

ЛЕКЦІЯ № 4

Тема: Живлення мікроорганізмів і закономірності мікробного росту

План

1. Поживні потреби мікроорганізмів.
2. Способи живлення й механізми надходження поживних речовин.
3. Типи живлення мікроорганізмів.
4. Закономірності мікробного росту.
5. Принципи культивування мікроорганізмів.

Найважливішими фізичними й хімічними параметрами культивування є: джерело живлення, енергії, рН, ОВП, аерація, температура. Для росту мікроорганізмів необхідна вода. Потреби різних мікроорганізмів щодо складу поживного середовища й інших умов досить різноманітні.

Мінімальні вимоги до середовища культивування: у них повинні бути наявні всі елементи, з яких будується клітина, у такій формі, у який мікроорганізми здатні їх засвоїти.

1. Харчові потреби мікроорганізмів

Потреби в хімічних елементах

За кількісним внеском у будову клітини розрізняють макро- і мікроелементи.

Макроелементи – 10 елементів, що входять в усі організми (С, О, Н, N, S, P, К, Са, Mg, Fe).

Мікроелементи – Mn, Mo, Zn, Cu, Ni, V, B, Cl – містяться в якості домішок у солях макроелементів, надходять із пилом зі скла лабораторного посуду. Тому для виявлення потреби в мікроелементах потрібні особливі методи.

Більшість елементів вносять у середовище у вигляді солей.

Приклад:

KH_2PO_4	0,3г
K_2HPO_4	0,5г
NH_4Cl	1,0 г
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 г
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01 г
$\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01 г
глюкоза	10,0 г
вода	1000 мл
розчин з мікроелементами	1 мл

Джерела вуглецю

Організми отримують енергію за допомогою фотосинтезу й шляхом окиснення неорганічних сполук, здатні використовувати CO₂ у якості головного джерела вуглецю. Ці автотрофні організми відновлюють CO₂.

Усі інші організми використовують вуглець із органічних речовин. Органічні речовини є джерелом енергії й вуглецю, частково вони асимілюються для побудови структур клітини й частково окиснюються для одержання енергії.

Із природних органічних сполук на Землі кількісно переважають полісахариди – целюлоза й крохмаль. Структурним компонентом є молекула глюкози.

Для росту мікроорганізмів необхідні наступні умови (оптимальні):

1. рН, температура, умови аерації;
2. джерело енергії;
3. джерело вуглецю;
4. донор водню (електронів).

Необхідні для росту також і **фактори росту**. Під факторами росту (або ростовими факторами) розуміють макромолекули, необхідні для побудови й функціонування бактеріальної клітини (їх клітини бактерій не здатні синтезувати самостійно). До таких речовин належать:

1. амінокислоти (складові частини білків);
2. пурини й піримідини (входять до складу нуклеїнових кислот);
3. вітаміни (входять до складу коферментів): біотин, нікотинова кислота, тіамін, пантотенат, ціанкобаламін. Необхідні в незначних кількостях.

Бактерії, що здатні синтезувати всі необхідні для життєдіяльності речовини належать до **прототрофів**. Якщо бактерії потребують додаткових речовин (факторів росту) належать до **ауксотрофів**. Для культивування таких бактерій на штучних поживних середовищах необхідно вносити до їх складу відповідні ростові фактори «у готовому вигляді».

Основними факторами росту для бактерій, що важко культивуються, є пуринові й піримідинові основи, вітаміни, деякі (звичайно незамінні) амінокислоти, кров'яні фактори (гемін) тощо.

2. Способи живлення й механізми надходження поживних речовин

Для росту й розмноження мікроорганізми потребують речовин, що використовуються для побудови структурних компонентів клітини й одержання енергії.

Поживні речовини можуть надходити до клітини в розчинному стані (це характерно для прокариот) – **осмотрофи**, або у вигляді окремих часток – **фаготрофи**. Переважна більшість бактерій – **осмотрофи** (поглинання речовин розчинених у воді).

Основним регулятором надходження речовин до бактеріальної клітини є цитоплазматична мембрана. Існує **чотири основні механізми надходження речовин**:

– **пасивна дифузія** – за градієнтом концентрації, що не має субстратної специфічності;

– **полегшена дифузія** – за градієнтом концентрацій, субстратспецифічна, здійснюється за участі спеціалізованих білків переносників **пермеаз**, що розміщені в мембрані;

– **активний транспорт** – проти градієнта концентрації, субстратспецифічний (спеціальні білки в комплексі з пермеазами), енерговитратний (за рахунок АТФ), речовини надходять до клітини в хімічно незміненому вигляді;

– **транслокація (перенос груп)** – проти градієнта концентрацій, за допомогою фосфотрансферазної системи, енерговитратна, речовини (переважно цукри) надходять у клітину у фосфорильованому вигляді.

3. Типи живлення мікроорганізмів

Автотрофи – мікроорганізми, здатні засвоювати або фіксувати вуглекислоту повітря як єдине джерело вуглецю й синтезувати з неї органічні речовини.

Гетеротрофи – організми, що використовують для конструктивного обміну вуглець із складних органічних сполук.

Розрізняють наступні типи гетеротрофії: *паразитизм* *облігатний внутрішньоклітинний*, *паразитизм факультативний*, *сапрофітизм*.

Гетеротрофи, які можуть використовувати в якості джерела вуглецю так звану «мертву органіку» (наприклад, розчин глюкози), називаються *сапрофітами*. Сапрофіти потребують різних концентрацій органічних речовин. *Оліготрофи* – здатні рости при низьких концентраціях органічної речовини (1–15 мг вуглецю в літрі розчину). *Копіотрофи* – віддають перевагу високим концентраціям поживних речовин (10 грам вуглецю в літрі розчину).

Гетеротрофи, які використовують у якості джерела вуглецю органічні сполуки (метаболіти) *живої клітини*, називаються *паразитами*. Переважна більшість бактерій цієї групи можуть використовувати в якості джерела вуглецю як «мертву», так і «живу» органіку. Такі бактерії називаються *факультативними паразитами*. Вони здатні рости поза клітини хазяїна при сприятливих умовах, їх можна культивувати на штучних поживних середовищах, до складу яких входять розчини органічних сполук.

Рикетсії й хламідії не можуть використовувати в якості джерела вуглецю «мертву» органіку. Вони можуть розмножуватися тільки в живих клітинах, використовуючи їх органічні речовини для своїх метаболічних процесів, оскільки мають скорочений метаболізм, який залежить від метаболізму хазяїна, їх називають *облігатними паразитами*. Як і віруси, ці бактерії не ростуть на штучних поживних середовищах.

Залежно від механізму перетворення енергії в доступну для клітини біохімічну (макроергічні зв'язки АТФ) розрізняють два типи метаболізму: *фототрофний* (світло) і *хемотрофний*.

Фототрофи – організми, що використовують енергію сонячного світла, трансформуючи її в хімічну (ціанобактерії, анаеробні, фототрофні сіркобактерії).

Хемотрофи – використовують енергію, звільнену при реакціях окиснення-відновлення (ОВР).

Залежно від того, які речовини є донорами електронів, мікроорганізми підрозділяються на 2 групи: *органотрофи* й *літотрофи*.

Органотрофи – організми, що використовують у якості донора водню органічні речовини.

Літотрофи – використовують у якості донорів електронів неорганічні речовини (H_2 , NH_3 , H_2S , S , CO , Fe^{2+} і ін.).

За трьома вищевказаним критеріями (джерело енергії, джерело вуглецю, донор електронів) виділяють 8 фізіологічних груп (таблиця 1).

Типи живлення (способи існування) бактерій

Тип живлення	Джерело енергії	Донор електронів	Джерело вуглецю	Представники
Хемоліто-автотрофія	Окисно-відновні реакції	неорганічні речовини	CO ₂	Нітрифікуючі бактерії, тіонові, водневі бактерії, залізобактерії
Хемоліто-гетеротрофія	-\\-	неорганічні речовини	органічні речовини	Метанові, метилредукуючі бактерії
Хемоорганіто-автотрофія	-\\-	органічні речовини	CO ₂	Факультативні метилотрофні бактерії
Хемоорганіто-гетеротрофія	-\\-	органічні речовини	органічні речовини	Ентеробактерії, молочнокислі, маслянокислі
Фотоліто-автотрофія	Сонячне світло	неорганічні речовини	CO ₂	Деякі пурпурні й зелені бактерії, ціанобактерії
Фотоліто-гетеротрофія	-\\-	неорганічні речовини	органічні речовини	Деякі пурпурні й зелені бактерії
Фотоорганіто-автотрофія	-\\-	органічні речовини	CO ₂	Деякі пурпурні бактерії
Фотоорганіто-гетеротрофія	-\\-	органічні речовини	органічні речовини	Деякі пурпурні й зелені бактерії, галобактерії.

Потреби мікроорганізмів у кисні

Кисень надходить у клітину в складі води, вуглекислого газу й органічних речовин. Необхідний і молекулярний кисень. Головна функція O₂ полягає в тому, що він є кінцевим акцептором електронів у дихальному ланцюзі (O₂ → до H₂O).

Стосовно молекулярного кисню бактерії можна розділити на кілька *фізіологічних груп*.

1). **Облигатні** (обов'язкові, строгі) **аероби** – бактерії, здатні одержувати енергію тільки шляхом дихання й тому потребують молекулярного (атмосферного) кисню для дихання (21%). До них належать *сарцини, сінна паличка, туберкульозні паличка, вібріони*.

2). **Мікроаерофіли** – бактерії, що потребують низьких концентрацій (низького парціального тиску) вільного кисню (2-5%), адже високі концентрації кисню пригнічують їхній ріст. Для створення цих умов у газову суміш для культивування звичайно додають CO₂, наприклад до 10 % концентрації. Представники – *молочнокислі бактерії, актиноміцети, азотфіксатори, воденьокиснюючі бактерії*.

3). **Факультативні анаероби** (або *факультативні аероби*) можуть споживати глюкозу й розмножуватися, як в аеробних, так і анаеробних умовах, тобто ростуть за будь-яких умов аерації. Вони можуть перемикає свій енергетичний метаболізм із аеробного дихання (за присутності O₂) на бродіння або анаеробне дихання (за відсутності O₂). Серед них є мікроорганізми, толерантні до відносно високих (близьких до атмосферних) концентрацій молекулярного кисню – тобто **аеротолерантні**. Прикладом аеротолерантних мікроорганізмів є бактерії роду *Clostridium*, *денітрифікуючі та сульфатредукуючі бактерії, а також велика група ентеробактерій*.

4). **Облигатні анаероби** розмножуються тільки в анаеробних умовах, тобто за відсутності кисню, який для них є шкідливим чинником. Біохімічно анаеробне дихання протікає по типу бродильних процесів, молекулярний кисень при цьому не

використовується (*Metanosarcina*, *Metanobacterium*, *Cl. tetani*, *Cl. perfringes*, *Cl. acetobutylicum*).

Залучення кисню повітря в окисно-відновні реакції супроводжується утворенням перекісного радикалу (O^{\bullet}) – атома кисню із зайвим електроном на зовнішній оболонці. Це дуже сильний окиснювач. Залежно від того, як бактерії вирішують проблему його нейтралізації, і залежить їхня здатність існувати в кисневому середовищі. На практиці найпростішим методом визначити відношення досліджуваного виду бактерій до кисню повітря, є реєстрація характеру росту цих бактерій при засіві уколом у стовпчик напіврідкого середовища.

Облигатні аероби перекісний радикал, що утворився, за допомогою ферменту супероксиддисмутази переводять у перекис водню. Перекис водню нейтралізується з утворенням води й молекулярного кисню за допомогою, наприклад, *каталази*. За відсутності кисню такі бактерії не ростуть, тому що не можуть використовувати інші молекули як акцептор електронів.

Мікроаерофіли ростуть при більш низькому, ніж у атмосферному повітрі, вмісту кисню. До них належать, наприклад, молочнокислі бактерії, які у великій кількості населяють кишечник людини.

Облігатні анаероби позбавлені не тільки ферментів, що нейтралізують перекис водню, але й *супероксиддисмутази*. У результаті чого вони гинуть при найменшому контакті з атмосферним повітрям.

Аerotолерантні анаероби, не маючи ферментів, що нейтралізують перекис водню, містять супероксиддисмутазу. Такі бактерії витримують короткочасний контакт із атмосферним повітрям, наприклад під час узяття патологічного матеріалу або посіву його на живильну, середовище але культивуватися можуть лише в анаеробних умовах.

Однак найчастіше медична мікробіологія має справу з *факультативними анаеробами*, які мають повний набір ферментів, що дозволяють їм рости й розмножуватися як за присутності, так за відсутності кисню повітря – тобто в будь-яких умовах аерації.

4. Закономірності мікробного росту

Терміни «розмноження бактерій» і «ріст бактерій» часто використовують як синоніми, хоча ці терміни позначають, строго говорячи, різні явища. Під *ростом бактерій* розуміють збільшення розмірів бактеріальної клітини, а під *розмноженням бактерій* – збільшення числа бактеріальних клітин. Однак коли мають на увазі бактеріальну популяцію в цілому, то в цьому випадку терміном «ріст» позначають збільшення кількості особин у популяції. В останньому випадку більш коректно використовувати термін «ріст бактеріальної культури».

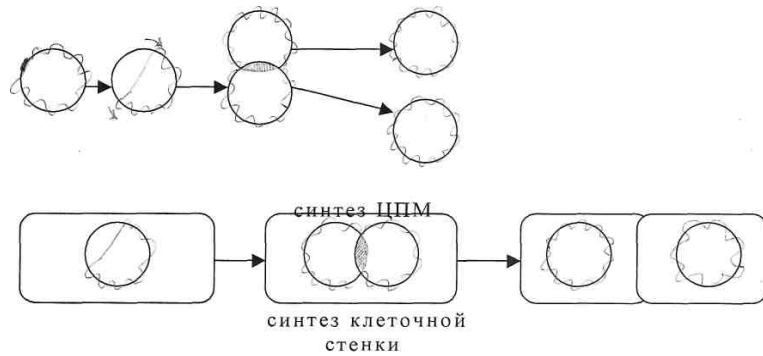
Основний спосіб розмноження для більшості бактерій – **бінарний поділ**.

– у *грампозитивних бактерій* бінарний поділ відбувається шляхом формування *поперечної перегородки* від протилежних боків клітинної стінки до центру, де обидві частини перегородки зливаються, формуючи тим самим дві самостійні клітини.

– у *грамнегативних бактерій* бінарний поділ відбувається шляхом *перешнуровування* – утворенням перетяжки, тобто звуженням клітини в місцях поділу, аж доки вона не поділиться на дві

Ряд бактерій можуть ділитися шляхом **брунькування** (наприклад, франциселли, мікоплазми, *Nitrobacter*). Ті бактерії, які формують ниткоподібні форми, можуть ділитися шляхом їхньої **фрагментації** (наприклад, актиноміцети, мікоплазми). Також може відбуватися зміна способів поділу – у тіонових і міксобактерій.

У стрептоміцетів існує спосіб розмноження **екзоспорами**.



Період від поділу до поділу клітини називається онтогенезом, або *клітинним циклом бактерій*. Розрізняють кілька типів вегетативного клітинного циклу у бактерій:

- 1) *мономорфний* – при якому утворюється лише один морфологічний тип клітин (р. *Bacillus*, *Escherichia*);
- 2) *диморфний* – коли формуються два морфологічних типи клітин бактерій;
- 3) *поліморфний* – при якому утворюються кілька морфологічно різних типів клітин (р. *Arthrobacter*, *Actinomyces*).

При рості бактерій у бактеріальній популяції відбувається три взаємозалежні процеси: *індивідуальний ріст клітин, розмноження бактерій і відмирання клітин*.

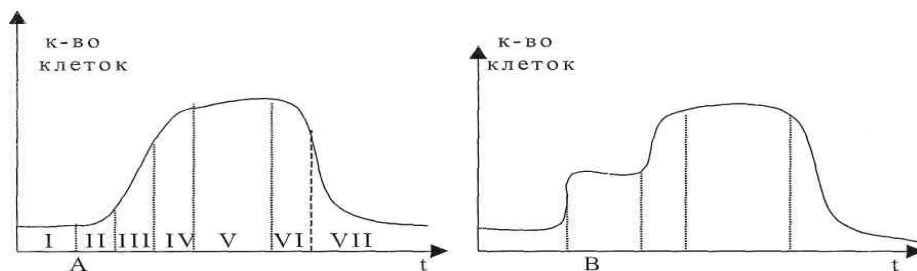
При вирощуванні мікробів у рідких поживних середовищах за стаціонарних умов виділяють основні фази росту бактеріальної популяції, що відбивають загальні закономірності росту й розвитку.

I. Початкова фаза, або лаг-фаза – від моменту засіву бактерій у рідке поживне середовища й до початку активного росту. Це стадія адаптації з уповільненим темпом приросту біомаси бактерій. Тривалість залежить від умов культивування, віку й видової специфічності бактерій.

II. Експоненціальна, або лог-фаза (фаза геометричного росту) – фаза з різким ростом чисельності популяції мікроорганізмів (2^n). У цей період розмноження бактерій відбувається з максимальною швидкістю (кількість клітин збільшується в геометричній прогресії). Відбувається швидке поглинання поживних речовин із середовища й нагромадження продуктів метаболізму.

III. Стаціонарна фаза (фаза рівноваги розмноження й відмирання мікробних клітин). Наступає, коли кількість біомаси клітин перестає збільшуватися – кількість новоутворених клітин дорівнює числу відмерлих. Ця фаза характеризується максимальною величиною біомаси мікробних клітин.

IV. Фаза відмирання – стадія загибелі – зменшення чисельності популяції у зв'язку зі зменшенням і відсутністю умов для розмноження мікроорганізмів (дефіцит поживних речовин, зміна рН, концентрації іонів й інших умов культивування).



Фази росту

Фази росту

А – крива росту розвитку популяції клітин; В – крива росту при диауксії (глюкоза, сорбіт).

Дана динаміка характерна для *періодичних культур* з поступовим виснаженням запасу живильних речовин і нагромадженням метаболітів.

4. Принципи культивування мікроорганізмів

Культуральні ознаки бактерій

Культуральні ознаки – це друга, після морфологічних, група ознак, що використовується для опису й, відповідно, ідентифікації бактеріальної культури.

1. **Поживні потреби** описуються, насамперед, як *прості* (здатність до росту на простих натуральних поживних середовищах) або *складні* (необхідність використання для культивування культури складного натурального поживного середовища). Крім того, при характеристиці складних харчових потреб наводять список тих середовищ, на яких здатна рости дана бактеріальна культура.

2. **Оптимальне поживне середовище** – це середовище, що найбільш підходить для культивування даного виду бактерій. Навіть для культивування бактерій із простими поживними потребами можуть бути розроблені складні поживні середовища на яких даний вид мікробів росте краще, ніж на простих середовищах.

3. **Температура культивування** – оптимальна температура для більш швидкого росту даного виду.

4. **Умови аерації** – склад газової суміші, що найбільш повно відповідає фізіологічним потребам даної культури. Така атмосфера культивування дозволяє одержати більш швидкий ріст культури.

5. **Швидкість росту** – час появи видимого росту (нальоту, колоній, каламуті – залежно від консистенції живильного середовища й концентрації інокуляту) після посіву бактеріальної культури. Залежить від часу, за який відбувається один поділ бактеріальної клітини (наприклад, у кишкової палички – приблизно 20 хвилин, у туберкульозної палички – приблизно 18 годин), яка, у свою чергу, є похідним якості живильного середовища й умов культивування. При характеристиці виду мікробів вказується швидкість росту культури на оптимальному поживному середовищі за оптимальних умов культивування.

6. **Характер росту на рідких і щільних поживних середовищах** є дуже важливою культуральною ознакою.

Класифікація штучних поживних середовищ

Існують два основні принципи культивування мікроорганізмів – *in vivo* і *in vitro*.

Мікроорганізми – **облігатні паразити** (рикетсії, хламідії, віруси) можна культивувати тільки *in vivo*, тобто внутрішньоклітинно. Для цього використовують методи, розроблені вірусологами – культивування мікроорганізмів у культурі клітин, у пташиних ембріонах, у організмі лабораторних тварин.

Мікроорганізми – **факультативні паразити** (тобто всі бактерії, крім рикетсій і хламідій) можна культивувати *in vitro* – на штучних поживних середовищах, які класифікуються за своєю консистенцією, хімічним складом й призначенням.

За **консистенцією** поживні середовища класифікуються на рідкі, щільні (1,5–3% агару) і напіврідкі (0,3–0,7 % агару) середовища.

Агар – полісахарид складного складу з морських водоростей, основний згущувач для щільних (твердих) середовищ. У якості універсального джерела вуглецю й азоту застосовують **пептони** – продукти ферментації білків пепсином, різні **гідролізати** – м'ясний, рибний, казеїновий, дріжджовий тощо.

За **призначенням** середовища розділяють на ряд груп:

– **універсальні** (прості), придатні для різних невибагливих мікроорганізмів (м'ясо-

пептонний бульйон – МПБ, м'ясо-пептонний агар – МПА);

– **спеціальні** – середовища для мікроорганізмів, що не ростуть на універсальних середовищах (середовище Мак-Яка виявлення збудника туляремії, середовище Левенштейна-Иерсена для збудника туберкульозу);

– **селективні (елективні)** – для виділення певних видів мікроорганізмів і пригнічення росту супутніх (пептонна вода, середовище Виноградського для бактерій, що нітрифікують, середовище Ешбі для азотобактера, Чапек-агар для актиноміцетів і мікроскопічних грибів, селенітове середовище, середовище Мюллера);

– **диференційно-діагностичні** – для диференціації мікроорганізмів за ферментативною активністю й культуральними властивостям (середовища Ендо, Симмонса для ентеробактерій, Плоскирьова, Левіна, Гісса).

За походженням середовища класифікують на природні, напівсинтетичні й синтетичні.

Виноградський і Бейеринк розробили техніку *накопичувальних культур*. Цей метод дуже простий. Для нагромадження створюють умови, при яких даний організм долає конкуренцію інших.

Вимоги до умов культивування бактерій

Для того, щоб успішно культивувати бактерії на штучних поживних, середовищах необхідно враховувати не тільки їх живильні потреби, але й температуру культивування, реакцію середовища (рН), а також необхідні конкретному виду умови аерації.

1. За **оптимальною температурою** культивування бактерії класифікуються на три групи: *термофіли*, *мезофіли* й *психрофіли*.

Оптимальна температура культивування **термофілів** становить 50–60°C. Зі зрозумілих причин термофіли не становлять предмет вивчення медичної мікробіології.

Переважає більшість бактерій, що мають медичне значення, найкраще ростуть за температури людського організму, тобто 37°C. Такі бактерії називаються **мезофілами**.

Ряд патогенних для людини бактерій найкраще ростуть при більш низьких температурах (від 6 до 20°C) і називаються **психрофілами**.

2. Залежно від необхідної реакції поживного середовища (**рН**) бактерії підрозділяються на три основні групи, для позначення двох з яких використовуються особливі терміни.

Ті з них, які найкраще ростуть на кислих живильних, середовищах називаються **ацидофілами**. Бактерії, для культивування яких необхідно використовувати лужні середовища, називаються **алкаліфілами**.

Переважає більшість патогенних для людини бактерій ростуть на середовищах із нейтральним рН. Для позначення цієї групи бактерій ніяких особливих термінів не використовується.

3. За вимогами щодо **умов аерації** під час культивування бактерії можна розділити на чотири основні групи (див. п. 3):

1) **Облігатні аероби** вимагають під час культивування постійного доступу повітря до поверхні живильного середовища.

2) **Анаероби**, навпаки, культивуються в безповітряному середовищі.

3) Особливого газового складу для свого культивування вимагають **мікроаерофіли** (зниженого вмісту кисню) і **капнофіли** (підвищеного вмісту вуглекислого газу).

4) **Факультативні анаероби** ростуть за будь-яких умов аерації.

Розмноження деяких бактерій можливо тільки в атмосфері особливого газового складу. Такі бактерії мають *супероксиддисмутазу*, але ступінь активності каталази або інших ферментів, що нейтралізують перекис водню, може бути недостатньою.

Існують також бактерії, які вимагають для свого успішного культивування створення особливої газової суміші, що включає як знижену кількість кисню, так і підвищений вміст вуглекислого газу. Тобто такі бактерії можна визначити одночасно як *мікроаерофіли* й *капнофіли*. Такі особливі вимоги до аерації при культивуванні необхідно створювати при культивуванні, наприклад, *кампілобактерії* й *гелікобактер*.

Переважає більшість патогенних бактерій є анаеробами й можуть рости за відсутності кисню. При мікробіологічній діагностиці хвороб, викликаних цією групою бактерій, відбір патологічного матеріалу й посів його на поживні середовища, і власне культивування необхідно проводити з дотриманням спеціальних прийомів, що виключають контакт збудника з атмосферним повітрям.

Характер росту бактерій на штучних поживних середовищах

Характер росту бактерій залежить, насамперед, від того, яке поживне середовище – рідке (*бульйонна культура*) або щільне (*субстрат*) – використовується для культивування.

На рідких поживних середовищах (наприклад, МПБ) для всього різноманіття бактерій можна виділити чотири форми росту:

1. Більшість бактерій формують **дифузну каламуть**.
2. Так звані «коховські бактерії», названі так тому, що їхні основні патогенні представники були відкриті Р. Кохом, – *бацили*, *мікобактерії* й *вібріони* – утворюють на поверхні бульйону **плівку**.
3. Для *стрептококів* характерний так званий **придонний** або **пристінковий ріст** – осад або дрібні пластівці на стінках пробірки при прозорому бульйоні.
4. Збудник чуми – *Yersinia pestis* – росте у вигляді **плівки** на поверхні бульйону, від якої спускаються тяжі, схожі на сталактити, може формуватися й осад.

На щільних живильних середовищах (наприклад, м'ясо-пептонний агар) ріст бактерій залежить від способу їх засіву.

1. Якщо щільність засіву більша, то бактерії формують на поверхні агару суцільний наліт – так званий «**ріст газonom**» або «суцільний ріст».
2. Якщо засів проводиться таким чином, що кожна бактеріальна клітина лежить на поверхні агару окремо від інших, то після багаторазових поділів вона формує ізольовану **колонію** (говорять ще про «**ізолюваний ріст**»). З огляду на те, що колонія – результат розмноження однієї клітини, її, з деяким припущенням, розглядають як *клональну культуру*. Саме з матеріалу окремої, ізольованої колонії в процесі культурального методу дослідження одержують «чисту культуру» – культуру, що містять клітини тільки одного виду.

Чиста культура – популяція одного виду мікроорганізмів.

Основні принципи одержання чистих культур:

- 1) механічне роз'єднання;
- 2) розсіювання;
- 3) серійні розведення;
- 4) використання елективних середовищ;
- 5) особливих умов культивування (з урахуванням стійкості деяких мікробів до певних температур, кислот, лугів, парціального тиску кисню, рН тощо).

Усе величезне різноманіття за зовнішнім виглядом (морфологією) колоній можна звести до двох основних типів:

– **S-форма** колоній («гладка») – гомогенна, з рівним краєм, куполовидна, волога, прозора або напівпрозора. Усі **S-форма** колоній подібні одна з одною, відрізняючись у різних видів бактерій або їх варіантів розміром, а у випадку пігментоутворення або росту на диференційно-діагностичних середовищах – і кольором. S-форму колоній утворюють: коки, грамнегативні палички (крім збудника чуми *Yersinia pestis*).

– **R-форма** колоній («шорсткувата») – не гомогенна, непрозора, з нерівним краєм, з найрізноманітнішими варіантами розташування щодо поверхні поживного середовища (від тих, що піднімаються над ним, до занурених у середовище). **R-форми** колоній різних бактерій можуть різко відрізнятися одна від одної, для їхнього опису нерідко використовують порівняльні обороти (говорять, наприклад, про колонії, схожі на квітку маргаритки в збудника дифтерії, схожих на кольорову капусту або бородавку – у збудників туберкульозу тощо). R-форму колоній утворюють: грампозитивні палички, збудник чуми (*Yersinia pestis*).

Стадії росту періодичної бактеріальної культури

Культивування мікроорганізмів у рідкому поживному середовищі проводять двома способами: 1) стаціонарним методом; 2) періодичним, коли є надходження й відтік поживних речовин.

При вирощуванні бактерій у рідкому поживному середовищі необхідно постійно відбирати бактеріальну масу, видаляти продукти метаболізму бактерій і додавати нове повноцінне поживне середовище. Тобто, постійно підтримувати оптимальні умови культивування. У цьому випадку культура буде постійно рости з максимальною швидкістю. Така культура називається **хемостатною** (*безперервною*), тому що для її одержання використовують спеціальне устаткування – **хемостати**, які й дають можливість проводити вищезазначені маніпуляції. Такі культури використовуються в промисловій мікробіології для одержання корисних речовин – продуктів мікробного метаболізму (антибіотиків, амінокислот, ферментів тощо). Якщо ж бактеріальна культура вирощується в пробірці (саме такий спосіб використовується в медичній мікробіології), то із часом у поживному середовищі накопичуються продукти бактеріального метаболізму, а середовище, навпаки, виснажується. У результаті, аби культура не загинула, її необхідно періодично пересівати на свіже поживне середовище. Така культура називається **періодичною**.

Методи створення аеробних і анаеробних умов для культивування бактерій

Культивування аеробів:

- 1) на поверхні щільних і рідких поживних середовищ;
- 2) культивування в тонкому шарі середовища.
- 3) глибинне культивування в рідких середовищах – на качалках (струшування або обертання);
- 4) продування, аерація стерильним повітрям.

Культивування анаеробів:

Залежно від способу створення безповітряного середовища, усі методи створення анаеробних умов для культивування бактерій поділяють на *фізичні, хімічні й біологічні*. Особливим є метод Кітта-Тароцці, що поєднує в собі фізичні, хімічні й біологічні способи створення безкисневого середовища для культивування мікробів.

1. **Фізичні** – вирощування в **мікроанаеростатах** – вакуумних металевих камерах, обладнаних манометром, шляхом відкачування повітря, уведення спеціальної газової безкисневої суміші (найчастіше за складом: N_2 – 85 %, CO_2 – 10 %, H_2 – 5 %).

2. **Хімічні** – застосування хімічних поглиначів кисню. Для зв'язування кисню повітря можна провести в замкненому об'ємі (наприклад, у ексикаторі із притертою кришкою) хімічну реакцію, яка протікає з поглинанням повітря.

За **методом** Аристовського – із цією метою використовуються сипучі інгредієнти.

За **методом** Омелянського – із цією метою використовуються рідкі інгредієнти (пірогалол або луґи).

Сучасна мікробіологічна промисловість випускає спеціальні набори, за допомогою яких можна створити газову суміш, як з повною відсутністю кисню, так і з присутністю його, а також вуглекислого газу й азоту в певних концентраціях, необхідних для культивування бактерій з «нестандартними» вимогами до умов аерації.

3. **Біологічні** – спільне культивування облігатних аеробів і анаеробів (аероби поглинають кисень і створюють умови для розмноження анаеробів). Принцип його полягає в тому, що в замкненому об'ємі (наприклад, у парафінованій чашці Петрі) одночасно культивуються анаероб й так званий «жадібний аероб» – вид бактерій, що здатен посилено поглинати для свого росту кисень. У якості останнього найчастіше використовується ентеробактерія *Serratia marcescens*. Аероб поглинає весь кисень, створюючи тим самим умови для росту анаероба.

4. **Змішані** – використовують кілька різних підходів.

Необхідно відзначити, що створення оптимальних умов для облігатних анаеробів – дуже складне завдання. Досить складно забезпечити постійну підтримку безкисневих умов культивування:

- 1) необхідні спеціальні середовища без вмісту розчиненого кисню;
- 2) підтримка необхідного окисно-відновного потенціалу поживних середовищ;
- 3) відбір, доставка, посів матеріалу в анаеробних умовах.

Існує ряд прийомів, що забезпечують більш сприятливі умови для анаеробів:

- 1) попереднє кип'ятіння живильних середовищ;
- 2) посів у глибокий стовпчик агару;
- 3) у товщі щільного середовища (трубка Буррі) для чистих культур;
- 4) по Хангейту;
- 5) заливання середовищ вазеліновою олією для запобігання доступу кисню;
- 6) використання флаконів і пробірок, що герметично закриваються;
- 7) шприців і лабораторного посуду з інертним газом;
- 8) використання ексікаторів з палаючою свічею, що щільно закриваються;
- 9) вирощування в *анаеростатах* – спеціальних приладах для створення анаеробних умов.