

ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ

Выделение чистой культуры микроорганизмов является обязательным этапом всякого микробиологического исследования. Чистые культуры микроорганизмов необходимы для изучения их физиологии и биохимии, для приготовления диагностических, лечебных и профилактических препаратов, получения в производственных условиях аминокислот, антибиотиков, ферментов, витаминов, органических кислот и т.п. В микробиологической практике широко используются как чистые культуры микроорганизмов, так и консорциумы.

Консорциумы – смешанные или ассоциативные культуры, состоящие из двух и более микроорганизмов, между которыми существуют различные формы взаимоотношений. Различают три основных типа консорциумов микроорганизмов:

1- Искусственно созданные смеси микроорганизмов, которые называют смешанными культурами.

2- Консорциумы, выделенные непосредственно из природных источников, как функционально неделимое целое. Такие консорциумы называют ассоциативные культуры или ассоциации микроорганизмов.

3- Консорциумы, образовавшиеся в результате практической деятельности человека при приготовлении пищевых продуктов, это разного рода закваски.

Чистой культурой микроорганизмов называют культуру, состоящую из микроорганизмов одного вида. Чистая культура микроорганизмов, которая является потомством одной клетки, называется клоном.

Загрязненная или инфицированная культура – чистая культура, в которую случайно попали посторонние микроорганизмы.

Культуры микроорганизмов одного и того же вида, выделенные из различных источников или в разное время из одного и того же источника, называют **штаммами**, которые обычно обозначаются номерами или какими-либо символами.

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

Выделение чистой культуры включает три этапа: получение накопительной культуры, выделение чистой культуры и определение чистоты выделенной культуры.

Получение накопительной культуры

Накопительными называют такие культуры, в которых преобладают представители одной группы или даже одного вида микроорганизмов.

С целью получения накопительных культур создаются элективные условия, обеспечивающие преимущественное развитие выделяемых микроорганизмов. Часто элективные условия создают, подбирая соответствующие среды, поскольку различные микроорганизмы нуждаются в разных источниках питания. При создании элективных условий следует также учитывать неодинаковое отношение различных микроорганизмов к кислотности среды, температуре, аэрации. При получении накопительных культур следует учитывать и такие особенности выделяемых форм, как подвижность, спорообразование, устойчивость к антибиотикам. Например, получение накопительных культур спорообразующих бактерий производят из субстрата, который предварительно пастеризуют. Элективные условия для развития грамотрицательных бактерий или дрожжей иногда создают внесением в среду пенициллина, поскольку грамположительные бактерии при этом не развиваются или развиваются замедленно. Необходимо иметь в виду, что элективные условия далеко не всегда оптимальны для роста выделяемого микроорганизма, однако они лучше переносятся им, чем сопутствующими формами.

О получении накопительной культуры судят визуально, по появлению характерных признаков развития выделяемых микроорганизмов - помутнение среды, иногда сопровождающееся пигментацией, появление осадка, пузырьков газа.

Присутствие выделяемых форм определяют также путем микроскопирования культуральной жидкости. В некоторых случаях о получении накопительной культуры свидетельствуют характерные химические изменения в составе среды.

После того как получена накопительная культура, приступают к выделению чистой культуры.

Выделение чистой культуры

Чистые культуры микроорганизмов, как правило, выделяют внутри или на поверхности твердых питательных сред. Для выделения чистых культур микроорганизмов из объектов окружающей среды, содержащих обильную микрофлору, предложено много различных методов. Все они основаны на выделении из популяции одной клетки.

Метод разбавлений Пастера. Из суспензии, содержащей смесь микроорганизмов, делается ряд последовательных разведений в стерильной

жидкой питательной среде. С каждым разведением количество микроорганизмов, попадающих в пробирку, будет уменьшаться и можно таким образом получить такие разведения, когда в объеме среды в пробирке будет находиться только одна клетка, из которой и разовьется чистая культура. Однако этот метод не всегда дает возможность получить чистую культуру и в настоящее время практически мало используется.

Выделение чистой культуры из одной клетки капельным методом.

Предварительно подготавливается разведение культуры микроорганизма в питательной среде с таким расчетом, чтобы в небольшой капле этой среды могли быть единичные клетки. Затем на поверхность стерильного стекла с помощью простерилизованной иглы и стеклянной палочки наносят ряды мелких капель среды, содержащей микроорганизмы. Стекло перевертывают и помещают над лункой предметного стекла. Края лунки предварительно обмазывают вазелином. Затем все капли просматривают под микроскопом и отмечают те из них, в которых находится только одна клетка.

Стекло помещают в чашку Петри, на дне которой находится увлажненная фильтровальная бумага, и ставят в термостат; клетка размножается, образуя микроскопическую колонию.

Полученную колонию снимают стерильной фильтровальной бумагой, которую держат простерилизованным на пламени пинцетом, и переносят в пробирку с питательной средой.

Выделение чистой культуры капельным методом используется при работе с крупными микроорганизмами (дрожжи, плесени).

Выделение чистой культуры с помощью микроманипулятора. Для выделения под контролем микроскопа одиночных микробных клеток и их посева применяют специально оборудованные микроскопы -микроманипуляторы. Отдельные микробные клетки в них вылавливаются из висячей микрокапли микропипеткой и микропетлей, перемещаемыми в поле зрения микроскопа с микронной точностью с помощью системы винтов и рычагов.

Для выделения аэробов наиболее распространен в микробиологической практике ***метод выделения чистой культуры с помощью твердых сред (метод Коха).*** Метод заключается в получении чистой культуры из отдельной колонии, выросшей на твердой питательной среде в результате размножения одной клетки.

Метод основан на том, что при нанесении микроорганизмов из посевного материала на твердую среду отдельные клетки будут закрепляться (иммобилизоваться) в определенной точке твердой среды и, размножаясь, давать потомство (клон), представляющее чистую культуру микроорганизма

Для получения изолированных колоний на твердой среде исследуемый материал высевают на поверхность твердой питательной среды, наносят петлей или пипеткой каплю исследуемого материала. Рассев проводят либо методом истощающего мазка, либо методом истощающего штриха. В первом случае шпателем равномерно распределяют нанесенную каплю по поверхности твердой среды. Тем же шпателем делают посев на поверхности второй пластинки и затем третьей, т. е. перенося последовательно на твердую среду клетки микроорганизмов, которые остались на шпателе.

Таким образом, количество микроорганизмов, вносимых последовательно на пластинки, будет уменьшаться: на вторую - меньше, чем на первую; на третью - еще меньше, чем на вторую (рис.1).

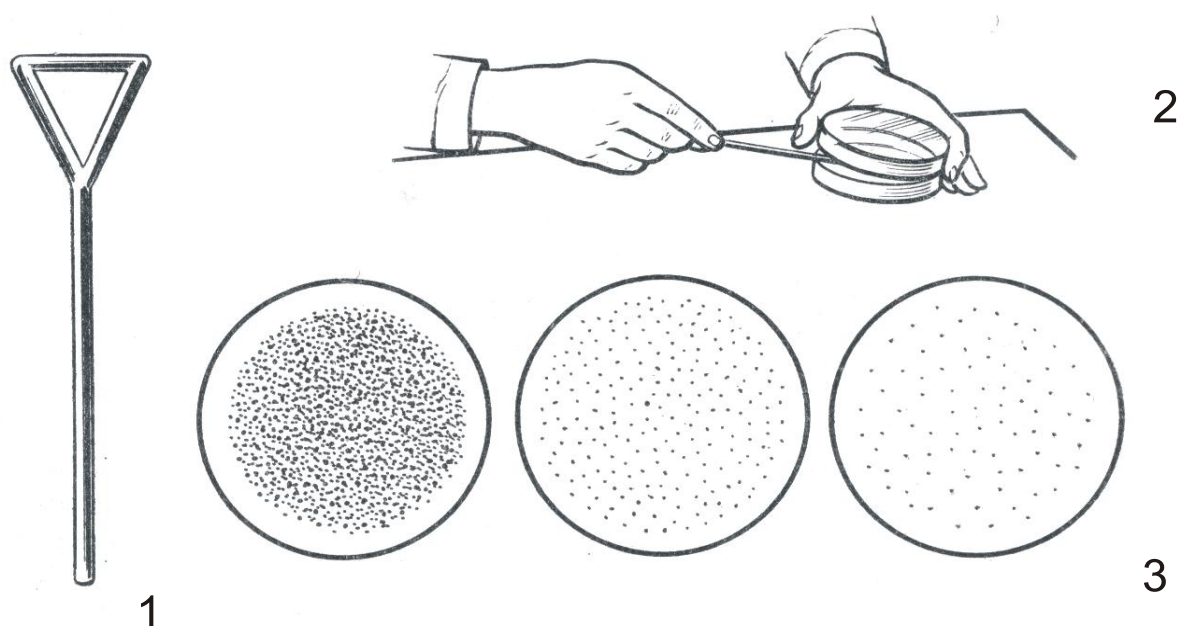


Рис. 1 – Рассев культуры микроорганизмов на поверхность плотной среды шпателем: 1 – шпатель Дригальского; 2 – рассев; 3 – рост микроорганизмов после посева

При использовании метода истощающего штриха исследуемый материал наносят петлей в верхнюю часть твердой среды в чашке Петри и аккуратно, зигзагообразно петлей по поверхности чашки. Существует множество методов нанесения штриха на поверхность плотной питательной среды (рис.2). Затем посев проводят аналогично на второй и третьей чашке.

После посева чашки необходимо перевернуть вверх дном и поставить в термостат при температуре, благоприятной для данного микроорганизма. Инкубируют посевы обычно в термостате в течение 2-3 дней. В результате на поверхности среды вырастают колонии микроорганизмов. Для выделения чистых культур многих бактерий используют МПА, для дрожжей — сусло-агар.

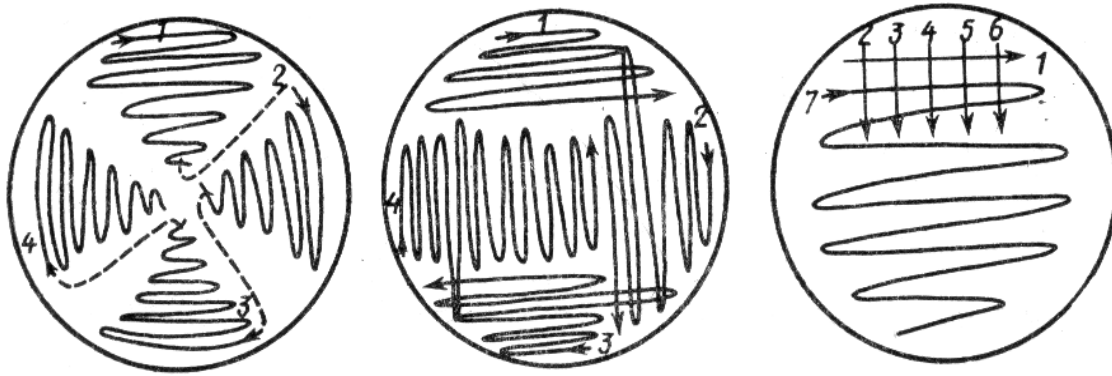


Рис. 2 – Схема посева культуры микроорганизмов на поверхность плотной питательной среды петлей

Недостатком этого метода является то, что иногда получаются не чистые, а смешанные культуры. Это является результатом того, что колонии могут образоваться не из одной, а из двух или нескольких клеток, попавших в одну точку. Поэтому этот метод выделения чистых культур требует двух- или трехкратного повторения выделения культур из одной колонии. Для этого готовят суспензии культур микроорганизмов изолированных колоний в стерильной водопроводной воде. Из каждой суспензии стерильной пипеткой делают разведение в стерильной водопроводной воде (1 капля суспензии на 8-10 мл воды) и взвесь микроорганизмов засевают на поверхность плотной питательной среды в чашки Петри, которые помещают на 3-4 суток в термостат.

Через 3-4 суток просматривают выросшие колонии и сверяют их признаки с отмеченными признаками при выделении культуры.

Однородность колоний и совпадение признаков с описанными ранее свидетельствуют о чистоте культуры.

Изолированные колонии засевают в две пробирки на поверхность скошенной питательной агаризованной среды и помещают в термостат при определенной температуре, благоприятной для данного микроорганизма, на 2-3 суток.

Изолированные колонии микроорганизмов, относящихся к факультативным анаэробам, обычно получают *при глубинном посеве*. Для выделения чистой культуры облигатных анаэробных микроорганизмов делают посев глубинным способом в пробирки с плотной питательной средой. Для уменьшения диффузии кислорода поверхность среды заливают стерильным вазелиновым маслом.

Другим методом выделения чистой культуры анаэробных микроорганизмов является *посев в трубочки по методу Виньял-Вейона*. В пробирки с 0,5%-ным стерильным расплавленным и охлажденным агаром (40-45 °С) вносят культуру анаэробных микроорганизмов, затем содержимое пробирки набирают в пастеровскую пипетку, заполняя засеянной средой весь ее капилляр. После заполнения конец трубки запаивают.

Для получения изолированных колоний облигатных анаэробных бактерий, характеризующихся особенно высокой чувствительностью к кислороду (экстремальные анаэробы), используют метод вращающихся пробирок Хангейта. Сущность этого метода заключается в следующем. Расплавленную агаризованную среду заражают при постоянном токе через пробирку инертного газа, освобожденного от примеси кислорода. Затем пробирку закрывают резиновой пробкой и помещают горизонтально в зажим, вращающий пробирку. Агаризованная среда при этом равномерно распределяется по стенкам пробирки и застывает тонким слоем. Применение тонкого слоя агаризованной среды в пробирке, заполненной газовой смесью, позволяет получить изолированные колонии, хорошо видимые невооруженным глазом (рис.3).

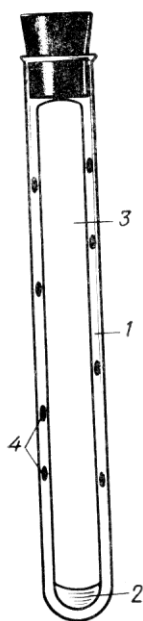


Рис. 3 – Изолированные колонии облигатных анаэробов в пробирках, заполненных газом (по Хангейту):

1 – агаризованная питательная среда;

Определение чистоты выделенной культуры

Чистота культуры выделенного микроорганизма должна быть обязательно проверена несколькими способами.

Визуальный контроль. Визуальный контроль проводят тогда, когда выделенная культура микроорганизмов высеяна на поверхность скошенного агара. Если культура чистая, то характер ее роста на скошенном агаре однороден

по всему штриху. Если штрих не однороден, то культура считается загрязненной.

Микроскопический контроль. Проверка чистоты выделенной культуры обязательно включает макроскопический контроль. Для этого готовят препарат фиксированных окрашенных клеток и исследуют его с иммерсионной системой. Чистая культура, как правило, морфологически однородна, допустимо лишь незначительное варьирование размеров клеток.

Необходимо помнить, что клетки некоторых микроорганизмов, например микобактерий, полиморфны, поэтому определение чистоты таких культур при микроскопировании затруднительно.

Посев на плотные питательные среды. Это наиболее надежный способ проверки чистоты культур. Культуру, подлежащую рассеvu, пересевают в пробирку со свежей скошенной средой. Затем готовят суспензии этой культуры смывом стерильной водопроводной водой. Взвесь микроорганизмов из последнего разведения рассеивают на поверхность плотных сред.

Посевы помещают на 5-7 суток в термостат при 30-37°. Однородность колоний и совпадение их признаков с ранее описанными является свидетельством чистоты культуры.

Морфологические, культуральные и физиолого-биохимические признаки

Заключительным этапом получения чистой культуры является определение вида выделенного микроорганизма. Принадлежность микробной культуры к определенной систематической группе: семейству, роду, виду - устанавливают путем изучения ее морфологических, культуральных и физиолого-биохимических признаков. Перечисленные признаки получили название таксономических.

Морфологические и культуральные признаки

Выросшие колонии сначала рассматривают невооруженным глазом, а затем при помощи лупы или при малом увеличении микроскопа.

При описании колоний микроорганизмов отмечают следующие морфологические и культуральные признаки:

Размер колоний - их диаметр в мм (если колонии не превышают 1 мм, их называют точечными).

Форма колоний - округлая, неправильная, мицелиевидная, ризоидная, амёбовидная, складчатая, концентрическая, сложная или другая (рис.4).

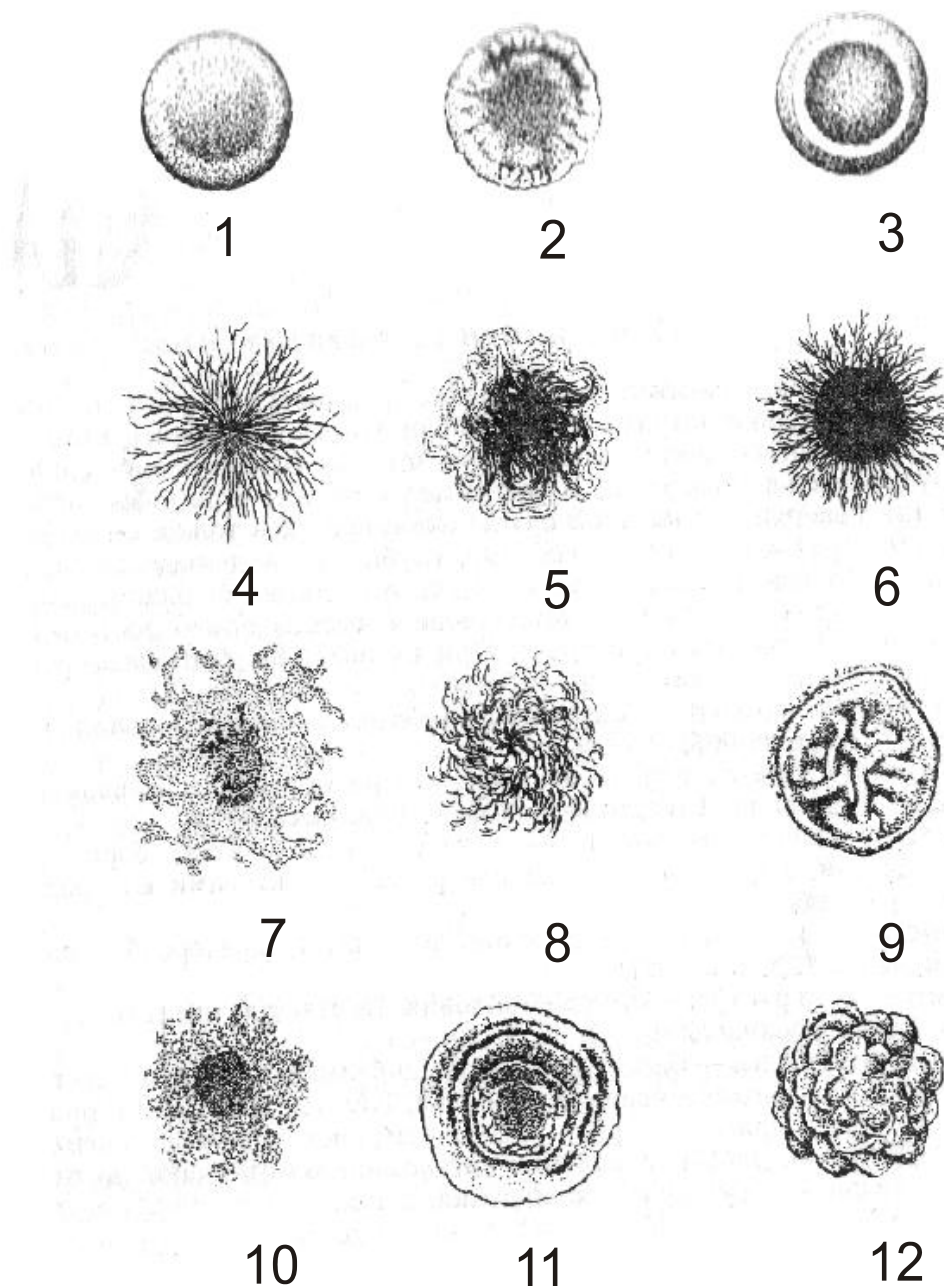


Рис.4 – Форма колоний: 1 – круглая; 2 – круглая с фестончатым краем; 3 – круглая с валиком по краю; 4,5 – ризоидные; 6 – с ризоидным краем; 7 – амёбовидная; 8 – нитевидная; 9 – складчатая; 10 – неправильная; 11 – концентрическая; 12 - сложная

Цвет колоний — белый, желтый, розовый и т. д. Выявляют и способность выделять пигмент в среду.

Поверхность колоний - гладкая, складчатая, с радиальной или концентрической исчерченностью, шероховатая, бугристая или другая.

Оптические свойства — прозрачная, полупрозрачная, непрозрачная, блестящая, матовая, флуоресцирующая и т. д.

Профиль колоний - плоский, слабовыпуклый, сильновыпуклый, вогнутый, кратерообразный или другой (рис.5).

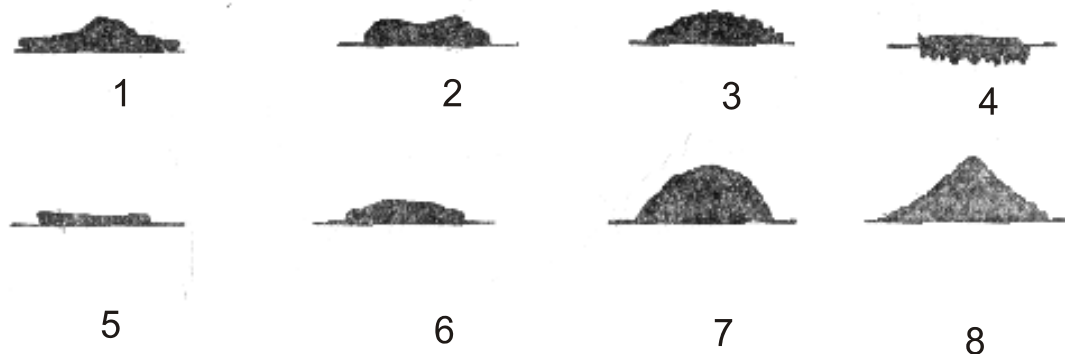


Рис.5 – Профиль колонии: 1 – изогнутый; 2 – кратерообразный; 3 – бугристый; 4 – врастающий в субстрат; 5 – плоский; 6 – выпуклый; 7 – каплевидный; 8 – конусовидный

Край колоний – ровный, извилистый, зубчатый, лопастной, волнистый, неправильный, реснитчатый, нитчатый, ворсинчатый, ветвистый (рис.6).

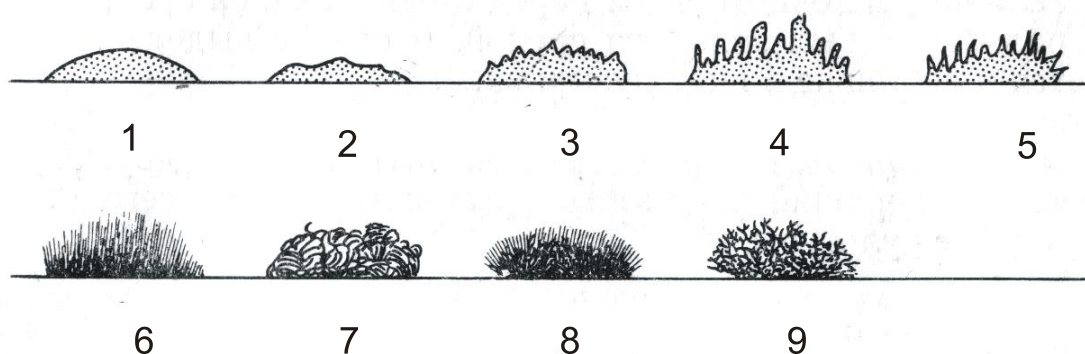


Рис.6 – Край колонии: 1 – гладкий; 2 – волнистый; 3 – зубчатый; 4 – лопастной; 5 – неправильный; 6 – реснитчатый; 7 – нитчатый; 8 – ворсинчатый; 9 – ветвистый

Консистенция колонии — маслянистая, тестообразная, вязкая, плёнчатая.

Структура колонии – однородная, мелкозернистая, волокнистая, крупнозернистая (рис.7).

Для описания колоний из имеющихся чашек Петри берут ту, на которой колонии достаточно изолированы друг от друга. В отобранной чашке выбирают хорошо изолированные и различающиеся внешним видом колонии, которые описывают, указав все характерные признаки их роста.

Из отобранных колоний приготавливают препараты, микроскопируют для проверки морфологической однородности клеток. При приготовлении препаратов необходимо соблюдать все правила стерильности (не открывать широко крышку чашки, хорошо простерилизовать петлю). Далее пересевают культуру из колонии в пробирку со скошенной плотной питательной средой

МПА и помещают на 2-3 суток в термостат при 30-37 °С. Выросшие культуры хранят в холодильнике или при комнатной температуре.

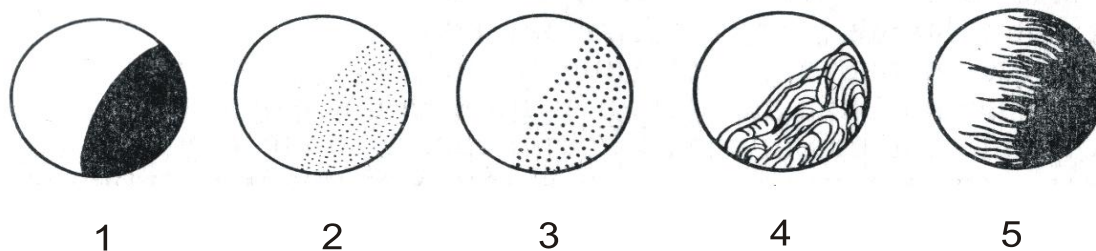


Рис.7 – Структура колонии: 1 – однородная, 2 – мелкозернистая; 3- крупнозернистая; 4 – струйчатая; 5 - волокнистая

Морфологические признаки микроорганизмов изучают при микроскопическом исследовании, как живых культур, так и окрашенных разными методами фиксированных препаратов.

Морфологические признаки описывают по следующей схеме: форма и размеры клеток, соединение клеток, подвижность, расположение и количество жгутиков, образование спор, вид спорообразования, образование капсул, запасные вещества, окраска по Граму.

Культуральные свойства характерны для каждого вида микроорганизмов и поэтому являются важным диагностическим признаком.

Рост бактерий на плотных питательных средах

Наиболее существенной особенностью роста микроорганизмов на плотной питательной среде является характер колонии. Для изучения свойств колоний бактерии культивируют на 2%-ном МПА в чашках Петри.

При посеве клеток в толщу плотной питательной среды наряду с поверхностными колониями происходит образование глубинных и донных колоний. Глубинные колонии имеют вид чечевичек. Иногда они напоминают клочки ваты из-за нитевидных выростов в толщу среды. Если в процессе развития микроорганизмы выделяют газы, то образование глубинных колоний сопровождается разрывом плотной среды. Донные колонии, образующиеся при соприкосновении агаризованной среды с дном чашки Петри, обычно имеют вид довольно крупных, бесцветных прозрачных налетов.

Описание колонии дополняют описанием роста микроорганизмов по штриху на поверхности, скошенной плотной питательной среды (рис.8).

Отмечают интенсивность роста по штриху (скудный, умеренный, обильный), и его особенности (надет сплошной с ровным или волнистым краем, в виде цепочек изолированных колоний, диффузный, древовидный и т.д.).

Кроме того, характеризуют оптические свойства штриха, а также его цвет, поверхность, консистенция. При описании колонии и роста микроорганизмов по штриху обязательно указывают состав среды и возраст культуры, так как колонии одного и того же вида организма на различных средах могут отличаться рядом признаков.

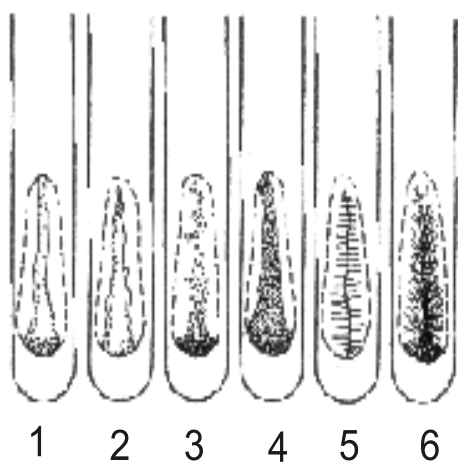


Рис.8 – рост бактерий по штриху: 1 – сплошной с ровным краем; 2 – сплошной с волнистым краем; 3 – четко-видный; 4 – диффузный; 5 – перистый; 6 – ризоидный

Рост бактерий на жидких питательных средах

На жидких питательных средах выявляются следующие виды роста бактерий:

- рост с равномерным помутнением среды;
- придонный рост бактерий, характеризуемый образованием на дне сосуда осадка, который может быть скудным или обильным. По внешнему виду осадок может быть крошковидным, гомогенным, волокнистым или в виде крупных рыхлых хлопьев, по консистенции – вязким, слизистым, пастообразным. Питательная среда над осадком может быть прозрачной или мутной. Придонный рост характерен для бактерий с анаэробным типом дыхания;
- пристеночный рост бактерий, выраженный в том, что питательная среда остается совершенно прозрачной, поскольку бактерии в виде рыхлых хлопьев или компактных зерен прикрепляются к внутренней поверхности стенки;
- поверхностный рост бактерий, характеризуемый появлением на поверхности жидкой питательной среды пленки, внешний вид и характер

которой могут быть различными: а) пленка тонкая в виде едва заметного налета; б) пленка влажная толстая, имеющая вязкую слизистую консистенцию; в) пленка толстая сухая, снимаемая с усилием целиком в виде круглого диска, соответствующего диаметру сосуда.

Рост на полужидкой питательной среде

Для выявления особенностей микробного роста на полужидкой питательной среде исследуемую культуру засевают в столбик 0,2-0,5%-ого полужидкого агара. Для того чтобы особенности роста проявились наиболее четко, прокол делают в непосредственной близости от стенки пробирки. Посев ставят в термостат на 24 часа. Произведенный таким образом посев дает возможность выявить и отделить подвижные микроорганизмы от неподвижных.

Неподвижные формы бактерий растут по линии укола, образуя небольшие выросты цилиндрической или конической формы. Окружающая среда при этом остается совершенно прозрачной. Подвижные микробы при таком посеве вызывают выраженное помутнение, распространяющееся более или менее равномерно по всей толщине среды.

Физиолого-биохимические признаки микроорганизмов

Для определения систематического положения бактерий кроме морфологических и культурных свойств необходимо изучить их физиолого-биохимические признаки, которые обусловлены набором конститутивных и индуцибельных ферментов. Эти свойства могут быть изучены качественными и количественными методами. В бактериологической практике большое таксономическое значение имеют сахаролитические и протеолитические признаки бактерий, которые определяют на дифференциально - диагностических средах.

Сахаролитические свойства

Микроорганизмы характеризуются неодинаковой способностью использовать различные углеводы и спирты в качестве единственных источников углерода и энергии. Чаще всего микроорганизмы используют такие углеводы, как арабиноза, ксилоза, глюкоза, фруктоза, галактоза, сахароза, мальтоза, лактоза и такие спирты, как глицерин, маннит. Рост на средах, содержащих эти соединения, может приводить к накоплению органических кислот (вследствие чего изменяется рН среды), нейтральных продуктов или газов (вследствие чего на поверхности, среды образуется пена и среда вытесняется из поплавка) (рис.9).

Для обнаружения сахаролитических ферментов исследуемую культуру микроорганизмов засевают на среды следующего состава (г/л): пептон -5,0; K_2HPO_4 - 1,0; углевод - 10,0; водопроводная вода, содержащие в качестве источника углерода и энергии различные углеводы.

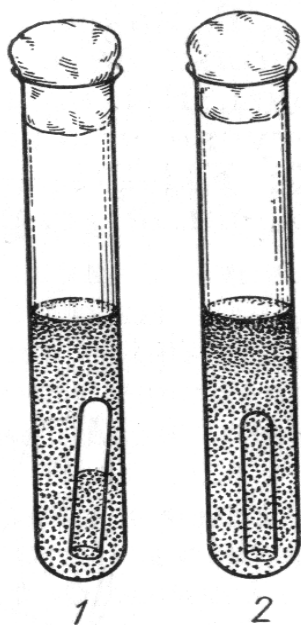


Рис.9 – Накопление газа в поплавке: 1 – рост культуры сопровождается образованием

Для обнаружения изменения pH к среде добавляют индикатор (бромтимоловый синий). Все среды с углеводами и спиртами засевают одновременно суспензией клеток изучаемого организма (0,2 мл) и ставят в термостат при 30-37 °С. Результаты регистрируют через 48 - 96 часов. О накоплении органических кислот или нейтральных продуктов свидетельствует изменение цвета среды (при pH=7,6 индикатор бромтимоловый синий имеет синий цвет, а при pH=6,0-желтый), о газообразовании - накопление газа в поплавке. Результаты сравнивают с контрольной средой.

Способность микроорганизмов использовать углеводы и многоатомные спирты можно определить и на плотных питательных средах. В этом случае стерильный раствор углевода или спирта добавляют в стерильную агаризованную расплавленную питательную среду, тщательно перемешивают ее и разливают в стерильные чашки Петри. После того, как агар застынет, дно чашки Петри с наружной стороны делят на секторы. Затем каждую из исследуемых культур высевает петлей, проводя радиальный штрих (рис.10). В качестве посевного материала используют густые суспензии клеток, которые готовят смывом культур с поверхности скошенного агара. Продолжительность культивирования 2 – 10 суток. О результатах судят по интенсивности роста культур в сравнении с ростом на контрольной среде, не содержащей

испытываемых соединений углерода. Этот метод удобен тем, что позволяет в одной чашке Петри одновременно проверить способность нескольких микроорганизмов использовать тот или иной источник углерода.

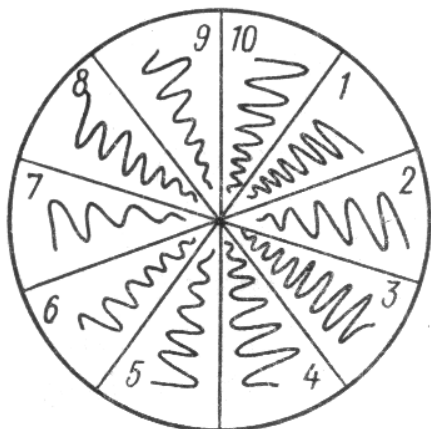


Рис.10 – Схема посева на плотную питательную среду различных микроорганизмов (1 – 10) для определения способности использовать углеводы

Способы утилизации углеводов (аэробное окисление и сбраживание)

Различия в метаболизме углеводов важны при характеристике многих представителей гетеротрофных бактерий.

Для выявления способа утилизации углеводов исследуемую культуру микроорганизмов засевают на среды следующего состава (г/л): углевод - 10,0; пептон - 2,0; NaCl- 5,0; K_2HPO_4 - 0,3; дистиллированная вода; pH среды 7,1. В качестве индикатора используют бромтимоловый синий. Для каждого углевода используют две пробирки. После посева поверхность среды в одной из пробирок заливают стерильным парафином (толщина слоя 0,8-10 мм). Продолжительность культивирования 8-10 суток при 30-37 °С. Образование кислоты регистрируют по изменению цвета индикатора.

Организмы, осуществляющие брожение, развиваются в обеих пробирках. Организмы, осуществляющие аэробное окисление, развиваются только в одной пробирке (не залитой парафином). Рост микроорганизмов вызывает подкисление среды и соответственно изменение цвета индикатора.

Обнаружение способности микроорганизмов расщеплять полисахариды

Гидролиз крахмала. Расщепление крахмала осуществляют микроорганизмы, образующие фермент амилазу и использующие продукты гидролиза крахмала как источник углерода и энергии. Для выявления этой

способности изучаемых микроорганизмов готовят среду следующего состава (г/л): пептон - 10,0; K_2HPO_4 - 5,0; растворимый крахмал - 2,0; агар-агар - 20,0; pH среды - 6,8-7,0. Среду стерилизуют при 1 атм и разливают в стерильные чашки Петри. На застывающую среду высевает культуру штрихом по диаметру чашки. Продолжительность культивирования 7-10 суток при 30-37 °C.

Гидролиз крахмала обнаруживают по зоне просветления вдоль штриха после обработки агаровой пластинки раствором Люголя. Так как йод - индикатор на крахмал, среда окрашивается в синий цвет, за исключением зоны гидролиза крахмала, которая остается бесцветной или может приобрести красно-бурую окраску, если крахмал гидролизуеться в основном до декстрина.

Гидролиз целлюлозы. Для выявления этой способности у изучаемых микроорганизмов используют питательную среду Гетчинсона, следующего состава (г/л): K_2HPO_4 - 1,0; $\text{CaCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ - 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,3; NaCl - 0,1; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,01; NaNO_3 - 2,5; агар-агар - 20,0; дистиллированная вода; pH среды - 7,2-7,3. Питательную среду стерилизуют при 1 атм. Из фильтровальной бумаги вырезают круги по диаметру чашки Петри и стерилизуют их в автоклаве. Затем питательную среду разливают в чашки Петри. Когда среда застынет, клетки изучаемого организма высевает штрихом по всей поверхности агаровой пластинки. Далее на поверхность опускают бумажный фильтр и стерильным пинцетом прижимают его к поверхности среды. Чашки с посевами помещают во влажную камеру, а ее - в термостат при 25-30 °C на 10-14 суток. При разрушении клетчатки фильтровальная бумага ослизняется.

Исследование способности микроорганизмов к образованию протеолитических ферментов

Некоторые микроорганизмы продуцируют и выделяют во внешнюю среду протеолитические ферменты - протеазы, катализирующие расщепление белка.

Для определения таких протеолитических ферментов, как коллагеназы (желатиназы), производят посев культуры на мясо-пептонную желатину, которая готовится следующим образом. К МПБ добавляют 10-20 % желатины, оставляют на 20-30 мин, чтобы желатина набухла, затем смесь нагревают на водяной бане при 70-80 °C до полного растворения желатины и разливают в пробирки по 5-8 мл. Стерилизуют дробно при 0,5 атм. Посев проводят уколом. Продолжительность культивирования 7-10 суток при комнатной температуре.

Разжижение МПЖ отмечают визуально (рис.11). По характеру роста и форме области разжижения можно судить об отношении данного микроба к кислороду:

- в случае строгого аэриоза разжижение пойдет послойно, начинаясь с поверхности. Разжижение может иметь кратерообразный, реповидный или воронкообразный вид;
- факультативные анаэробы дадут мешковидное разжижение;
- строгие анаэробы дадут пузыревидный рост в глубине питательной среды.

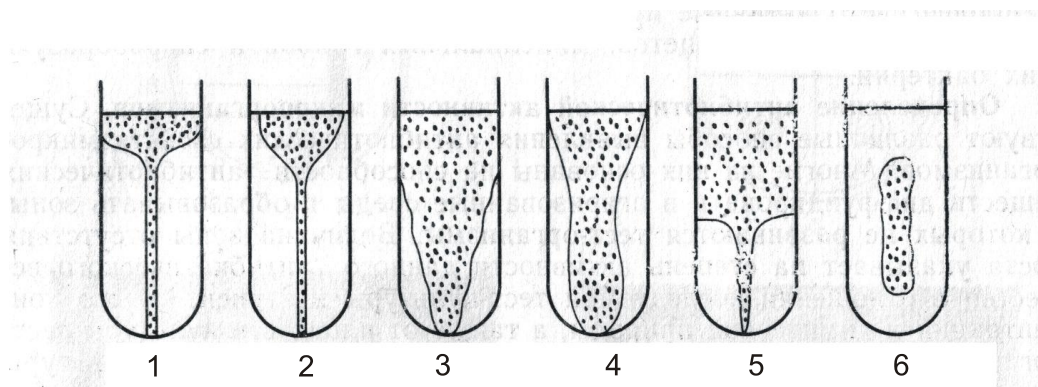


Рис.11 – Схема разжижения желатины микроорганизмами при посеве уколом: 1 – кратеровидное; 2 – реповидное; 3 – воронковидное; 4 – мешковидное; 5- послойное; 6 – пузыревидное; 1-3 и 5 – разжижение

Для выявления таких протеолитических ферментов, как казеиназы, используют молочный агар по Эйкману, который готовится следующим образом: к 10 мл стерильного расплавленного агара добавляют, соблюдая стерильность, 2,5-3,0 мл снятого стерильного молока, смешивают и выливают в чашку Петри. Среда используется без дополнительной стерилизации, так как при совместной стерилизации молока и агара выпадают хлопья казеина. Посев делают петлей или шпателем Дригальского так, чтобы получить изолированные колонии. Чашки помещают в термостат на 28-30 °С. Культуры, продуцирующие протеолитические ферменты, обуславливают пептонизацию молочного белка - казеина, в результате чего вокруг колоний образуются прозрачные ореолы, четко выделяющиеся на общем молочно-мутном фоне среды.

Выявление способности микроорганизмов к дезаминированию аминокислот, образованию сероводорода, индола

Некоторые виды микроорганизмов с выраженной протеолитической активностью обладают способностью расщеплять белок и пептон до продуктов глубокого распада: аммиака, сероводорода, индола.

Определение аммиака. Образование NH_3 свойственно микроорганизмам, дезаминирующим аминокислоты. Эту способность выявляют при их росте в МПБ. Для этого МПБ разливают в пробирки по 8-10 мл, стерилизуют при 1 атм и засевают суспензией клеток (0,2 мл) изучаемого организма.

Образование аммиака обнаруживают по изменению окраски красной лакмусовой бумажки. Для этого после посева узкую полоску стерильной лакмусовой бумаги укрепляют между пробкой и горлышком пробирки так, чтобы она не соприкасалась с питательной средой. Чтобы затруднить улетучивание NH_3 пробку пробирки заворачивают целлофаном. Посевы инкубируют при 28-30 °С 7-10 дней.

Определение сероводорода. Сероводород является конечным продуктом расщепления серосодержащих аминокислот (цистеина, цистина, метионина).

Для обнаружения сероводорода после посева микроорганизмов в пробирки с МПБ между горлышком и пробкой помещают сухую стерильную полоску фильтровальной бумаги, ранее смоченную раствором уксуснокислого свинца (20 г уксуснокислого свинца, 1 г углекислой соды, 100 мл дистиллированной воды). Пробку пробирки заворачивают целлофаном, чтобы затруднить улетучивание сероводорода. Продолжительность культивирования 7-10 суток при 30-37 °С.

Если в среде накапливается H_2S , то он вступает в соединение с бесцветным уксуснокислым свинцом, образуя сернокислый свинец, окрашивающий индикаторную бумажку в черно-бурый цвет.

Образование индола. Некоторые микроорганизмы в процессе развития, расщепляя сложную гетероциклическую кислоту триптофан, образуют индол. Образование индола связано с триптофаназной активностью и является важным диагностическим признаком.

Существуют несколько способов обнаружения индола. Рассмотрим один из них.

Способ Мореля. МПБ с 0,01% триптофана разливают в пробирки по 8-10 мл, стерилизуют при 0,5 атм и засевают клетками изучаемого организма. После посева между стенкой пробирки и пробкой помещают сухую индикаторную бумагу, ранее пропитанную горячим насыщенным раствором щавелевоуксусной кислоты. Посевы инкубируют 48-72 ч при 28-30 °С. Пробку пробирки заворачивают целлофаном. Если при росте культуры в среде образуется индол, то бумажка краснеет.

Обнаружение нитратредуктазной активности

Восстанавливать нитраты до нитритов способны микроорганизмы, образующие фермент нитратредуктазу и использующие нитраты в качестве

источника азота. Значительно реже у микроорганизмов встречается способность восстанавливать нитраты до молекулярного азота, что характерно для видов, использующих нитраты как акцептор водорода при окислении органических соединений.

Способность микроорганизмов к восстановлению нитратов проверяют на среде, состоящей из МПБ и 0,2 %-ного раствора KNO_3 . Для этого среду разливают в пробирки, вставляют поплавки, стерилизуют при 1 атм и засевают суспензией клеток исследуемого организма. Через 7-10 дней регистрируют результаты.

Для обнаружения нитратов к культуральной жидкости по стенке пробирки осторожно приливают реактив Грисса. Появление красного кольца свидетельствует о присутствии нитритов.

О восстановлении нитритов до N_2 свидетельствует накопление газа в поплавке.

Обнаружение фермента каталазы

На предметное стекло наносят каплю 1-3 %-ного раствора перекиси водорода и вносят в нее петлю бактериальной культуры. Каталаза разлагает перекись водорода на воду и кислород. Выделение пузырьков кислорода свидетельствует о наличии у данного вида бактерий фермента каталазы.

На основании совокупности полученных признаков, изученные организмы идентифицируют, руководствуясь специальными определителями бактерий и актиномицетов и определителем Берджи.

Определение кислотоустойчивости бактерий

Кислотоустойчивость - свойство, характерное для некоторых видов микобактерий и актиномицетов. Оно выражается в способности клеток микроорганизмов, фиксированных и окрашенных карболовым фуксином при нагревании, прочно удерживать краситель при последующей обработке их подкисленным спиртом или раствором минеральных кислот. Кислотоустойчивость связывают с особенностями состава оболочки, главным образом с наличием миколовых кислот. Кислотоустойчивость можно определить у клеток любого возраста.

Контрольные вопросы

1. Основные понятия: чистая культура, инфицированная культура, колония, консорциум.
2. Основные этапы выделения чистой культуры микроорганизмов.
3. Получение накопительной культуры микроорганизмов.

4. Методы выделения чистой культуры аэробных микроорганизмов.
5. Методы выделения чистой культуры анаэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов.
6. Признаки, учитываемые при описании микробной колонии.
7. Способы определения чистоты выделенной культуры.
8. Схема описания морфологических признаков культуры микроорганизмов.
9. Особенности роста микробных культур на плотных питательных средах.
10. Особенности роста микробных культур на жидких питательных средах.
11. Особенности роста микробных культур на полужидких питательных средах.
12. Исследование сахаролитических свойств выделенной культуры микроорганизмов.
13. Гидролиз полисахаридов микроорганизмами.
14. Протеолитические свойства микроорганизмов.
15. Способность микробных культур к расщеплению белка и пептона до газообразных продуктов.