

**МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ
ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ
АНАЭРОБОВ**

Энергетический обмен (катаболизм)

- **Окислительный** = дыхание
- **Бродильный** = ферментативный
- **Смешанный**

Окислительный метаболизм (дыхание)

- Дыхание – процесс получения энергии в реакциях окисления-восстановления, сопряженных с реакциями окислительного фосфорилирования, при котором донорами электронов могут быть органические (у ор-ганотрофов) и неорганические у (лито-трофов) соединения, а акцептором – только неорганические соединения

Окислительный метаболизм (дыхание)

- Если акцептором электронов является молекулярный кислород, то это АЭРОБЫ
- Если акцептором электронов является нитрат или сульфат, то это АНАЭРОБЫ
 - Нитратное дыхание встречается у факультативных анаэробов
 - Бактерии, имеющие сульфатное дыхание (*Desulfovibrio* и *Desulfotomaculum*) медицинского значения не имеют

Отношение бактерий к кислороду

- **Облигатные анаэробы** – не используют кислород для получения энергии. Тип метаболизма – бродильный (исключение: *Desulfovibrio* и *Desulfotomaculum*)
 - Строгие анаэробы. Кислород для них токсичен. Энергию получают маслянокислым брожением (например, *C.botulinum*, *C.tetani*)
 - Аэротолерантные - не используют кислород для получения энергии, но могут существовать в его атмосфере (молочнокислые бактерии)

Различное физиологическое отношение микроорганизмов к кислороду связано с наличием у них ферментных систем, позволяющих существовать в атмосфере кислорода. Для нейтрализации токсичных форм кислорода микроорганизмы, способные существовать в его атмосфере, имеют: супероксиддисмутазу, пероксидазу, каталазу.

- **Облигатные аэробы** и факультативные анаэробы имеют супероксиддисмутазу и каталазу
- **Аэротолерантные** микроорганизмы не имеют супероксиддисмутазы, ее функцию выполняет высокая концентрация солей марганца. Перекись водорода у этих микроорганизмов разрушается пероксидазой
- **Строгие анаэробы** не имеют ни пероксидазы, ни каталазы, но супероксиддисмутаза встречается у многих анаэробов и коррелирует с их устойчивостью к кислороду

Супероксиддисмутаза расщепляет закисный радикал на перекись водорода и молекулярный кислород.

Перекись водорода может расщепляться каталазой (облигатные аэробы и факультативные анаэробы) или пероксидазой (аэротолерантные микроорганизмы).

Бродильный (ферментативный) метаболизм

- **Ферментация (брожение)** – процесс получения энергии, при котором отщепленный от субстрата водород переносится на органические соединения

Кислород в процессе брожения участия не принимает. Восстановленные органические соединения выделяются в питательную среду и накапливаются в ней. Продуктами брожения являются кислоты, газы, спирты.

Типы брожений

Исходя из природы конечных продуктов, различают несколько типов ферментации углеводов:

- Спиртовое
- Молочнокислое
- Муравьинокислое
- Маслянокислое

Если для бактерий с бродильным метаболизмом источником энергии служат белки, то такие бактерии называются пептолитическими (C.histolyticum, C.botulinum)

Методы создания анаэробных условий

- Физические
- Химические
- Биологические

Физические методы создания анаэробных условий

1. Для удаления растворенного в питательных средах кислорода производят их регенерацию путем кипячения в течение 15-20 минут на водяной бане с последующим быстрым охлаждением до 45-50°C. После посева для предотвращения проникновения кислорода в жидкую питательную среду ее поверхность заливают стерильным вазелиновым маслом или парафином.
2. Посев содержащего анаэробы патологического материала в высокий столбик плотной или полужидкой питательной среды, которая разливается в пробирки в объеме 10-12 мл. Кислород воздуха диффундирует обычно на расстояние 1,5-2,0 см от поверхности, а в глубине создаются благоприятные условия для роста облигатных анаэробов
3. Эвакуационно-заместительный метод заключается в удалении воздуха из герметически закрытых сосудов (анаэростатов, анаэробных боксов) с помощью вакуумного насоса с последующей заменой его инертным газом (азот, аргон, гелий) или бескислородной газовой смесью, состоящей из 80% азота, 10% двуокиси углерода и 10% водорода. В ряде случаев используют природный (магистральный газ). Для поглощения остатков кислорода из газовой смеси используют палладиевый катализатор. Для поглощения водяных паров на дно анаэростата помещают 5-6 г хлористого кальция, 10-12 г силикагеля или 20-30 г хлористого натрия.

Химические методы создания анаэробных условий

1. Применение щелочных растворов пиригидрохлорида для поглощения кислорода в замкнутой воздушной среде. Для поглощения кислорода из 220 мл воздуха применяют смесь, состоящую из 1 мл 20% раствора пиригидрохлорида и 1 мл насыщенного раствора карбоната натрия
2. Для поглощения кислорода из замкнутого пространства можно применять гидросульфит натрия. Для связывания кислорода в 1 л объема берут 100 мл свежеприготовленного 20% раствора Na_2SO_3 и 16% KOH. Эти реагенты связывают кислород быстрее, чем пиригидрохлорид
3. Для связывания остатков кислорода в предназначенный для роста анаэробов питательных средах используют вещества - редуценты, к которым относятся тиогликолат натрия (0,01-0,02%), аскорбиновая кислота (0,1%), различные сахара (0,1-3%), цистин и цистеин (0,03-0,05%), муравьино-кислый натрий (0,25-0,75%) и др.
4. Применение газогенерирующих систем для создания анаэробных условий в замкнутой воздушной среде (микроанаэроостатах, эксикаторах, прозрачных газонепроницаемых пакетах). Для образования водорода и двуокиси углерода, необходимых для роста облигатных анаэробов, используют специальные таблетки, которые активируются добавлением воды. Водород, генерируемый таблетками боргидрида натрия, связывает кислород воздуха в присутствии палладиевого катализатора с образованием воды. Углекислый газ вырабатывается при взаимодействии лимонной кислоты с бикарбонатом

Биологические методы создания анаэробных условий

1. Совместное выращивание анаэробов и аэробов (**метод Фортнера**). При этом на одну половину чашки Петри с плотной питательной средой засевают исследуемый материал, а на другую – культуру аэробного или факультативно-анаэробного микроорганизма, способного активно поглощать кислород. После посева чашку закрывают крышкой, края которой для герметизации заливают парафином или заклеивают пластилином. В качестве активного поглотителя кислорода из замкнутого пространства часто используют культуру «чудесной палочки» (*Serratia marcescens*). При недостаточной герметизации чашки этот микроорганизм образует ярко-красный пигмент, а при сохранении строго анаэробных условий вырастают бесцветные или бледно-розовые колонии.
2. Помещение в питательную среду кусочков печени, головного мозга, почек и других внутренних органов. При этом тканевые клетки активно поглощают и адсорбируют на себе кислород, в результате чего в среде создаются анаэробные условия. Примером питательной среды, сконструированной по этому принципу, является содержащая кусочки печени **среда Китта-Тароцци**. К тому же в печеночной ткани содержится большое количество веществ с SH-группой (цистеин, глутатион и др.), обладающих сильным редуцирующим действием.
3. Культуры некоторых облигатных анаэробов можно поддерживать путем пассажа на лабораторных животных.

Методы выделения чистых культур облигатных анаэробов

1. **Метод Цейсслера.** Исследуемый материал рассеивают штрихами по поверхности плотной питательной среды, помещают в анаэробные условия и выдерживают в термостате при 37°C в течение 24-72 ч. Изолированные колонии анаэробов пересеивают в среду для контроля стерильности (СКС) или среду Китта-Тароцци.
2. **Метод Вейнберга.** Несколько капель исследуемого материала вносят в пробирку с 4-5 мл изотонического раствора NaCl, перемешивают запаянным капилляром и переносят в пробирку с охлажденным до 45-50°C сахарным агаром, разлитым высоким столбиком. После перемешивания этим же капилляром последовательно засевают еще две пробирки с сахарным агаром и быстро охлаждают под струей холодной воды. Выросшие через 24-72 ч в глубине агара изолированные колонии анаэробов засевают в среду Китта-Тароцци или СКС.
3. **Метод Вейона-Виньяля.** Готовят разведения исследуемого материала в пробирках с сахарным агаром. Из каждой пробирки разведенный материал насасывают в пастеровские пипетки, после чего запаивают их концы. После получения микробного роста пипетку надпиливают в соответствующем месте, разламывают с соблюдением правил стерильности и переносят изолированную колонию в среду Китта-Тароцци или СКС.

Методы выделения чистых культур облигатных анаэробов

- 4. Метод Перетца.** Готовят разведения исследуемого материала. Содержимое пробирки с соответствующим разведением выливают в стерильную чашку Петри, на дне которой на двух стеклянных или деревянных палочках лежит стеклянная пластинка размером 6Х6 см. Среду заливают сбоку таким образом, чтобы она заполнила пространство между пластинкой и дном чашки Петри. При появлении микробного роста стеклянную пластинку удаляют, а изолированную колонию засевают в пробирку со средой Китта-Тароцци или СКС для получения чистой культуры.

Наиболее простой и удобной разновидностью метода Перетца является метод «перевернутых чашек». При этом каждое разведение исследуемого материала в пробирке с сахарным агаром заливают в крышку чашки Петри и закрывают стерильным донышком чашки, избегая образования пузырей воздуха. Щель между краями крышки и дном чашки Петри заливают расплавленным парафином. Термостатируют при 37°С до появления изолированных колоний анаэробов.

Питательные среды для выделения анаэробов

- **Среда Китта-Тароцци.** Бычью печень или мясо нарезают мелкими кусочками, заливают троекратным количеством питательного бульона рН 7,2 – 7,6, кипятят 30 мин. Бульон фильтруют. Печень промывают на сите водой, распределяют в пробирки по 3-4 кусочка в каждую, заливают 7-8 мл бульона (содержит 0,5 % глюкозы). Бульон кипятят 20 мин на водяной бане. Сверху на поверхность среды наливают стерильное масло слоем 1-1,5 см.
- **Среда Вильсона-Блера.** 100 мл 3% МПА с 1% глюкозы расплавляют на водяной бане, добавляют 10 мл 20% натрия сульфита и 1 мл 8 % раствора железа хлорида.
- **Среда Виллиса-Хоббса.** Смешивают 400 мл бульона Хоттингера, 4,8 г агара, 4,8 г лактозы, 1,8 мл нейтрального красного. После стерилизации добавляют 15 мл суспензии куриного желтка с физиологическим раствором и 60 мл стерильного обезжиренного молока.