

**Аэробные и анаэробные микроорганизмы отличаются реакцией на наличие или отсутствие кислорода.** Это влияет на их физиологию и культивирование.

## Аэробные микроорганизмы

**Физиология:** кислород необходим для роста, развития и участвует в процессах размножения. Благодаря кислороду микроорганизмы способны окислять органические вещества — сахара и жиры, из которых получают энергию.

**Культивирование:** аэробные микроорганизмы можно выращивать:

- **На поверхности жидких и плотных сред** — поверхностное культивирование. Микроорганизмы получают кислород непосредственно из воздуха.
- **Внутри жидкой питательной среды** — глубинное культивирование. В этом случае микроорганизмы используют растворённый в среде кислород.

**Типы аэробных микроорганизмов:**

- **Облигатные аэробы** (аэрофилы) — растут и размножаются только при свободном доступе кислорода.
- **Микроаэрофильные аэробы** — развиваются при низкой (до 1%) концентрации кислорода в окружающей атмосфере.



## Анаэробные микроорганизмы

**Физиология:** в процессе энергетического обмена кислород не используется. Для выживания микроорганизмы используют энергию, производимую при анаэробных процессах брожения (молочной кислоты, этанола).

**Культивирование:** для культивирования анаэробных микроорганизмов применяют особые методы, ограничивающие доступ воздуха к растущей культуре. Некоторые из них:

- выращивание в высоком слое среды;
- выращивание в толще плотной среды;

- культивирование в вязких средах, в которых диффузия молекулярного кислорода в жидкость уменьшается с увеличением её плотности;
- заливка среды с посевом высоким слоем стерильного вазелинового масла или парафина.

### **Классификация анаэробных микроорганизмов:**

Согласно устоявшейся в микробиологии классификации, различают:

- Факультативные анаэробы
- Капнеистические анаэробы и микроаэрофилы
- Аэротолерантные анаэробы
- Умеренно-строгие анаэробы
- Облигатные анаэробы

Если организм способен переключаться с одного метаболического пути на другой (например, с анаэробного дыхания на аэробное и обратно), то его условно относят к факультативным анаэробам.

Умеренно-строгий анаэробный организм выживает в среде с молекулярным  $O_2$ , однако не размножается. Микроаэрофилы способны выживать и размножаться в среде с низким парциальным давлением  $O_2$ .

Если организм не способен «переключиться» с анаэробного типа дыхания на аэробный, но не гибнет в присутствии молекулярного кислорода, то он относится к группе аэротолерантных анаэробов. Например, молочнокислые и многие маслянокислые бактерии.

Выделение чистой культуры анаэробов схематично

Культивирование анаэробных организмов в основном является задачей микробиологии.

Сложнее дело обстоит с культивированием анаэробных многоклеточных организмов, поскольку для их культивирования часто необходима специфическая микрофлора, а также определённые концентрации метаболитов. Применяется, например, при исследовании паразитов человеческого организма.

Для культивирования анаэробов применяют особые методы, сущность которых заключается в удалении воздуха или замены его специализированной газовой смесью (или инертными газами) в герметизированных термостатах — анаэростатах.

Другим способом выращивания анаэробов (чаще всего микроорганизмов) на питательных средах — добавление редуцирующих веществ (глюкозу, муравьинокислый натрий, казеин, сульфат натрия, тиосульфат, цистеин, тиогликолят натрия и др.), связывающих токсичные для анаэробов перекисные соединения.

Общие питательные среды для анаэробных организмов

Для общей среды Вильсона-Блера базой является агар-агар с добавлением глюкозы, сульфата натрия и двуххлористого железа. Клостридии образуют на этой среде колонии чёрного цвета за счёт восстановления сульфата до сульфид-аниона, который, соединяясь с катионами железа (II), даёт соль чёрного цвета. Как правило, чёрные на этой среде образования колонии появляются в глубине агарового столбика.

Среда Китта-Тароцци состоит из мясопептонного бульона, 0,5 % глюкозы и кусочков печени или мясного фарша для поглощения кислорода из среды. Перед посевом среду прогревают на кипящей водяной бане в течение 20—30 минут для удаления воздуха из среды. После посева питательную среду сразу заливают слоем парафина или вазелинового масла для изоляции от доступа кислорода.

Общие методы культивирования для анаэробных организмов

GasPak — система химическим путём обеспечивает постоянство газовой смеси, приемлемой для роста большинства анаэробных микроорганизмов. В герметичном контейнере, в результате реакции воды с таблетками боргидрида натрия и бикарбоната натрия образуется водород и диоксид углерода. Водород затем реагирует с кислородом газовой смеси на палладиевом катализаторе с образованием воды, уже вторично вступающей в реакцию гидролиза боргидрида.

Данный метод был предложен Брюером и Олгаером в 1965 году. Разработчики представили одноразовый пакет, генерирующий водород, который был позднее усовершенствован ими до саше, генерирующих двуокись углерода и содержащих внутренний катализатор.

Метод Цейслера применяется для выделения чистых культур спорообразующих анаэробов. Для этого производят посев на среду Китт-Тароцци, прогревают 20 мин при 80 °С (для уничтожения вегетативной формы), заливают среду вазелиновым маслом и инкубируют 24 ч в термостате. Затем производят посев на сахарно-кровяной агар для получения чистых культур. После 24-часового культивирования интересные колонии изучаются — их пересеивают на среду Китт-Тароцци (с последующим контролем чистоты выделенной культуры).

#### Метод Фортнера

Метод Фортнера — посевы производят на чашку Петри с утолщённым слоем среды, разделённым пополам узкой канавкой, вырезанной в агаре. Одну половину засевают культуру аэробных бактерий, на другую — анаэробных. Края чашки заливают парафином и инкубируют в термостате. Первоначально наблюдают рост аэробной микрофлоры, а затем (после поглощения кислорода) — рост аэробной резко прекращается и начинается рост анаэробной.

Метод Вейнберга используется для получения чистых культур облигатных анаэробов. Культуры, выращенные на среде Китта-Тароцци, переносят в сахарный бульон. Затем одноразовой пастеровской пипеткой материал переносят в узкие пробирки (трубки Виньяля) с сахарным мясо-пептонным агаром, погружая пипетку до дна пробирки. Засеянные пробирки быстро охлаждают, что позволяет фиксировать бактериальный материал в толще затвердевшего агара. Пробирки инкубируют в термостате, а затем изучают выросшие колонии. При обнаружении интересующей колонии на её месте делают распил, материал быстро отбирают и засеивают на среду Китта-Тароцци (с последующим контролем чистоты выделенной культуры).

Метод Перетца — в расплавленный и охлаждённый сахарный агар-агар вносят культуру бактерий и заливают под стекло, помещённое на пробковых палочках(или фрагментах спичек) в чашку Петри. Метод наименее надёжен из всех, но достаточно прост в применении.

Дифференциально — диагностические питательные среды

Среды Гисса («пёстрый ряд»)

Среда Расселя (Рассела)

Среда Эндо

Среда Плоскирева или бактоагар «Ж»

Висмут-сульфитный агар

Среды Гисса: К 1 % пептонной воде добавляют 0,5 % раствор определённого углевода (глюкоза, лактоза, мальтоза, маннит, сахароза и др.) и кислотно-щелочной индикатор Андрее, разливают по пробиркам, в которые помещают поплавки для улавливания газообразных продуктов, образующихся при разложении углеводов.

Среда Расселя (Рассела) применяется для изучения биохимических свойств энтеробактерий(шигелл, сальмонелл). Содержит питательный агар-агар, лактозу, глюкозу

и индикатор (бромтимоловый синий). Цвет среды травянисто-зелёный. Обычно готовят в пробирках по 5 мл со скошенной поверхностью. Посев осуществляют уколом в глубину столбика и штрихом по скошенной поверхности.

Среда Плоскирева (бактоагар Ж) — дифференциально-диагностическая и селективная среда, поскольку подавляет рост многих микроорганизмов, и способствует росту патогенных бактерий (возбудителей брюшного тифа, паратифов, дизентерии). Лактозоотрицательные бактерии образуют на этой среде бесцветные колонии, а лактозоположительные — красные. В составе среды — агар, лактоза, бриллиантовый зелёный, соли жёлчных кислот, минеральные соли, индикатор (нейтральный красный).

Висмут-сульфитный агар предназначен для выделения сальмонелл в чистом виде из инфицированного материала. Содержит триптический гидролизат, глюкозу, факторы роста сальмонелл, бриллиантовый зелёный и агар. Дифференциальные свойства среды основаны на способности сальмонелл продуцировать сероводород, на их устойчивости к присутствию сульфида, бриллиантового зелёного и лимоннокислого висмута. Маркируются колонии в чёрный цвет сернистого висмута (методика схожа со средой Вильсона-Блера).