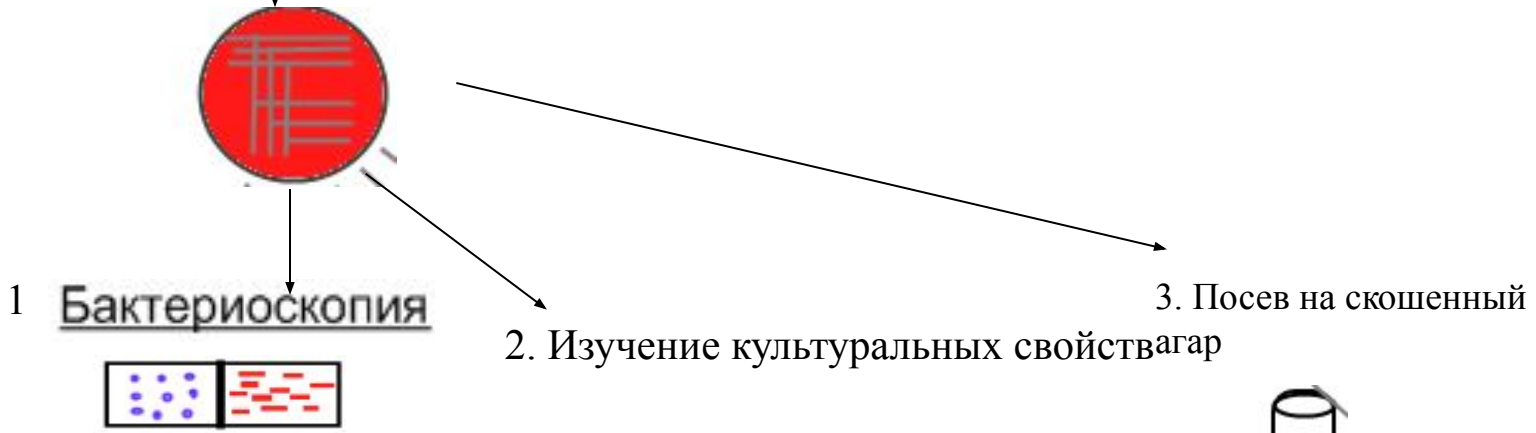
Бактериологический анализ включает несколько этапов:

1. Выделение чистой культуры бактерий из материала, используя питательные среды.
2. Накопление биомассы чистой культуры, достаточной для последующей идентификации.
3. Идентификация чистой культуры бактерий.
4. В ряде случаев проводится определение чувствительности чистой культуры бактерий к

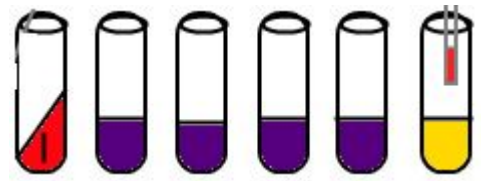
I этап



II этап

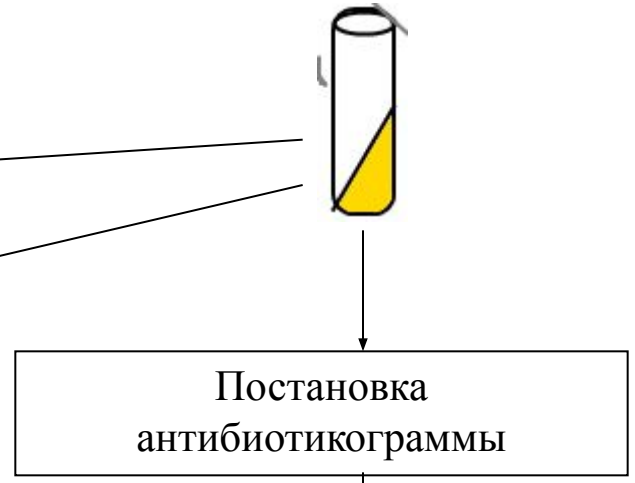


III этап



идентификация

IV этап



Учёт результатов.

Получение чистой культуры

Цель – получение изолированных колоний возбудителя
инфекции

- Подготовка материала к исследованию
- Посев на плотные питательные среды для получения изолированных колоний
- Инкубация при 37°С, в течение 18-48 часов (в зависимости от предполагаемого возбудителя)

Получение чистой культуры

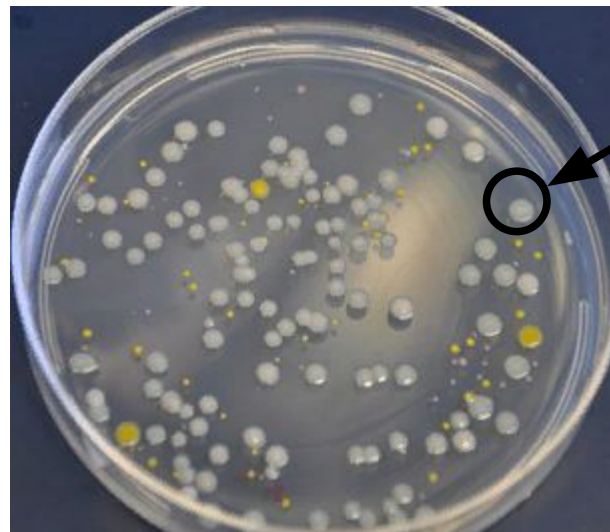
Штамм - это чистая культура микроорганизмов, выделенных из определенного источника в определенное время. Штамм - более узкое понятие, чем вид.

Разные штаммы одного и того же вида могут отличаться по ряду свойств, например вирулентности, чувствительности к антибиотикам и др.

Чистая культура

Клон - совокупность генетически идентичных клеток, потомков одной единственной микробной клетки.

При росте микроорганизмов на плотной питательной среде потомство одной клетки в результате роста и размножения становится видимым невооруженным глазом и воспринимается как изолированное скопление бактерий одного вида, называемое *колонией*



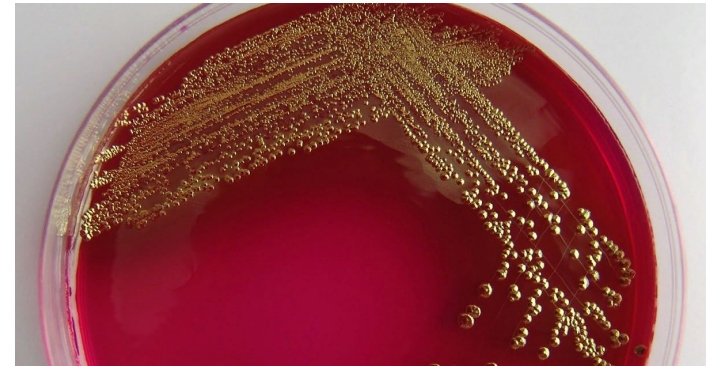
КОЛОНИЯ

Культуральные свойства

Внешний вид колоний (культуральный признак) является важной характеристикой бактерий, так как каждому виду микробов при росте на определенной питательной среде присущи типичные характеристики (структура, размер, форма, цвет и т.д.)



Колонии эшерихии на кровяном агаре



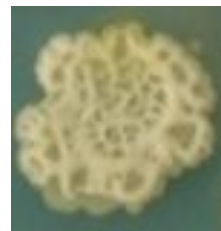
Колонии эшерихии на среде Эндо

Основные характеристики бактериальных колоний

- 1. Форма



Правильная,
круглая



неправильная

- 2. Поверхность (матовая, блестящая, исчерченная и т.д)



гладкая



морщинистая

Основные характеристики бактериальных колоний

3. Размер (диаметр в мм)

4. **Расположение колонии на поверхности среды:** выпуклое, плоское, вдавленное.



Фото К.Лавров lavrov.ko@gmail.com

выпуклые



плоские

Основные характеристики бактериальных колоний

5. Консистенция (сухая, влажная, слизистая)



слизистая



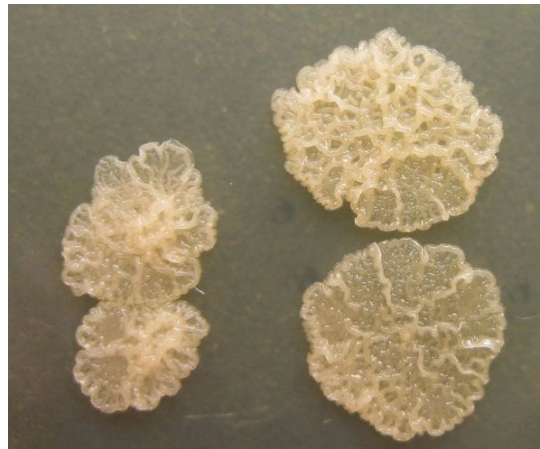
сухая

Основные характеристики бактериальных колоний

- **6. Характер края** (ровные, фестончатые, зубчатые). Некоторые бактерии не образуют колоний определенной формы, а распространяются по всей поверхности питательной среды, например, «ползущий» рост *Proteus spp.*



Ровный край



Фестончатый край



Рост *Proteus spp.*

Основные характеристики бактериальных колоний

7. Цвет колонии



Фото К.Лавров lavrov.ko@gmail.com

пигментированные



ASM Microbiology © Buxton

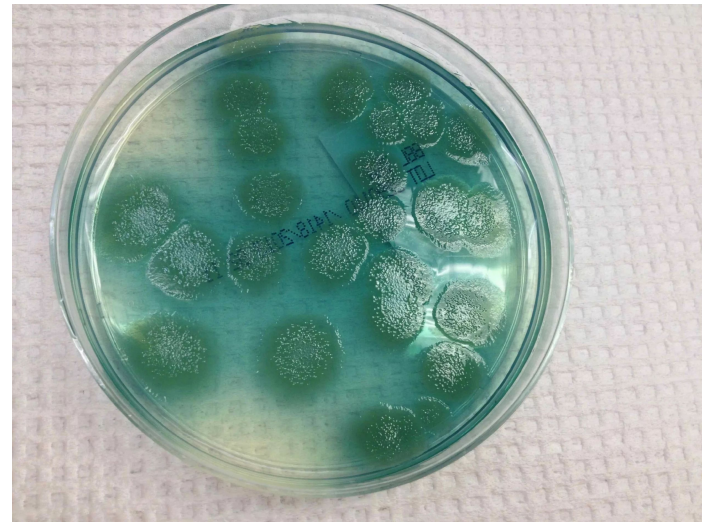
непигментированные

Основные характеристики бактериальных колоний

8. Изменение среды вокруг колонии



Наличие гемоллиза



Окрашивание среды
водорастворимым пигментом
Ps. aeruginosa

Основные характеристики бактериальных колоний

Некоторые бактерии способны формировать несколько типов колоний.

При этом, колонии **S-типа** - гладкие, слизистые, круглой формы, влажной консистенции.

Колонии **R-типа** - большие, с шероховатой поверхностью, неправильной формы, сухой консистенции. Выделяют также промежуточные типы.

Как правило, микроорганизмы, формирующие S-тип колоний, более вирулентны, чем R-типы.

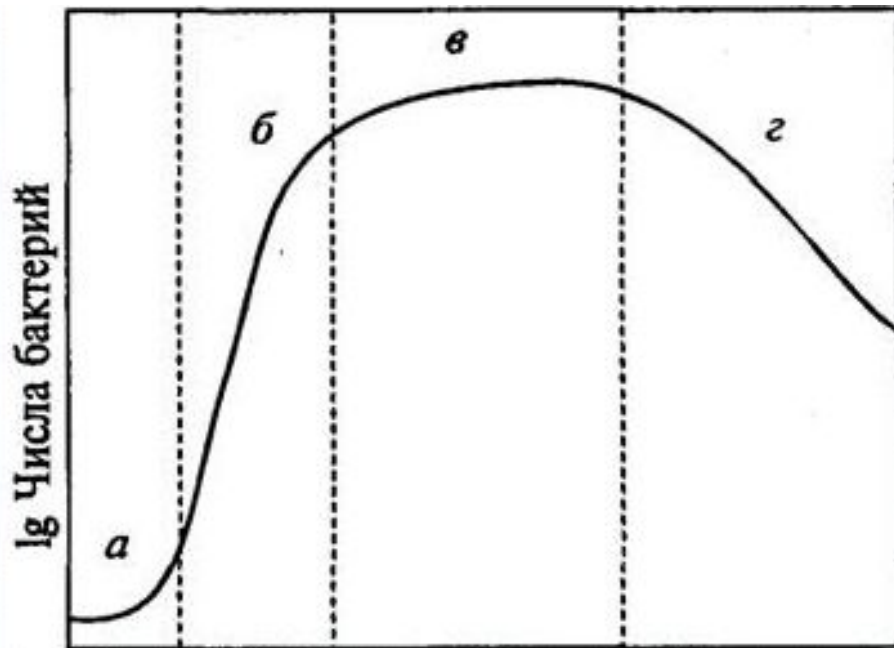
Второй этап: цель – накопление чистой культуры

С целью увеличения биомассы микроорганизма микроорганизмы пересевают на скошенный агар или жидкие питательные среды (реже).

Увеличение биомассы необходимо для проведения идентификации микроорганизма

Иногда данный этап можно пропустить, если после первичного посева получено достаточное количество чистой культуры и нет риска загрязнения

График роста и размножения бактерий на питательных средах



а — **лаг-фаза** (бактерии приспосабливаются к новой среде);

б — **фаза роста** (размножение идет с нарастающей скоростью);

в — **стационарная фаза** (число образующихся клеток соответствует числу отмерших);

г — **фаза отмирания** (клетки теряют жизнеспособность и погибают)

III этап

Цель: идентификация выделенной чистой культуры

1. Микроскопия – подтверждение чистоты культуры! Предварительная идентификация



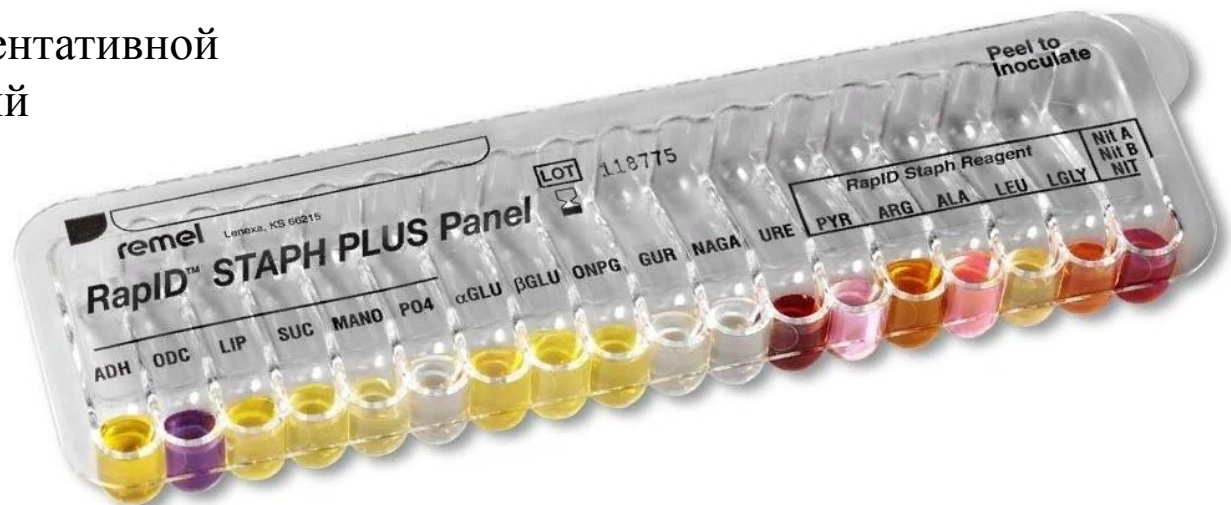
2. Изучение ферментативной активности
3. Постановка антибиотикограммы
4. Изучение чувствительности к фагам
5. Серотипирование
6. Протеомный анализ (MALDI-TOF)

**Окончательная
идентификация**

Биохимическая идентификация



Определение ферментативной
активности бактерий



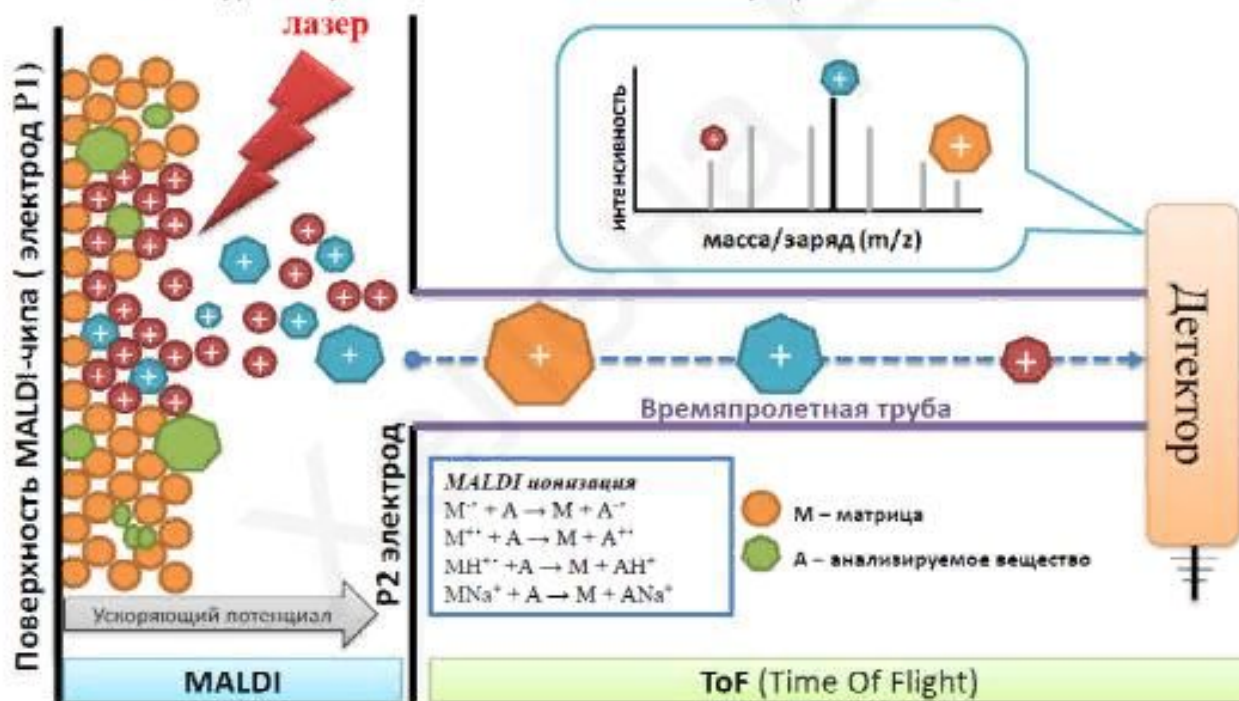
Принцип масс-спектрометрии

Принцип MALDI-TOF масс-спектрометра

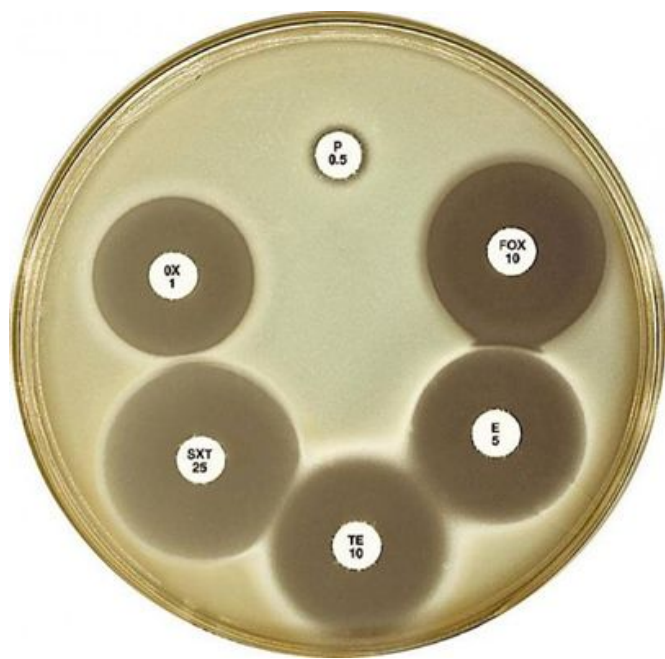
МАЛДИ - Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация, — метод «мягкой» ионизации твердого вещества, обусловленной воздействием импульсами лазерного излучения на смесь матрицы с анализируемым веществом

ToF - Time of Flight, Времяпролетный анализатор, позволяет разделить в вакууме исследуемое вещество

Регистрируемые спектры масс (графики) обрабатываются специализированным программным обеспечением для получения клинически-значимого результата



Постановка антибиотикограммы



антибиотикограмма

Четвертый этап

Учитывают результаты идентификации и по совокупности полученных данных, опираясь на классификацию и характеристику типовых штаммов определяют вид выделенных культур.

Достоинства метода

- Относительно высокая чувствительность
- Возможность проведения качественного и количественного исследования
- Возможность исследования чувствительности к антибиотикам и бактериофагам

Недостатки бактериологического анализа

- Длительность исследования – минимум 3-4 дня
- **Высокие требования к забору материала**
- Невозможность использования для вирусов и некоторых бактерий, не растущих на питательных средах

Спасибо за внимание!