

Методы выделения чистых культур бактерий.

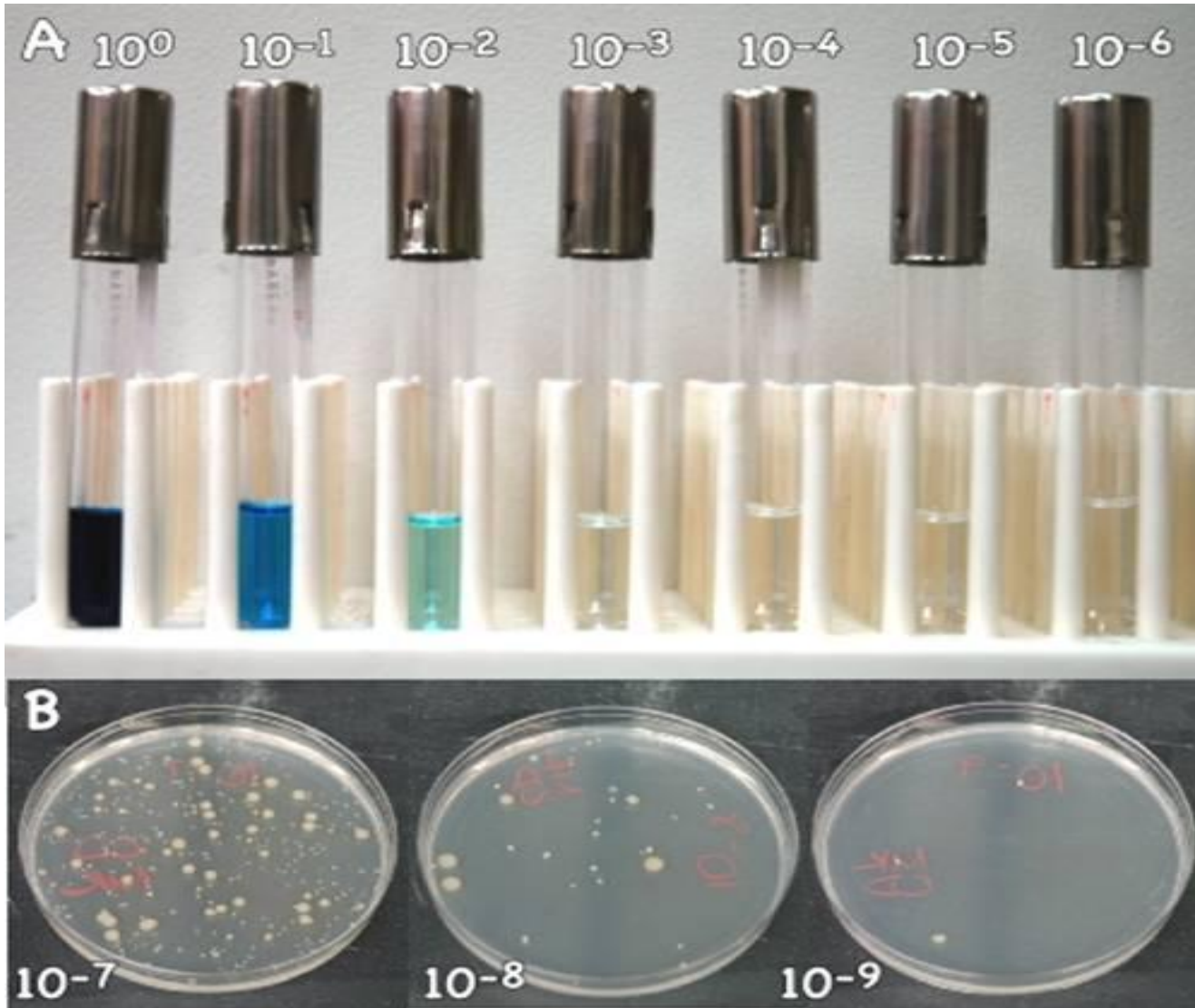
Питание микроорганизмов.

Методы стерилизации и дезинфекции.

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

- **Чистой культурой** называют такую культуру, которая содержит микроорганизмы **одного вида**.
- Выделение чистых культур бактерий - обязательный этап всякого бактериологического исследования.
- Чистая культура необходима для изучения морфологических, культуральных, биохимических и антигенных свойств, по совокупности которых определяется видовая принадлежность исследуемого микроорганизма.

Метод Коха («пластинчатые разводки») - последовательное разведение исследуемого материала в расплавленном агаре (температура 48-50 ° C), с последующим разливом в чашки Петри, где агар застывает.



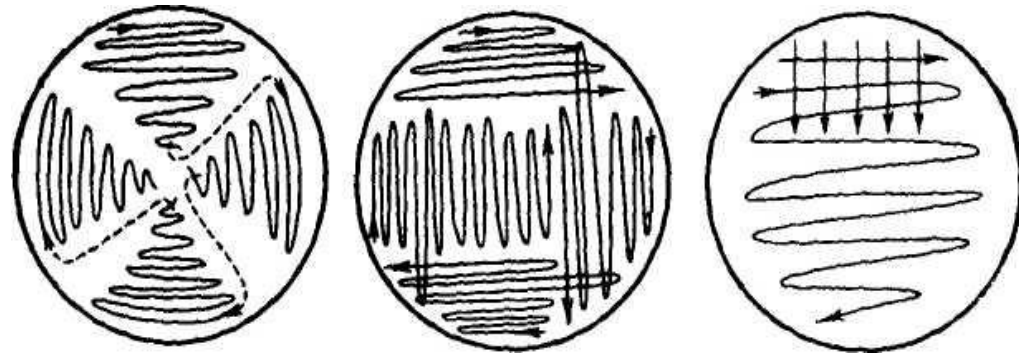
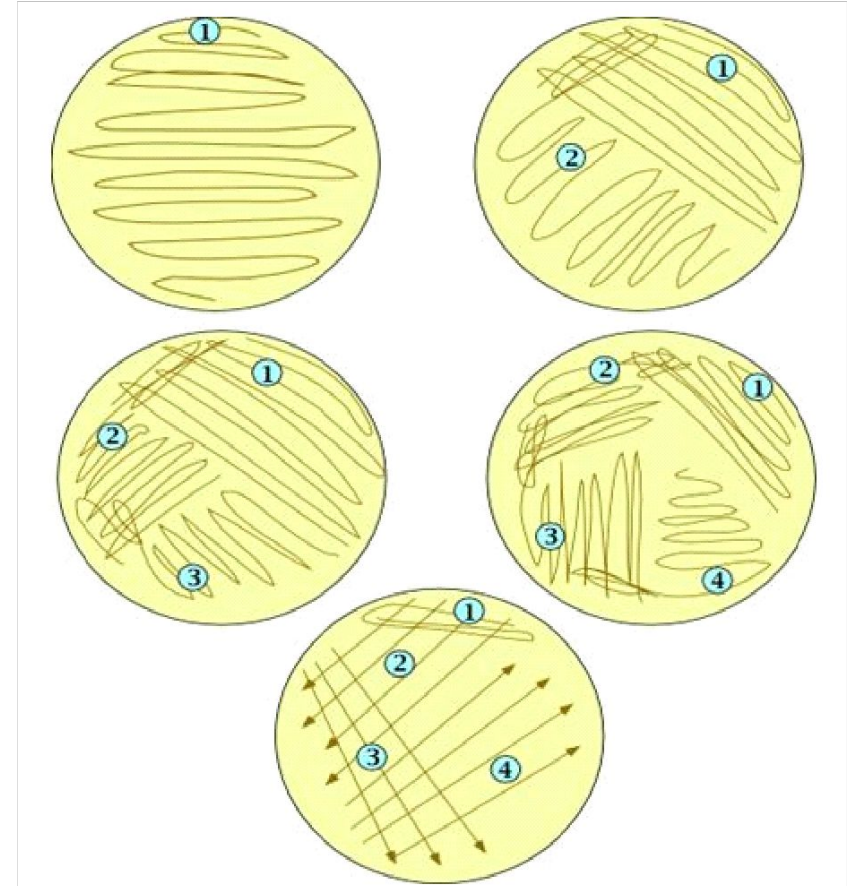
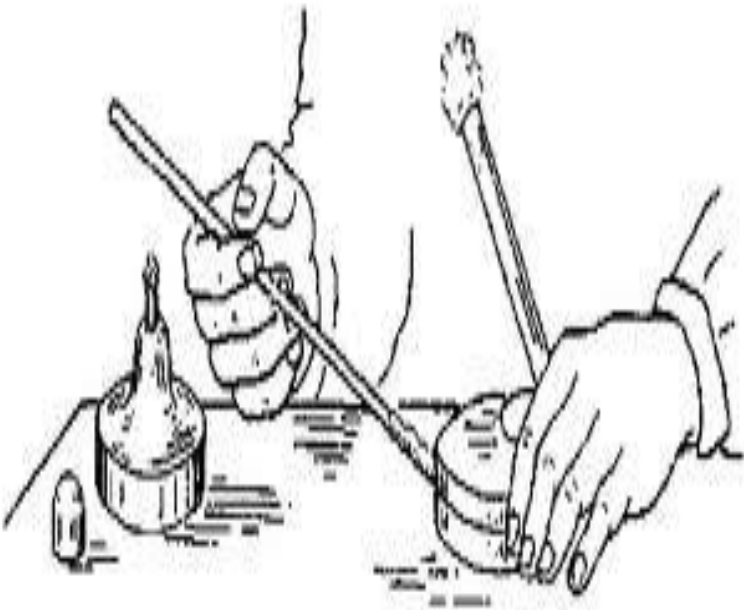
Высевы делают, как правило, из трех-четырех последних разведений, где бактерий становится мало и, в дальнейшем, при росте на чашках Петри появляются изолированные колонии, образующиеся из одной исходной материнской клетки. Из изолированных колоний получают чистую культуру бактерий пересевом на свежие среды.

Посев истощающим штрихом

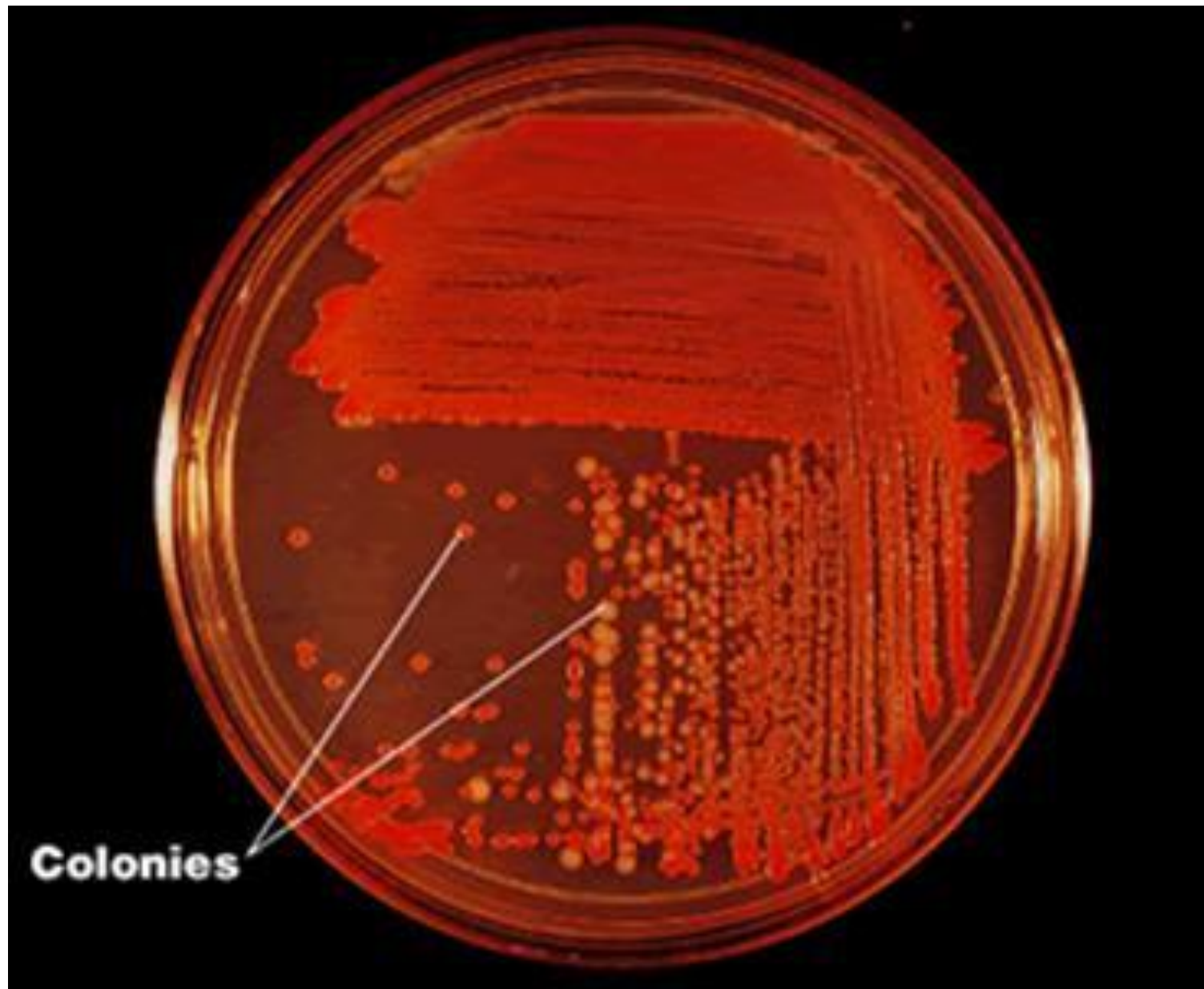
Область применения:

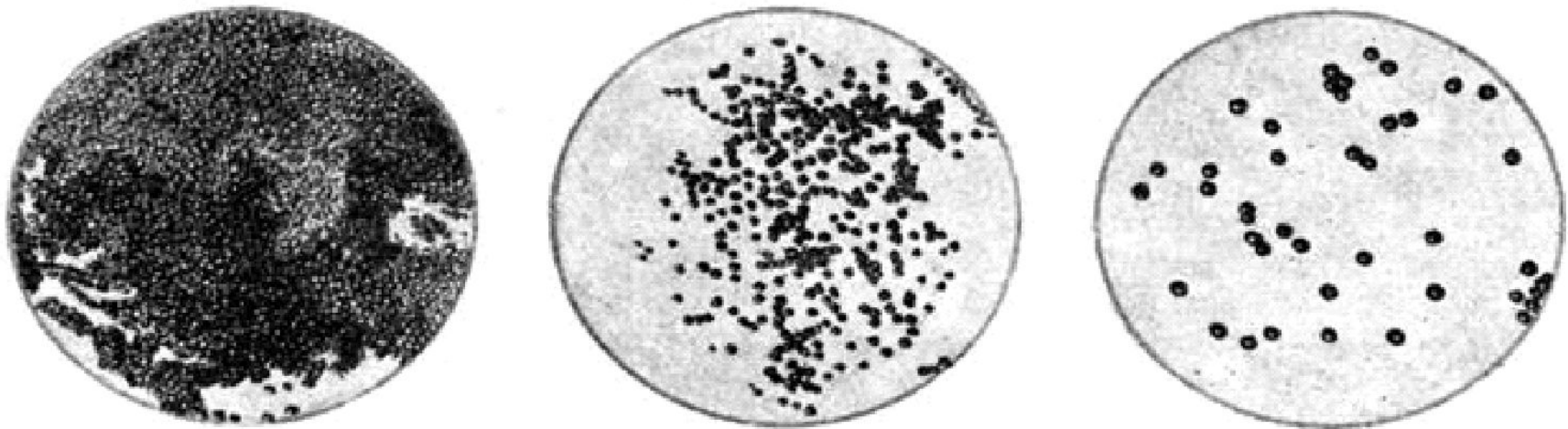
для выделения чистых культур из материалов, содержащих обильную смешанную микрофлору.

Материал отбирают петлей и на поверхности плотной среды проводят штрихи в таком порядке, как указано на рисунке. Перед каждым новым нанесением петлю стерилизуют в пламени горелки.



Посев истощающим штрихом:





Колонии по методу Дригальского

Метод Дригальского: исследуемый материал разводят в пробирке стерильным физиологическим раствором или бульоном.

Одну каплю материала вносят в первую чашку и стерильным шпателем распределяют по поверхности среды.

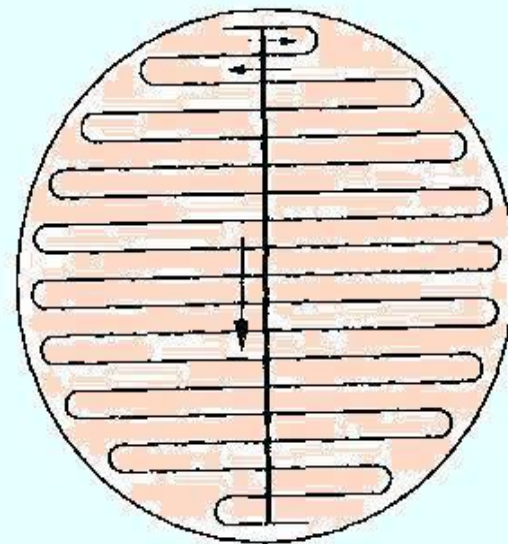
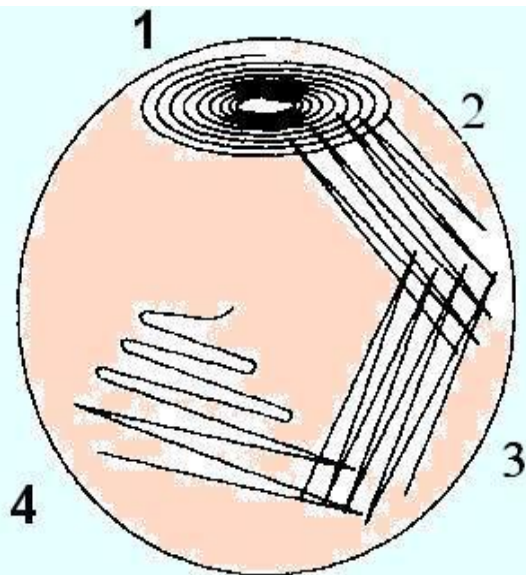
Затем этим же шпателем (не прожигая его в пламени горелки) делают такой же посев во второй и третьей чашках. С каждым посевом бактерий на шпателе остается все меньше и меньше, и при посеве на третью чашку бактерии будут распределяться по поверхности питательной среды отдельно друг от друга.

Через 1-7 суток выдерживания чашек в термостате (в зависимости от скорости роста микроорганизмов) на третьей чашке каждая бактерия дает клон клеток, образуя изолированную колонию, которую пересевают на скошенный агар с целью накопления чистой культуры.

Получение изолированных КОЛОНИЙ

Колония представляет собой изолированное скопление бактерий одного вида, или биовара, выросших на плотной питательной среде в результате размножения одной или нескольких бактериальных клеток. Колонии бактерий разных видов отличаются друг от друга по своей морфологии, цвету и другим признакам

Для получения изолированных колоний на практике наиболее часто используют модификацию посева по Дригальскому. Для этого материал наносят на поверхность плотной питательной среды ближе к краю и делают «бляшку». Затем из неё материал распределяют по четырём квадратам, проводя петлёй штрихи, обжигая петлю после засева каждого квадрата.



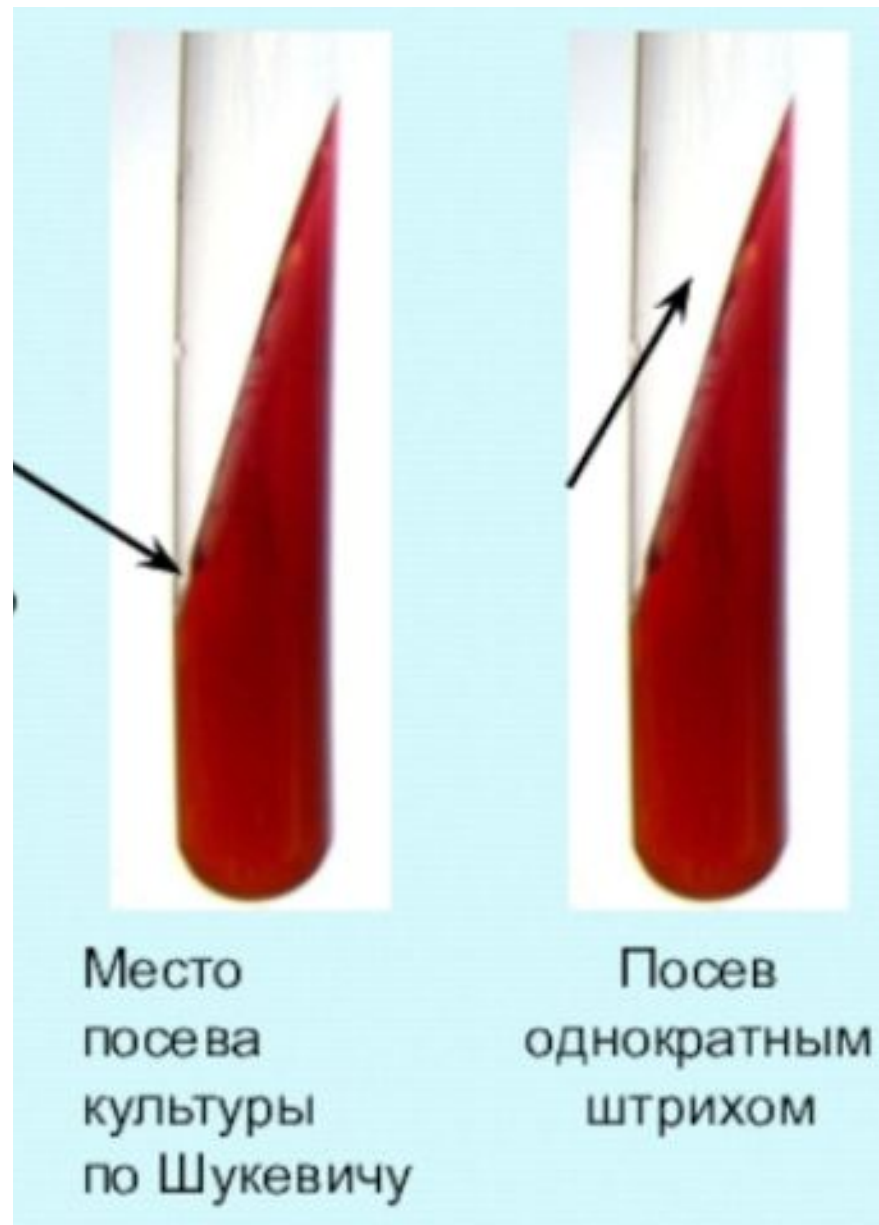
Модификация посева по Дригальски
Материал распределяют по четырём квадратам, проводя петлёй штрихи, обжигая петлю после засева каждого квадрата. Подобный метод позволяет получить изолированные колонии и изучать их.

Техника штрихового посева
при бактериологическом исследовании мочи
("газонный" засев)

Подобный метод позволяет получить изолированные колонии и изучать их. **Исключение составляет техника посева при бактериологическом исследовании мочи.** Указанные методы пригодны для посева аэробных и факультативно анаэробных бактерий, а также нестрогих анаэробов.

Метод Шукевича

- применяется для получения чистой культуры протей и других микроорганизмов, обладающих «ползущим» ростом.
- Посев исследуемого материала производят в конденсационную воду у основания скошенного агара.
- Подвижные микробы (протей) способны подниматься вверх по скошенному агару, неподвижные формы остаются расти внизу на месте посева. Пересекая верхние края культуры, можно получить чистую культуру.



Метод Вейнберга . *Особые трудности возникают при выделении чистых культур облигатных анаэробов.*

Если контакт с молекулярным кислородом не вызывает сразу же гибели клеток, то посев производят по методу Дригальского, но после этого чашки сразу помещают в анаэрошат.

Однако чаще пользуются методом разведения. Сущность его заключается в том, что разведения исследуемого материала проводят в расплавленной и охлажденной до 45-50 ° С агаризированной питательной среде. Делают 6-10 последовательных разведений, затем среду в пробирках быстро охлаждают и заливают поверхность слоем смеси парафина и вазелинового масла, чтобы помешать проникновению воздуха в толщу питательной среды.



МЕТОД МЕМБРАННОЙ ФИЛЬТРАЦИИ



Часто используется при исследовании воды. Жидкий образец или раствор образца в стерильной среде фильтруют в асептических условиях через мембранный фильтр с диаметром пор 0.45-0.8 мкм. Содержащиеся в образце микроорганизмы задерживаются на фильтре,

после чего этот фильтр помещают в чашку Петри на питательную среду (которая пропитывает фильтр снизу и поступает к микробам) и инкубируют при определенной температуре. Удержанные на фильтре микроорганизмы в процессе инкубирования вырастают в колонии, хорошо видимые глазом.

Таким образом, при условии правильного подбора всех условий (фильтра, питательной среды, времени и температуры инкубирования) возможна весьма точная количественная оценка микробной загрязненности образца.

Достоинства метода мембранной фильтрации:

1) количественные результаты анализа, 2) возможность анализировать образцы, содержащие антибиотики или бактериостатические компоненты, а также образцы большого объема, 3)

- **Посев на элективные среды:** в ряде случаев ЧИСТУЮ КУЛЬТУРУ можно получить, подавив размножение части микробов факторами, к которым выделяемый вид устойчив. С этой целью используют антимикробные препараты, химические вещества, бактериофаги. В питательную среду вносят соответствующее вещество или фаг в строго определенной концентрации, препятствующей размножению сопутствующих бактерий, но не оказывающей выраженного ингибирующего действия на исследуемый микроорганизм.
- **Обработка исследуемого материала кислотой или щелочью:** например, микобактерии туберкулеза безразличны к действию концентрированных растворов минеральных кислот, в отличие от остальных микробов, содержащихся в мокроте.
- **Прогревание исследуемого материала при 80 градусах С** в течение 20 мин: для выделения спорообразующих бактерий и уничтожения неспорообразующих. Споры бактерий при этом сохраняются и при посеве прогретого материала на питательную среду прорастают. Если материал содержал только один вид спорообразующих бактерий, таким образом можно получить чистую культуру. Если материал содержал споры разных бактерий, дальнейшее выделение осуществляют стандартными методами.

Отдельные животные проявляют высокую чувствительность к разным микроорганизмам. Например, при любом способе введения *Streptococcus pneumoniae* белым мышам у них развивается генерализованная пневмококковая инфекция. Аналогичная картина наблюдается при заражении гвинейских свинок возбудителями туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis*).

Биологические методы исследований направлены на определение наличия **токсинов возбудителя** в исследуемом материале и на **обнаружение возбудителя** (особенно при незначительном исходном содержании в исследуемом образце).

Методы включают **заражение лабораторных животных исследуемым материалом** с последующим **выделением чистой культуры** патогена либо установлением факта присутствия микробного токсина и его природы.

Для проведения биологических проб **используют только здоровых животных** определённых массы тела и возраста.

Инфекционный материал вводят **внутрь, в дыхательные пути, внутрибрюшинно, внутривенно, внутримышечно, внутрикожно и подкожно, в переднюю камеру глаза, через трепанационное отверстие черепа, субокципитально** (в большую цистерну головного мозга).

Культуральные свойства бактерий

К **культуральным** или макроморфологическим **свойствам** относятся **характерные особенности роста микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах.**

На поверхности плотных питательных сред в зависимости от посева микроорганизмы могут расти в виде колоний, штриха или сплошного газона.

При получении микробного газона **характер роста бактерий** может быть сухим, влажным, "ползучим", складчатым, пигментированным.

Рост микробов на плотной питательной среде.

Для характеристики колоний используют следующие признаки:

- 1. Размер колонии.** (точечные (диаметр менее 1 мм), мелкие (диаметр 1-2 мм), средние (диаметр 2-4 мм) и крупные (диаметр 4-6 мм и более)).
- 2. Форма колонии.** Бывает правильной (круглая), неправильной (амебовидная), ризоидной (корневидная, напоминающая переплетающиеся корни деревьев).
- 3. Контуры края.** Различают ровные края в виде четко выраженной линии и неровные края (фестончатый, волнистый, эрозированный или зазубренный, бахромчатый).
- 4. Рельеф колонии** Различают каплеобразные и куполообразные колонии правильной круглой формы, плоско-выпуклые колонии, конусообразные колонии, колонии с приподнятой серединой, колонии с вдавленным центром, плоские колонии.

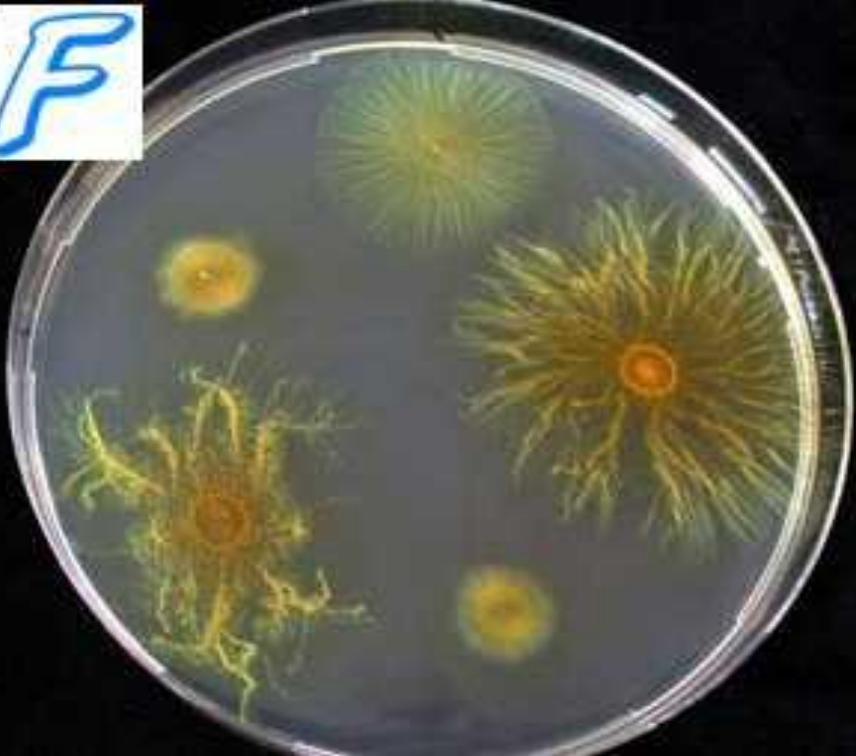
5. Поверхность колонии. Изучают при помощи лупы или под микроскопом при малом увеличении. Поверхность колонии бывает матовая или блестящая с глянцем, сухая или влажная, гладкая или шероховатая. Гладкие колонии обозначают буквой S (smooth - гладкий), шероховатые - буквой R (rough - шероховатый).

6. Цвет колонии. Определяется пигментом, который продуцирует культура микробов. Преобладающее большинство патогенных бактерий пигмента не образует, вследствие чего колонии их бесцветны или молочно-мутного цвета. Пигментообразующие виды микробов дают колонии различных цветов: кремовые, желтые, золотисто-оранжевые, синие, красные, сиреневые, черные и др.

7. Структура колоний. Определяется в проходящем свете при слабом увеличении микроскопа, суженной диафрагме или при несколько опущенном конденсоре. По структуре различают гиалиновые колонии, зернистые колонии, нитевидные или волокнистые колонии.

8. Консистенция колоний. Исследуют посредством прикосновения или взятия из нее части материала бактериологической петлей. По характеру консистенции колонии бывают пастообразные, вязкие или слизистые, волокнистые или

F

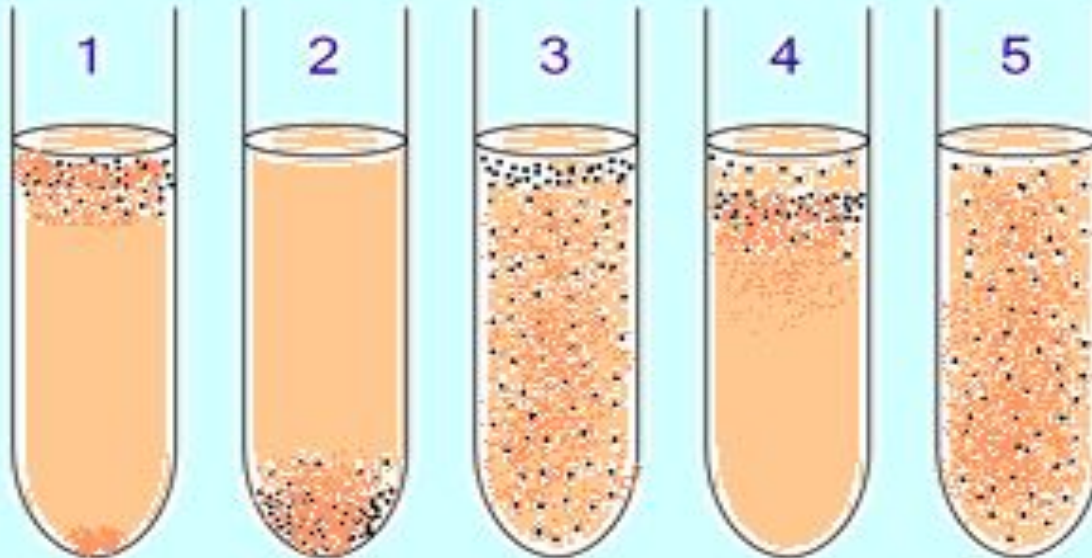


Пигментные микроорганизмы

- *Некоторые виды микроорганизмов способны образовывать красящие вещества — пигменты красные, синие, желтые, фиолетовые и др. Цвет пигмента определяется по окраске колоний на плотной питательной среде, а иногда и по цвету жидкой питательной среды.*
- **Красный пигмент** вырабатывают некоторые бактерии, актиномицеты и дрожжи. Особый интерес представляет *Chromobacterium (Bact.) prodigiosum*, названная «чудесной палочкой», чаще всего растущая на крахмалистых продуктах и на стенах сырых помещений в виде кроваво-красных пятен (колоний).
- Красный пигмент образуют некоторые виды галофильных бактерий, например *Serratia salinaria* (серрация салинария) — синоним *Pseudomonas salinaria* — была впервые описана канадскими учеными (Гаррисон и Кеннеди, 1922 г.) и обстоятельно изучена советскими исследователями (Б. И. Курочкин, К. Г. Емельянчик). Микроб обнаружен в соли некоторых озер Советского Союза, а также в соли зарубежных стран. Галофильные бактерии обуславливают покраснение рапы, соленых озер, соленой рыбы, засоленных кож и шкур и нередко наносят колоссальные убытки.
- **Синий пигмент** продуцируется синегнойной палочкой (*Pseudomonas pyocyanea*), которая нередко обнаруживается в загрязненных ранах и окрашивает гной в синевато-зеленый цвет.
- Микроб *Pseudomonas synchyanea* вызывает порок молока, окрашивая его в синий цвет.
- **Желтый пигмент** вырабатывается **стафилококками и сарцинами**.
- **Черный и бурый** пигменты продуцируют некоторые виды **грибов и дрожжей**.

Особенности микробного роста на жидких питательных средах.

- 1 и 4. Поверхностный рост бактерий, характеризующийся появлением на поверхности жидкой питательной среды пленки или скопления под поверхностью.
- 2. Придонный рост бактерий, характеризующийся образованием осадка на дне пробирки с жидкой питательной средой.
- 3. Пристеночный рост бактерий, выражающийся в образовании рыхлых хлопьев, прикрепленных к внутренней поверхности стенок сосуда.
- 5. Рост бактерий с равномерным помутнением среды.
- **Рост на полужидкой питательной среде** характеризуется помутнением всей толщи среды или образованием сосульки цилинд



Определение количества микроорганизмов в исследуемом материале методом серийных разведений с последующим посевом по Коху

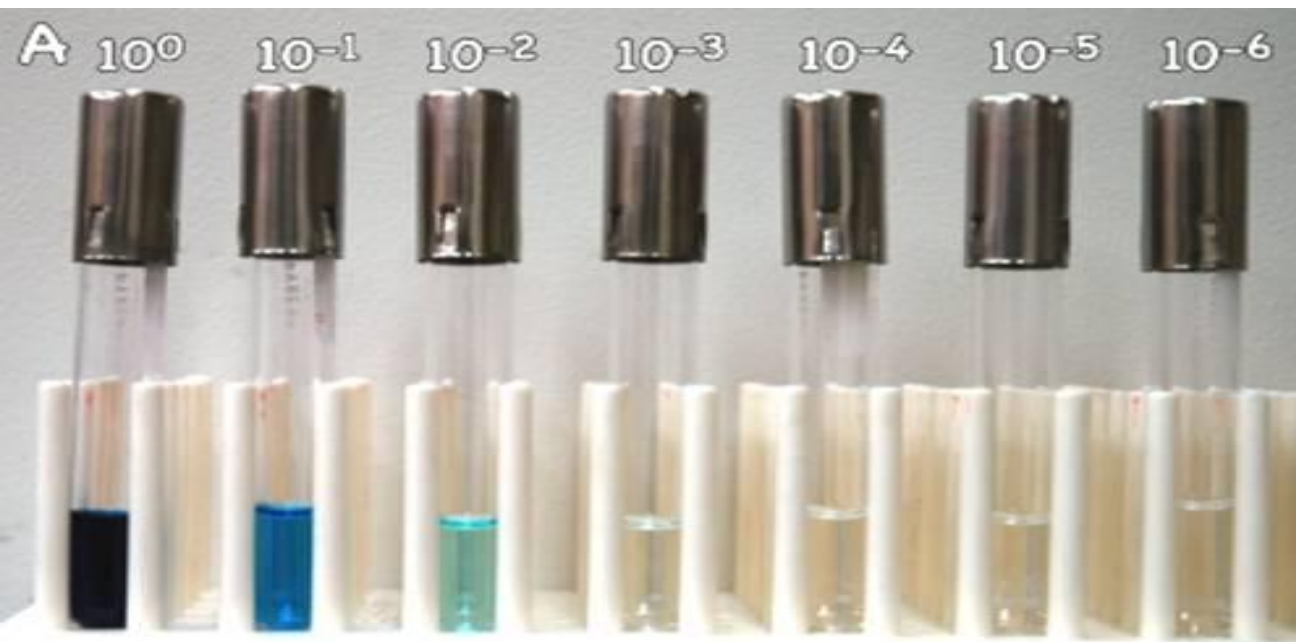
Итак, для того, чтобы выделить чистую культуру микроорганизмов, следует отделить многочисленные бактерии, которые находятся в материале, одна от другой. Это можно достичь с помощью методов, которые основаны на двух принципах -

~~механическом и биологическом разобщении бактерий~~

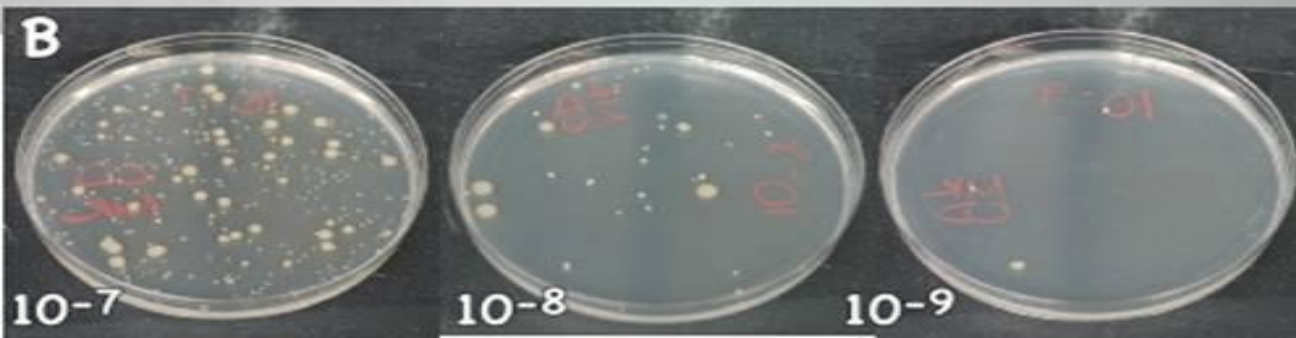
Механический принцип	Биологический принцип
<p data-bbox="382 625 620 672" style="text-align: center;">МЕТОДЫ</p> <ol data-bbox="104 689 813 1119" style="list-style-type: none"><li data-bbox="104 689 813 803">1. Фракционных разведений Л. Пастера<li data-bbox="104 815 813 929">2. Пластинчатых разведений Р. Коха<li data-bbox="104 941 813 1055">3. Поверхностных посевов Дригальского<li data-bbox="104 1066 813 1119">4. Поверхностных штрихов	<p data-bbox="1267 625 1505 672" style="text-align: center;">МЕТОДЫ</p> <p data-bbox="913 689 1499 736">Принимают во внимание:</p> <ul data-bbox="913 753 1789 1183" style="list-style-type: none"><li data-bbox="913 753 1702 801">а - тип дыхания (метод Фортнера);<li data-bbox="913 818 1727 865">б - подвижность (метод Шукевича);<li data-bbox="913 882 1483 929">в - кислотоустойчивость;<li data-bbox="913 946 1406 993">г - спорообразование;<li data-bbox="913 1011 1566 1058">д - температурный оптимум;<li data-bbox="913 1075 1789 1183">е - избирательную чувствительность лабораторных животных к бактериям

Определение количества микроорганизмов в исследуемом материале методом серийных разведений с последующим посевом по Коху

Метод Коха - последовательное разведение исследуемого материала в расплавленном агаре (температура 48-50 ° C), с последующим разливом в чашки Петри, где агар застывает.



Высевы делают, как правило, из трех-четырех последних разведений, где бактерий становится мало и, в дальнейшем, при росте на чашках Петри появляются изолированные колонии, образующиеся из одной исходной материнской клетки.



Подсчет выросших колоний в разведениях

- Количество выросших колоний подсчитывают на каждой чашке, поместив ее вверх дном на темном фоне, пользуясь лупой с увеличением в 4 - 10 раз. Каждую подсчитанную колонию отмечают на дне чашки маркером. При подсчете колоний рекомендуется пользоваться счетчиками.
- При большом числе колоний и равномерном их распределении дно чашки Петри делят на четыре и более одинаковых секторов, подсчитывают число колоний на двух-трех секторах (но не менее чем на 1/3 поверхности чашки), находят среднее арифметическое число колоний и умножают на общее количество секторов всей чашки. Таким образом находят общее количество колоний, выросших на одной чашке.
- **Общее количество бактерий в 1 мл или 1 г продукта (X) в единицах вычисляют по формуле:**

$$X = n \times 10^m ,$$

где n - количество колоний, подсчитанных на чашке Петри;

- m - число десятикратных разведений.
- За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое, полученное по всем чашкам.

Рост культуры бактерий на жидкой питательной

Концентрация клеток в единице объема

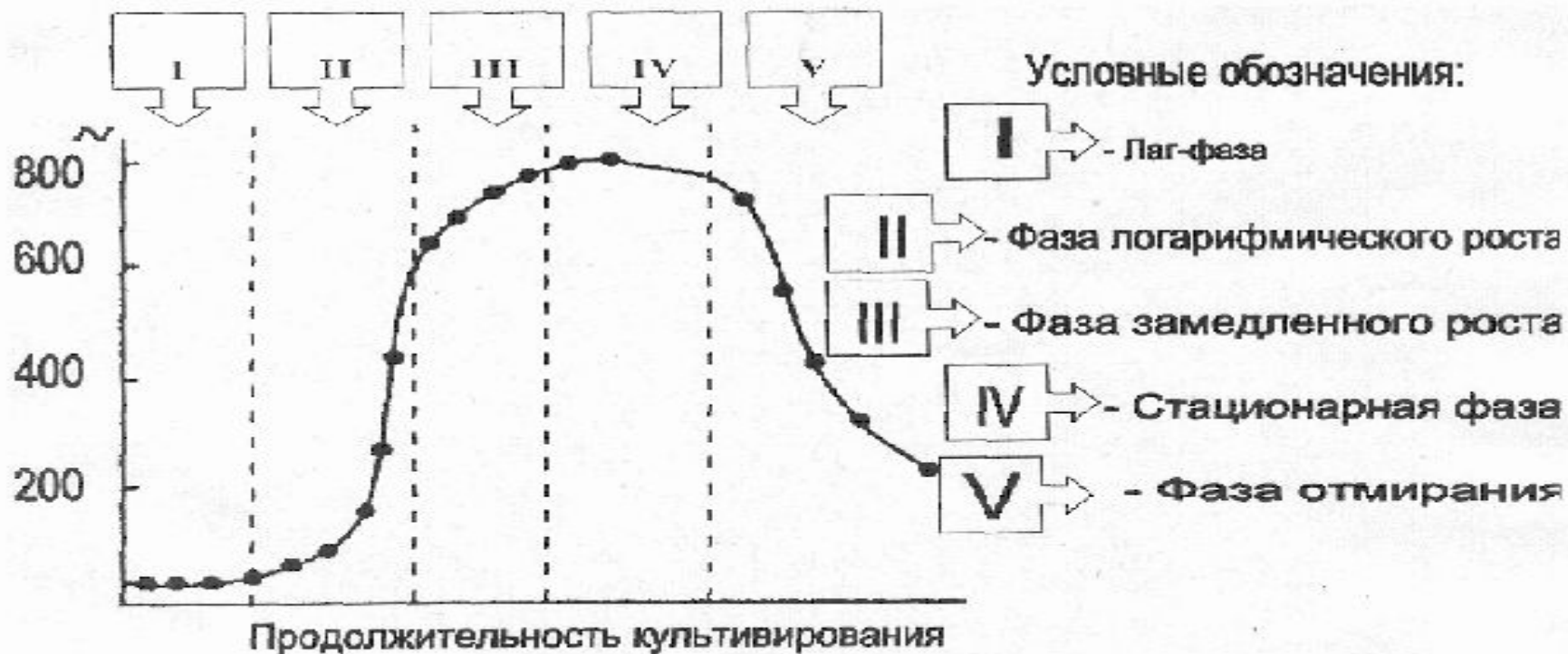


Рисунок 6- Фазы жизненного цикла микроорганизмов

Фазы роста культуры бактерий на жидкой питательной среде

- После внесения в среду бактерии адаптируются к её условиям и размножаются сравнительно медленно (лаг-фаза). Лаг-фаза роста бактерий соответствует периоду физиологического приспособления, включающего индукцию ферментов, синтез и сборку рибосом.
- Экспоненциальная фаза роста бактерий (логарифмическая) характеризуется максимальной скоростью клеточного деления. Время генерации (то есть время, необходимое для удвоения количества бактерий) на оптимальной среде может быть коротким (у кишечной палочки 20 мин), либо продолжительным (у *Mycobacterium tuberculosis* 6 ч). В этой фазе в среде происходит максимальное накопление метаболитов бактерий (например, токсинов, бактериоцинов).
- Стационарная фаза роста бактерий. В течение этого периода доступность важнейших питательных веществ становится лимитирующим фактором. Устанавливается равновесие между клеточным ростом и делением и процессом отмирания клеток.
- Фаза отмирания (спада, лизиса) включает период логарифмической гибели, переходящий в период уменьшения скорости отмирания бактерий. Причины гибели бактерий в нормальных питательных средах до конца не ясны. Понятны случаи, когда в среде накапливаются кислоты (при росте *Escherichia*, *Lactobacillus*). Иногда бактерии разрушаются под действием собственных ферментов (аутолиз). Скорость отмирания широко варьирует в зависимости от условий обитания и особенностей микроорганизма (например, энтеробактерии отмирают медленно, а бациллы — быстро).

Этапы выделения чистых культур микроорганизмов

- В первый день (1 этап исследования) в стерильную посуду (пробирка, колба, флакон) забирают патологический материал.
- Его изучают по внешнему виду, консистенции, цвету, запаху и другим признакам, готовят мазок, красят и исследуют под микроскопом.
- В некоторых случаях (острая гонорея, чума) на этом этапе можно поставить предварительный диагноз, а кроме того, подобрать среды, на которые будет засеиваться материал.
- **Засев** проводят бактериологической петлей (применяется чаще всего), с помощью шпателя по методу Дригальского, ватно-марлевым тампоном.
- Чашки закрывают, переворачивают вверх дном, подписывают специальным карандашом и ставят в термостат при оптимальной температуре (37 °С) на 18-24 ч.
 - **Цель этапа – получить изолированные колонии микроорганизмов**

- **На второй день (2 этап исследования)** на поверхности плотной питательной среды микроорганизмы образуют сплошной, густой рост или изолированные колонии.
- **Колония** – это видимые невооруженным глазом скопления бактерий на поверхности или в толще питательной среды.
- Как правило, каждая колония формируется из потомков одной микробной клетки (клоны), потому их состав достаточно однороден.
- Особенности роста бактерий на питательных средах являются проявлением их **культуральных свойств**.

- **На третий день (3 этап исследования)** изучают характер роста чистой культуры микроорганизмов и проводят ее идентификацию.
- **Сначала обращают внимание** на особенности роста микроорганизмов на среде и **делают мазок, покрасив его методом Грама с целью проверки чистоты культуры.**
- **Если под микроскопом** наблюдают бактерии однотипной морфологии, размеров и тинкториальных (способность краситься) свойств, делают вывод, что культура чиста.
- **Однако этих исследований недостаточно,** чтобы сделать окончательный вывод о виде выделенных микробов. Поэтому **изучают биохимические, антигенные и другие**

Механизмы питания

Поступление различных веществ в бактериальную клетку зависит от величины и растворимости их молекул в липидах или воде, рН среды, концентрации веществ, различных факторов проницаемости мембран и др. Клеточная стенка пропускает небольшие молекулы и ионы, задерживая макромолекулы массой более 600 Д.

Основным регулятором поступления веществ в клетку является цитоплазматическая мембрана.

Условно можно выделить **четыре механизма** проникновения питательных веществ в бактериальную клетку:

- * простая диффузия,
- * облегченная диффузия,
- * активный транспорт,
- * транслокация групп.

Наиболее простой механизм поступления веществ в клетку - **простая диффузия**, при которой перемещение веществ происходит вследствие разницы их концентрации по обе стороны цитоплазматической мембраны.

Вещества проходят через липидную часть цитоплазматической мембраны (органические молекулы, лекарственные препараты) и реже по заполненным водой каналам в цитоплазматической мембране.

Простая (пассивная) диффузия осуществляется без затраты энергии.

Облегченная диффузия происходит также в результате разницы концентрации веществ по обе стороны цитоплазматической мембраны.

Однако этот процесс осуществляется с помощью молекул белка-переносчиков (пермеаз), локализующихся в цитоплазматической мембране и обладающих специфичностью - каждый переносчик транспортирует через мембрану соответствующее вещество или передает другому компоненту цитоплазматической мембраны - собственно переносчику.

Активный транспорт происходит с помощью пермеаз и направлен на перенос веществ от меньшей концентрации в сторону большей, т.е. как бы против течения, поэтому данный процесс сопровождается затратой метаболической энергии (АТФ), образующейся в результате окислительно-восстановительных реакций в клетке.

Перенос (транслокация) групп сходен с активным транспортом, отличаясь тем, что переносимая молекула видоизменяется в процессе переноса, например, фосфорилируется.

Выход веществ из клетки осуществляется за счет диффузии и при участии транспортных систем.

Большинство бактерий, имеющих медицинское значение, являются **гетерохемотрофами**, *которые питаются по законам осмоса.*

Гетеротрофы - источник усвояемого углерода – органические вещества, напр., гексозы, многоатомные спирты, аминокислоты.

Хемотрофы - источник энергии (запасается в форме молекул АТФ)– окислительно-восстановительные реакции

Органотрофы - используют в качестве доноров электронов органические соединения.

Для роста и размножения бактерии нуждаются в питательных веществах: им необходимы источники углерода, азота, витамины, минералы и другие соединения сложного и простого состава.

Кроме того, среди бактерий встречаются как легко культивируемые, так и требовательные к питательным веществам микроорганизмы (прихотливые), которым необходимы дополнительные факторы роста.

Питательные среды - это искусственные среды того или иного состава, предназначенные для культивирования микробов и простейших в лабораторных условиях.

Состав сред определяется метаболическими потребностями той или иной группы бактерий.

Впервые питательные среды были введены для изолирования отдельных видов бактерий Р. Кохом в 1881 году, что создало базу для всей современной микробиологии и способствовало ее быстрому расцвету.

Значение питательных сред: благодаря их применению имеется возможность не только выделить микроб в чистом виде, но и постоянно поддерживать его в культуре в лаборатории, что облегчает его всестороннее изучение.

Требования, предъявляемые к питательным средам

- **Наличие необходимых питательных веществ в достаточном количестве и легкоусвояемой форме.**

Азот, углерод и водород для построения собственных белков: водород и кислород для клеток поставляет вода; источник азота - вещества животного происхождения (мясо говяжье, рыба, мясокостная мука, казеин), а также белковые гидролизаты, пептиды, пептоны.

Ростовые факторы (витамины, ферменты). Источник - экстракты из белков животного и растительного происхождения, белковые гидролизаты; нативные субстраты - кровь, сыворотка, асцитическая жидкость, яичный желток, кусочки печени, почек, мозговой ткани и др.

Микроэлементы - среды должны содержать ионы железа, меди, марганца, цинка, кальция, натрия, калия и др. Их добавляют в питательную среду в виде солей, чаще всего фосфатов.

- **Оптимальная кислотность (pH).**

Поддержание определенного pH имеет значение для предотвращения гибели микроорганизмов от ими же образованных продуктов обмена. С этой целью питательную среду забуферивают, чаще всего используя фосфатный буфер.

- **Оптимальный редокс-потенциал (rH_2).**

Окислительно-восстановительный потенциал (редокс-потенциал) — мера способности химического вещества присоединять электроны (восстанавливаться).

- **Изотоничность.**

Среда должна обладать определенным осмотическим давлением. Большинство бактерий способны расти на изотоничных средах, изотоничность которых достигается добавлением NaCl в концентрации 0,87 %. Некоторые бактерии не способны расти на средах при концентрации соли в них ниже 1 %. Такие бактерии называются *галофильными*.

- **Влажность.**

Каждая питательная среда должна содержать воду, так как все процессы жизнедеятельности бактерий протекают в воде.

- **Нетоксичность для исследуемых микробов.**

Допустимым является употребление веществ, которые устраняют действие ингибиторов роста и токсинообразования микробов (отдельные аминокислоты, твин, активированный уголь и т.п.).

- **Определённая вязкость.**

Плотность (вязкость) среды достигается добавлением агара - полисахарида, получаемого из водорослей. Он плавится при температуре 100 °С, но при охлаждении застывает при 45-50 °С. Агар добавляют в концентрации 0,5 % — для полужидких сред и 1,5—2 % — для создания плотных сред.

- **Стерильность. Прозрачность.**

Классификация питательных сред:

По исходным компонентам:

натуральные среды — готовят из продуктов животного и растительного происхождения (мясо, костная и рыбная мука, кормовые дрожжи, сгустки крови и др.)

синтетические среды — готовят из определённых химически чистых органических и неорганических соединений, взятых в точно указанных концентрациях и растворённых в дважды дистиллированной воде.

По консистенции(степени плотности):

жидкие

полужидкие

плотные

Плотные и полужидкие среды готовят из жидких, к которым прибавляют агар-агар **или желатин**. Кроме того, в качестве плотных сред применяют свёрнутую сыворотку крови, свёрнутые яйца, картофель, среды с силикагелем. *Некоторые микроорганизмы используют желатин как питательное вещество — при их росте желатиновая среда разжижается.*

Классификация питательных сред:

По составу:

простые: мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), питательный желатин,

сложные — готовят, прибавляя к простым средам кровь, сыворотку, углеводы и другие вещества.

По назначению:

основные — служат для культивирования большинства патогенных микробов. МПБ, МПА, бульон и агар Хоттингера, пептонная вода.

специальные — служат для выделения и выращивания микроорганизмов, не растущих на простых средах.

Элективные (избирательные) — служат для выделения определённого вида микробов, росту которых они благоприятствуют, задерживая или подавляя рост сопутствующих микроорганизмов. Среда становится элективной при добавлении к ней определённых антибиотиков, солей, изменения pH. Жидкие элективные среды называют средами *накопления*.

дифференциально-диагностические — позволяют отличить один вид микробов от другого по ферментативной активности.

консервирующие — предназначены для первичного посева и транспортировки исследуемого материала.

Классификация питательных сред

Простые	Сложные
Жидкие: ПВ, МПБ	Специальные: сахарный МПА и МПБ, сывороточный бульон и МПА, кровяной МПА, МПА с асцитической жидкостью
Плотные: МПЖ, МПА	Обогащение, накопление: селенитовый МПБ, Мюллера, Кауффмана, Китт-Тароцци
	Элективные: 1% щелочная ПВ
	Дифференциально-диагностические:
	1. для определения сахаролитических свойств (Гисса, Эндо, Левина, Плоскирева)
	2. для определения протеолитических свойств (свернутая сыворотка, МПЖ, кусочки мышц в среде Тароцци)
	3. для определения пептолитических свойств (МПБ, ПВ)
	4. для определения гемолитических свойств (кровяной МПА)
	5. для определения редуцирующих свойств (среды с разными красителями)



Кровяной агар: питательная среда, содержащая в составе кровь животных. Предназначен для выделения и культивирования прихотливых микроорганизмов, а также их первичной дифференциации по типу гемолиза.

Тип среды: универсальная. Питательная основа: мясопептонный агар. Элективного фактора нет. Дифференцирующий фактор: гемоглобин.

Кишечные палочки образуют на кровяном агаре непигментированные колонии без зон гемолиза. Стафилококки – пигментированные колонии с зонами гемолиза.

Дифференциально-диагностические среды:

позволяют различать бактерии по их росту, биохимической (ферментативной) активности и другим признакам.

В состав этих сред, кроме питательных веществ, обычно включают субстрат, по отношению к которому дифференцируются бактерии, и индикатор.

Колонии и среда окрашиваются в цвет индикатора при наличии искомым микроорганизмов.

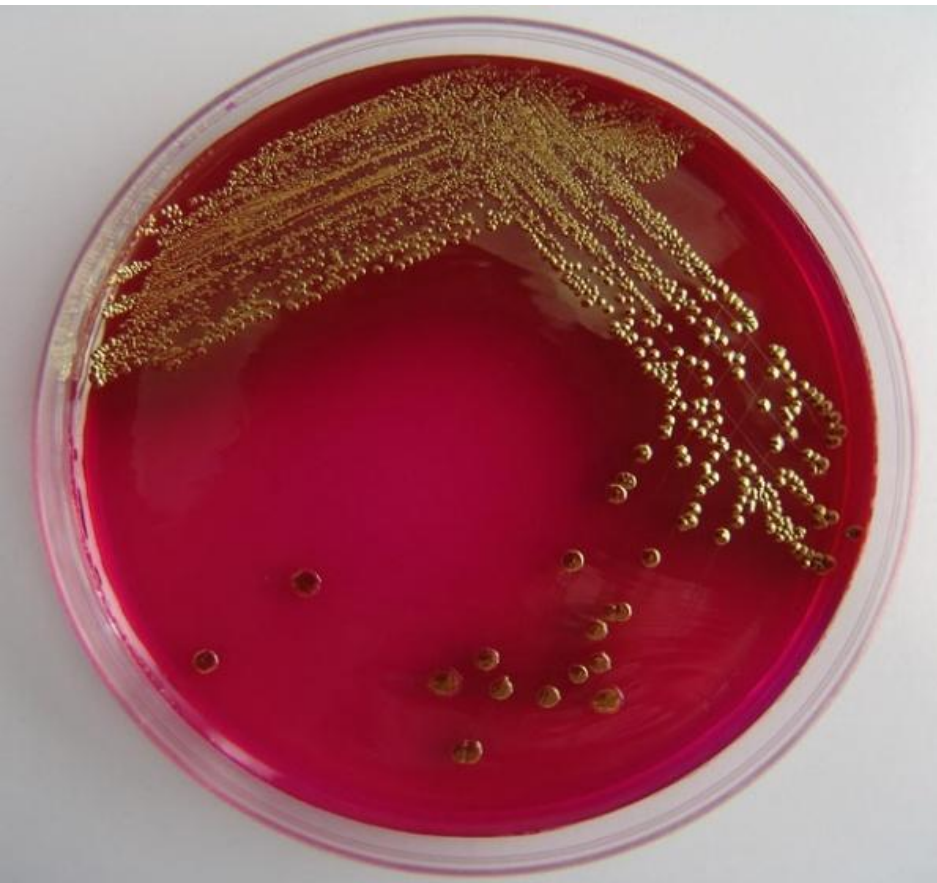
Жидкие и полужидкие среды Гисса - среды для выявления ферментативной активности ***бактерий кишечной группы***.

Содержат 1% пептонную воду, 0,5% раствор определенного углевода (глюкоза, лактоза, мальтоза, манит, сахароза и др.) и индикатор Андреде (кислый фуксин в растворе NaOH).

Среда при pH 7,2-7,4 – бесцветна, при ферментации углеводов приобретает красный цвет. В пробирки со средой помещают поплавки (небольшая трубочка, один конец которой запаян) для улавливания газообразных продуктов, образующихся при расщеплении углеводов.

Среда Эндо

- дифференциально-диагностическая питательная среда, предназначенная для выделения патогенных бактерий кишечной группы (энтеробактерий). Обладает слабыми селективными свойствами, компоненты среды (фуксин, сульфит натрия) подавляют рост грамположительных бактерий.
- Состав среды: мясопептонный агар, лактоза, фуксин, сульфит натрия (Na_2SO_3).
- Фуксин обесцвечивается сульфитом натрия (образуется бесцветная фуксинсернистая кислота — реактив Шиффа). Энтеробактерии, сбраживающие лактозу, в процессе брожения выделяют муравьиную кислоту, которая даёт цветную реакцию с фуксинсернистой кислотой с образованием свободного фуксина, в результате чего их колонии окрашиваются в малиново-красный цвет с металлическим блеском или без него. Колонии бактерий, не сбраживающих лактозу, имеют белый или слабо-розовый цвет (цвет питательной среды).



Рост на среде

Эндо

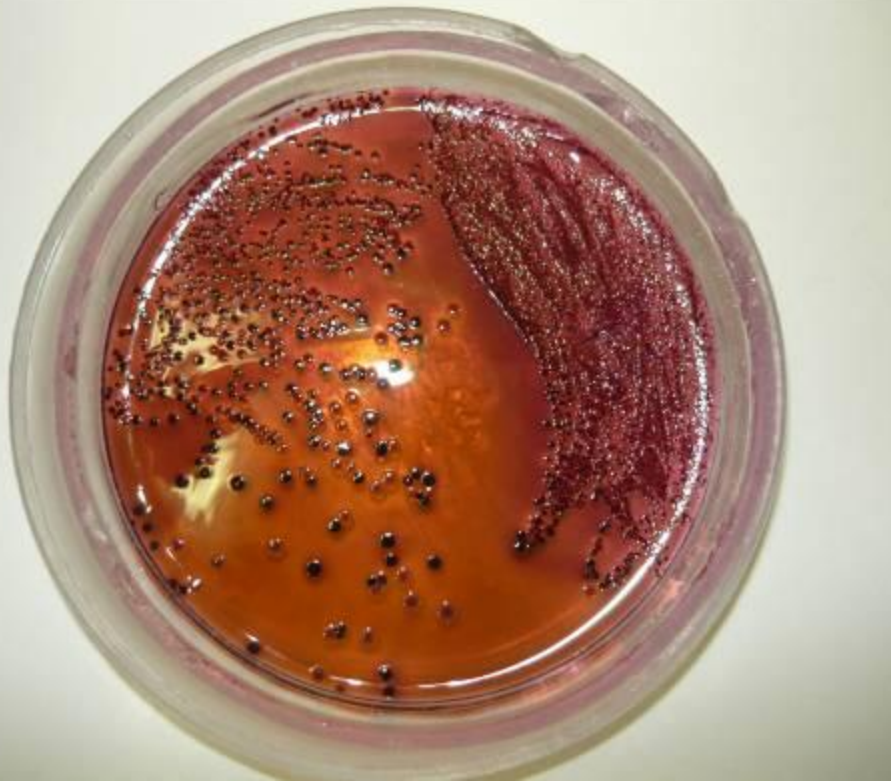
Сальмонеллы и шигеллы (микроорганизмы, не разлагающие лактозу) на среде Эндо образуют бесцветные колонии, кишечная палочка и другие разлагающие лактозу микроорганизмы — малиново-красные колонии с металлическим блеском или без него

Среда Плоскирева — селективно-дифференциальная среда для выделения шигелл и сальмонелл (**возбудители брюшного тифа, паратифов, дизентерий**). Ингибирующие вещества (желчные соли, бриллиантовый зеленый, йод), входящие в состав среды, полностью подавляют рост грамположительной микрофлоры и в 2-3 раза рост кишечной палочки, не препятствуя росту шигелл и сальмонелл.

Среда содержит питательный агар с лактозой, бриллиантовым зеленым, солями желчных кислот, минеральными солями и индикатором (нейтральный красный). Готовая среда прозрачна, имеет розовато-желтоватый цвет.

Дифференцирующие свойства среды основаны на изменении pH в кислую сторону при росте **лактозоферментирующих** бактерий, которые образуют на среде колонии малинового цвета (индикатор нейтральный красный). **Лактозонегативные** колонии вырастают бесцветными

На некоторых модификациях среды Плоскирева выявляется еще и способность сальмонелл выделять сероводород: **выросшие колонии чернеют**



Тест-штамм

S. flexneri 1a 8516

S. typhi H-901 ГДР/ГИСК

S. paratyphi A-225

S. sonnei «S form»

E. coli 3912/41 (O55:K59)

Наблюдаемый эффект

бесцветные, нежные, гладкие, круглые диаметром 1,0-2,0 мм.

бесцветные, нежные, гладкие, круглые диаметром 1,0-2,0 мм.

бесцветные, нежные, гладкие, круглые диаметром 1,0-2,0 мм.

бесцветные или слегка розового цвета, нежные, гладкие, круглые диаметром 1,0-2,0 мм.

малинового цвета, круглые, выпуклые, гладкие диаметром 1,5-2,5 мм.

Принцип действия основан на выявлении высокоспецифичных ферментов у искомым микроорганизмов.

К таким ферментам относятся бета-D-глюкуронидаза *Escherichia coli* или бета-D-глюкозидаза энтерококков.

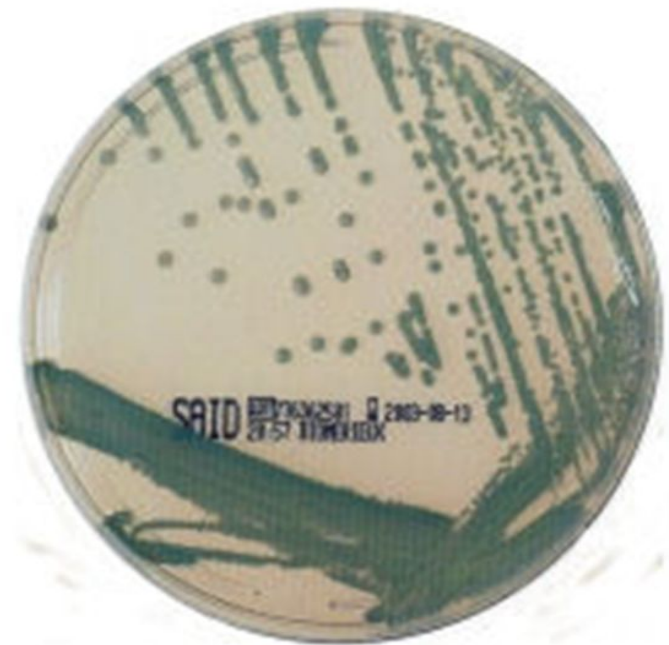
Для обнаружения уникального фермента и, соответственно, идентификации микроорганизма, в состав среды вводят хромогенный субстрат – вещество, при расщеплении которого этим ферментом образуются окрашенные и/или флюоресцирующие продукты.

В результате микробный рост окрашивается в определенный цвет или приобретает способность к флюоресценции при ультрафиолетовом облучении.

Хромогенный агар для селективного выделения стафилококков и прямой идентификации *S. Aureus*.

Прямая быстрая идентификация *S. aureus* основана на том, что колонии продуцирующих α -глюкозидазу микроорганизмов спонтанно окрашиваются в зеленый цвет.

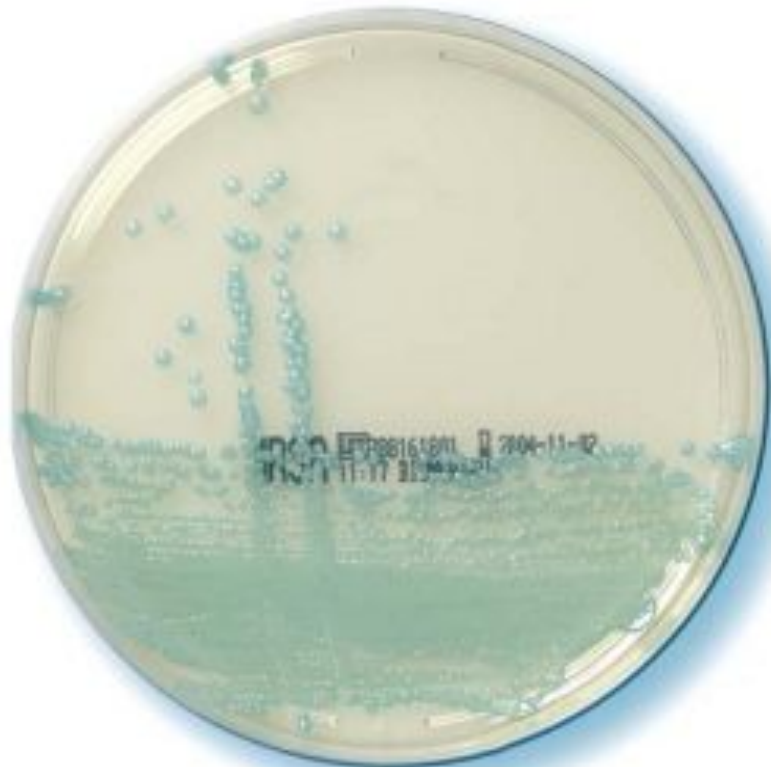
Учет результата - через 18-24 часа после посева образца.



Хромогенный агар для определения метициллинрезистентных штаммов *S. aureus* (MRSA)

Этот агар предназначен для прямой, не требующей подтверждения идентификации метициллинрезистентных (MRSA) штаммов *Staphylococcus aureus*.

Его использование облегчает активный мониторинг штаммов MRSA и контроль нозокомиальных инфекций в лечебных учреждениях.



Прямая идентификация штаммов MRSA основана на спонтанном окрашивании в зеленый цвет колоний микроорганизмов, продуцирующих α -глюкозидазу, и на присутствии в агаре антибиотика цефокситина.

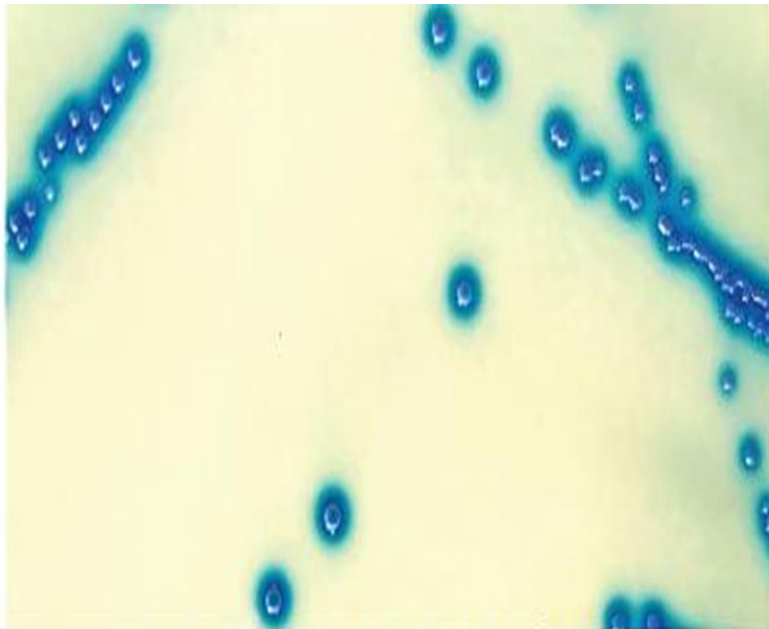
Хромогенная селективная и дифференциальная питательная среда

для выделения стрептококков группы В

Пептоны, продукты контролируемого ферментного гидролиза казеина, совместно с сердечной вытяжкой является источником пептидов и свободных аминокислот.

Дрожжевой экстракт играет роль источника аминокислот и витаминов группы В.

Хромогенная селективная смесь обеспечивает ингибирование роста грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов, за исключением *S.agalactiae*, а также его дифференциацию от других стрептококков.



Streptococcus agalactiae ATCC® 13813



Enterococcus faecalis ATCC® 19433

**ДЕЙСТВИЕ ФИЗИЧЕСКИХ И
ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ
ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА
МИКРООРГАНИЗМЫ.**

ФИЗИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

- **ТЕМПЕРАТУРА**
- **ВЫСУШИВАНИЕ**
- **ЛУЧИСТАЯ ЭНЕРГИЯ**
- **УЛЬТРАЗВУК**
- **ДАВЛЕНИЕ**



ТЕМПЕРАТУРА

- **Высокая температура вызывает коагуляцию структурных белков и ферментов микроорганизмов. Большинство вегетативных форм гибнет при температуре 60°C в течение 30 мин, а при 80-100°C – через 1 мин.**
- **Споры бактерий устойчивы к температуре 100°C, гибнут при 130°C и при более длительной экспозиции.**
- **Для сохранения жизнеспособности относительно благоприятны низкие температуры. Бактерии выживают при температуре ниже –100°C; споры бактерий и вирусы годами сохраняются в жидком азоте (до –250°C).**



КЛАССИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К ТЕМПЕРАТУРЕ

- **Термофильные виды** (теплолюбивые) Зона оптимального роста равна 50-60°C, верхняя зона задержки роста - 75°C. Термофилы обитают в горячих источниках.
- **Психрофильные виды** (холодолюбивые) растут в диапазоне температур 0-10°C. Температура, задерживающая рост - 20-30°C. К ним относят большинство сапрофитов, обитающих в почве, пресной и морской воде. Но есть некоторые виды, вызывающие заболевания у человека.
- **Мезофильные виды** лучше растут в пределах 20-40°C; максимальная 43-45°C, минимальная 15-20°C. В окружающей среде могут переживать, но обычно не размножаются. К ним относится большинство патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

ВЫСУШИВАНИЕ.

- **Высушивание приводит к обезвоживанию цитоплазмы, нарушается целостность цитоплазматической мембраны, что ведет к гибели клетки.**

При относительной влажности окружающей среды ниже 30% жизнедеятельность большинства бактерий прекращается.

Время их отмирания при высушивании различно.

Особой устойчивостью обладают споры бактерий.



ЛУЧИСТАЯ ЭНЕРГИЯ.

- Наибольший бактерицидный эффект оказывают коротковолновые УФ-лучи с длиной волны 200—400 нм. Они инактивируют ферменты клетки и разрушают ДНК.
- Бактерицидное действие УФ-лучей используют для дезинфекции закрытых помещений: операционных, родильных отделений, перевязочных, в детских садах и т. д. , а также для стерилизации термолабильных материалов.
- Ионизирующее излучение: инактивация микроорганизмов под действием гамма-лучей происходит в результате повреждения нуклеиновых кислот.



УЛЬТРАЗВУК

Ультразвук вызывает поражение клетки. Под действием ультразвука внутри клетки возникает очень высокое давление. Это приводит к разрыву клеточной стенки и гибели клетки. Ультразвук используют для стерилизации и хранения стерильных материалов.



ВЫСОКОЕ ДАВЛЕНИЕ.

Сочетанное действие повышенных температур и повышенного давления используется в паровых стерилизаторах (автоклавах) для стерилизации паром под давлением (автоклавирования).



ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ.

В малых концентрациях химическое вещество может являться питанием для бактерий, а в больших — оказывать на них губительное действие. Способность ряда химических веществ подавлять жизнедеятельность микроорганизмов зависит от концентрации химических веществ и времени контакта с микробом (экспозиции).



МИКРОБНАЯ ДЕКОНТАМИНАЦИЯ

полное или частичное удаление микроорганизмов с объектов внешней среды и биотопов человека с помощью факторов прямого повреждающего действия.

Может быть выделено

два принципиально различных типа деконтаминации:

Микробная деконтаминация
объектов внешней среды

Дезинфекция
Стерилизация

Микробная деконтаминация
живых организмов

Антисептика
Химиотерапия

Асептика

□ **Антисептика**- совокупность способов уничтожения и подавления роста и размножения потенциально опасных для здоровья человека микроорганизмов в ранах, на коже, слизистых и полостях.

□ **Асептика**-совокупность прямых и косвенных методов воздействия на микроорганизмы с целью создания безмикробной зоны или зоны с резко сниженной численностью микроорганизмов.



ДЕЗИНФЕКЦИЯ

комплекс мероприятий, направленных на уничтожение возбудителей инфекционных заболеваний и разрушение токсинов на объектах внешней среды.

1. **Профилактическая** — проводится постоянно, независимо от эпидемической обстановки.
2. **Очаговая:**
 - **текущая** — проводится при наличии инфекции с целью предупреждения распространения инфекционных заболеваний за пределы очага.
 - **заключительная** — проводится после изоляции, госпитализации, выздоровления или смерти больного с целью освобождения эпидемического очага от возбудителей.

СТЕРИЛИЗАЦИЯ

Полное освобождение объектов окружающей среды от микроорганизмов и их спор.

МЕТОДЫ ДЕЗИНФЕКЦИИ:

- **Механический** - основан на механических приемах удаления возбудителей инфекционных заболеваний
- **Физический** - воздействие различных видов высокой температуры а также ультрафиолетового облучения, облучение токами высокой частоты и ультразвуком.
- **Химический** (основной способ) - уничтожении болезнетворных микроорганизмов и разрушении токсинов дезинфицирующими веществами.
- **Комбинированный.**

автомат для мойки и дезинфекции



СПОСОБЫ ДЕЗИНФЕКЦИИ:

- КИПЯЧЕНИЕ
- ОРОШЕНИЕ
- ПРОТИРАНИЕ
- ПОГРУЖЕНИЕ (ЗАМАЧИВАНИЕ)
- ЗАСЫПАНИЕ



ТРЕБОВАНИЯ К ДЕЗИНФЕКТАНТАМ

ДЕЗИНФЕКТАНТЫ должны обладать

- широким спектром действия
- микробицидным эффектом,
- хорошо растворяться в воде и образовывать стойкие активные растворы
- обладать низкой токсичностью и аллергенностью
- сохранять активность в обеззараживаемой среде
- не повреждать обеззараживаемые объекты
- не иметь неприятного запаха
- быть экологически чистыми



При химических способах дезинфекции применяются **кислоты, щелочи, окислители, соли тяжелых металлов, фенолы и т.д.**

МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ, РАЗРЕШЕННЫЕ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛПУ.

Тип метода	Метод	Стерилизующий агент
Физический (термический)	Паровой	Водяной насыщенный пар под избыточным давлением
	Воздушный	Сухой горячий воздух
	Инфракрасный	Инфракрасное излучение
	Гласперленовый	Среда нагретых стеклянных шариков
Химический	Газовый	Окись этилена
	Плазменный	Пары перекиси водорода в сочетании с их низкотемпературной плазмой
	Жидкостный	Растворы химических средств (альдегид-, кислород- и хлорсодержащие)

- В бактериологических лабораториях используется следующие **методы стерилизации**:
- **Прокаливание.** Этот способ применяют для обеззараживания бактериологических петель и шпателей. Для прокаливания над огнем используют спиртовки или газовые горелки.
- Чаще всего в бактериологических лабораториях используются **паровая и суховоздушная стерилизация.**



ПАРОВАЯ СТЕРИЛИЗАЦИЯ (АВТОКЛАВИРОВАНИЕ)

Преимущества:

- Наиболее распространенный метод стерилизации в ЛПУ.
- Безопасен для окружающей среды и медицинского персонала.
- Короткая экспозиция.
- Не обладает токсичностью.
- Низкая стоимость.

Недостатки: Качество стерилизации может быть нарушено при попадании воздуха и повышенной влажности материалов.

Могут повреждаться изделия, чувствительные к действию высокой температуры и влажности (коррозия металлических инструментов).



Автоклавирование — это обработка **паром под давлением**, которая проводится в специальных приборах — **автоклавах**

Паром под давлением стерилизуют питательные среды, патологический биоматериал, инструментарий, белье и т.д. Наиболее часто используемый режим стерилизации в автоклаве 121°C (1 атм.) 40 минут.

- Иногда применяют

дробную стерилизацию (тиндализацию)

текущим паром в автоклаве при 56°C для обработки материалов, не выдерживающих дальнейшего нагревания (чаще всего питательные среды). Материал нагревают в течение 30-60 минут, а затем помещают на сутки в термостат при 37°C. Процедуру повторяют трижды. Нагревание стимулирует прорастание спор. Образовавшиеся вегетативные формы погибают при последующем повышении температуры.



СУХОВОЗДУШНАЯ СТЕРИЛИЗАЦИЯ

Проводится в сухожаровом шкафу. Сухим жаром стерилизуют, в основном, лабораторную посуду.





СУХОВОЗДУШНАЯ СТЕРИЛИЗАЦИЯ

Преимущества: Низкие коррозионные свойства.
Глубокое проникновение в материал Безопасен для окружающей среды.

Недостатки: Длительная экспозиция. Температурные режимы и время стерилизации отличаются в разных странах. Могут повреждаться термолабильные изделия.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА СТЕРИЛИЗАЦИИ

- **химический** — при каждой загрузке помещают химические тесты - индикаторы стерилизации. При достижении заданного режима стерилизации тесты меняют свой цвет



- **термический** — 2 раза в месяц максимальным термометром во время стерилизации проводят замер температуры в контрольных точках, достичь заданных параметров



- **биологический** — проводится 2 раза в год. В контрольных точках помещают био-термоустойчивой споровой культур

