

Тема: Питание микроорганизмов.

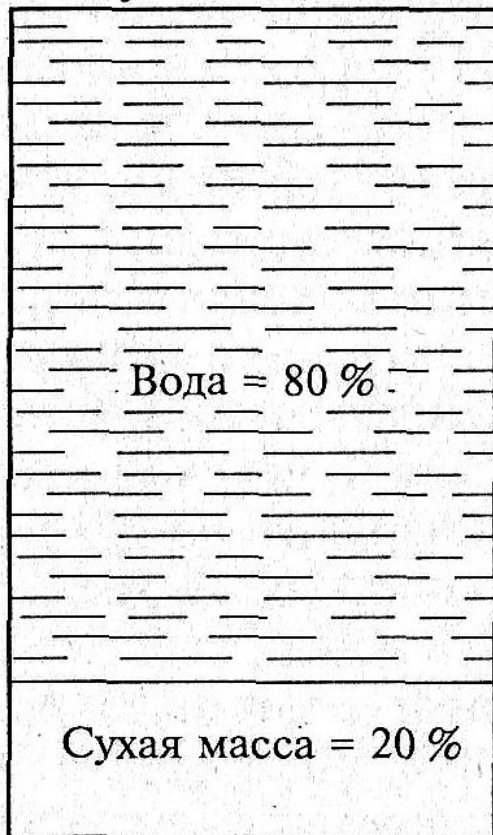
Методы выделения чистых культур микроорганизмов.

Методы определения количества бактерий.

Методы стерилизации и дезинфекции.

Химический состав бактериальной клетки

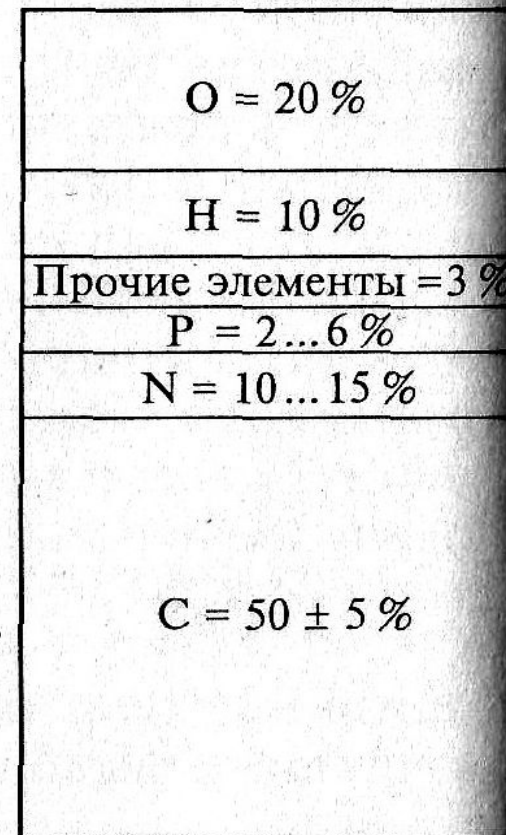
Сухое вещество



Полимерные соединения



Элементы



I группа – макробиогенные (N, H, O, C)

II группа – олигобиогенные (K, Na, Cl, S, Mg, Fe, Ca, P)

III группа – микробиогенные (Zn, Mn, Co, Cu, F, Br, I)

IV группа – ультрамикробиогенные (B, V, Si, Li, Al, Sn, As, Mo)

Факторы роста (основные группы)

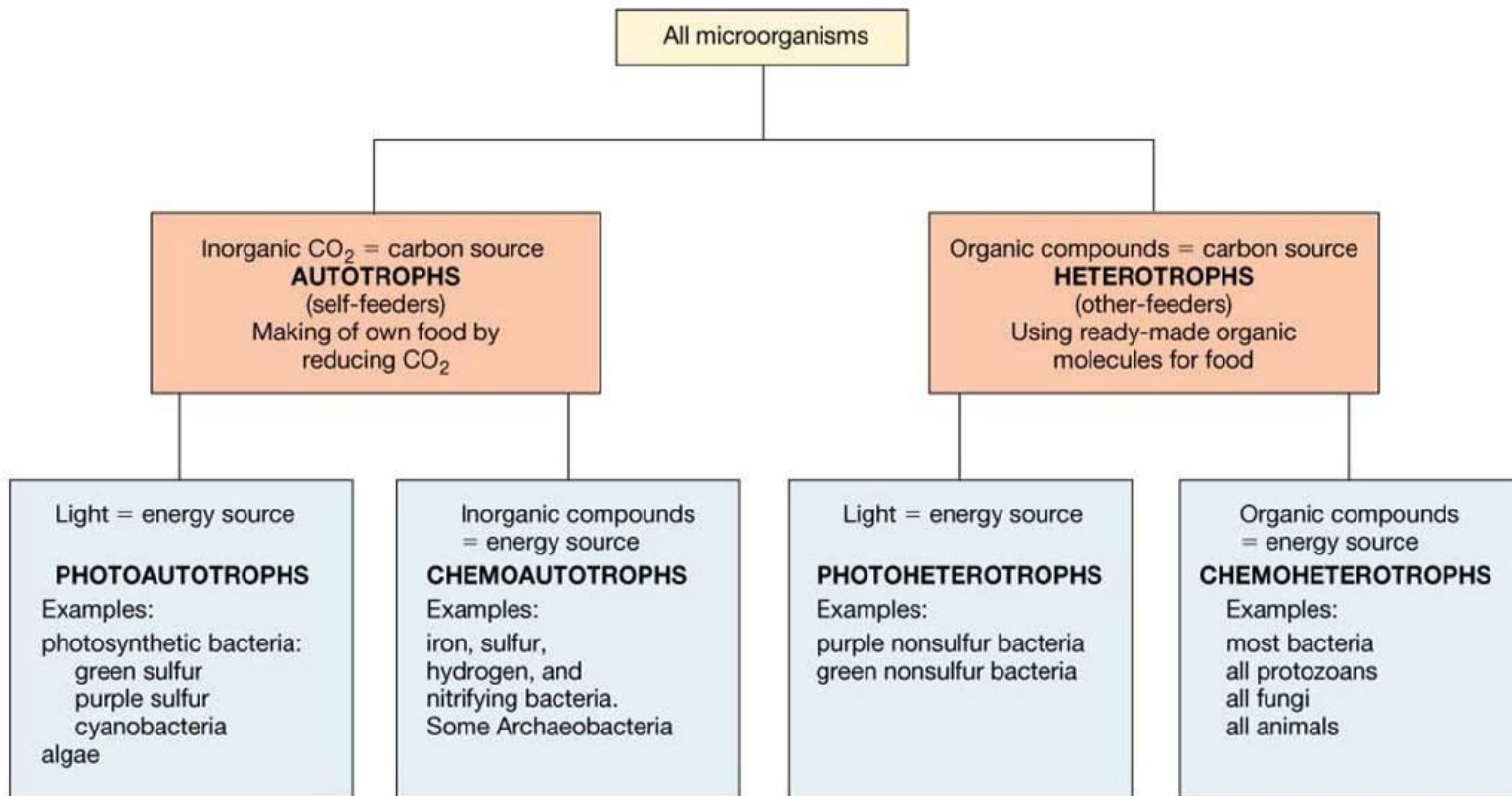
1. Аминокислоты

2. Пуриновые и пиримидиновые основания и их производные

3. Липиды

4. Витамины

Классификация микроорганизмов по источнику углерода



Способы существования прокариотных микроорганизмов
(по Заварзину, 1974; Е. Н. Кондратьевой, 1975)

Источник энергии	Доноры электронов	Конечные акцепторы электронов	Источник углерода для построения вещества тела	Способ существования	Представители	
Окислительно-восстановительные реакции	неорганические соединения (H ₂ , H ₂ S, NH ₃ , Fe ²⁺ и др.)	молекулярный кислород	CO ₂	хемолитоаэроавтотрофия	нитрифицирующие, тионовые, водородные бактерии	
			органические соединения	хемолитоаэрогетеротрофия	некоторые водородные и железобактерии	
		CO ₂ , SO ₄ ²⁻	CO ₂	хемолитоанаэроавтотрофия	метанобразующие бактерии	
			органические соединения	хемолитоанаэрогетеротрофия	сульфатовосстанавливающие бактерии	
	органические соединения	молекулярный кислород	CO ₂	хемоорганонаэроавтотрофия	окисление муравьиной кислоты бактериями	
			органические соединения	хемоорганонаэрогетеротрофия	большинство бактерий*	
		органические соединения	CO ₂	хемоорганонаэроавтотрофия	метанобразующие бактерии	
			органические соединения	хемоорганонаэрогетеротрофия	молочнокислые, маслянокислые и другие бактерии, осуществляющие брожение	
	Свет	неорганические соединения (H ₂ O, H ₂ S, S и др.)	—	CO ₂	фотолитоавтотрофия	цианобактерии, большинство пурпурных и зеленых серобактерий, некоторые несерные пурпурные бактерии**
				органические соединения	фотолитогетеротрофия	некоторые цианобактерии, большинство пурпурных и зеленых серобактерий
органические соединения		—	CO ₂	фотоорганонавтотрофия	некоторые пурпурные бактерии	
			органические соединения	фотоорганогетеротрофия	все несерные пурпурные бактерии, некоторые пурпурные и зеленые серобактерии, галобактерии	

* Все животные, грибы.

Классификация микроорганизмов

в зависимости от источника питания

А) По источнику углерода:

А Втотрофы

Гетеротрофы

Б) По источнику азота:

Аминоа Втотрофы

Аминогетеротрофы

В) По источнику энергии:

Фототрофы

Хемотрофы

Литотрофы

Органотрофы

Г) По типу экологической связи:

Сапрофиты

Паразиты (факультативные
и облигативные)

Прототрофы

Ауксотрофы

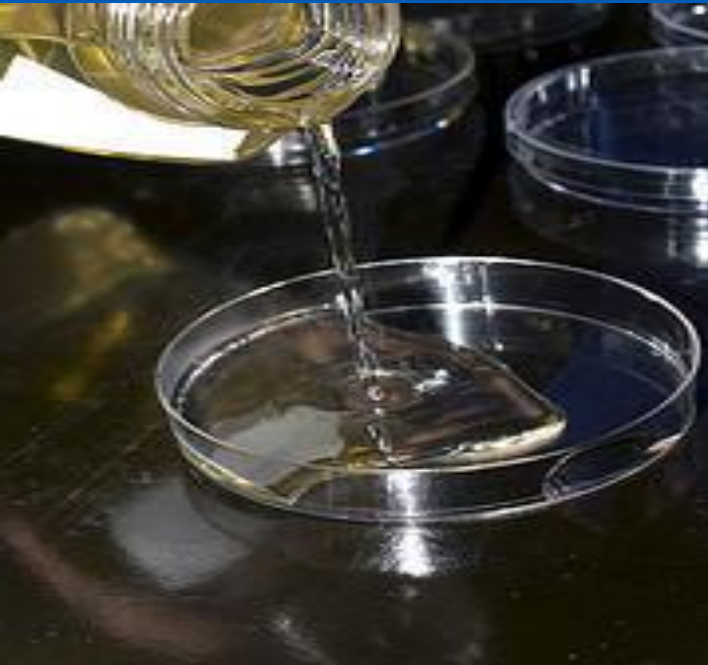
Классификация микроорганизмов
в зависимости от конечного
акцептора электронов

- 1. Облигатные (строгие) аэробы**
- 2. Факультативные анаэробы**
- 3. Облигатные анаэробы**
- 4. Микроаэрофилы**

Классификация питательных сред

- Питательные среды делят *по консистенции, составу, назначению*.
- В зависимости от *консистенции* различают жидкие (мясопептонный бульон, сахарный бульон), плотные (1-2% мясопептонный агар, свернутая сыворотка), полужидкие (0, 2-0, 5% мясопептонный агар) питательные среды. Для получения П. с. плотной консистенции к жидкой среде добавляют обычно агар-агар - полисахарид, добываемый из морских водорослей, или желатин - вещество белковой природы животного происхождения.
- *По составу среды* могут быть простыми и сложными
- В зависимости от *назначения* выделяют элективные, среды обогащения, дифференциально-диагностические.

Простые(универсальные, основные) питательные среды



- мясо-пептонный бульон (**МПБ**) — жидкая среда
- мясо-пептонный агар (**МПА**) — плотная среда
- ❖ Обеспечивают рост большинства бактерий
- ❖ Служат основой для приготовления сложных сред

Сложные среды с повышенной питательной ценностью

- Обогащенные

глеводами

сахарный

бульон/агар)

Обогащенные

желтками (кровяной,
сывороточный, асцит

бульон/агар)



- Рост гноеродного стрептококка на кровяном агаре(вокруг колоний видны зоны гемолиза)

Элективныe (избирательные) питательные среды

- Обеспечивают преимущественный рост определенной группы бактерий



- *Среда Леффлера* (свернутая сыворотка крови с сахарным бульоном) - эффективна для дифтерийной палочки

Элективные (избирательные) питательные среды (продолжение)



- *Щелочной агар* для холерного вибриона

- *Желточно-солевой агар* для *S. aureus*

Элективныe (избирательные) питательные среды (продолжение)

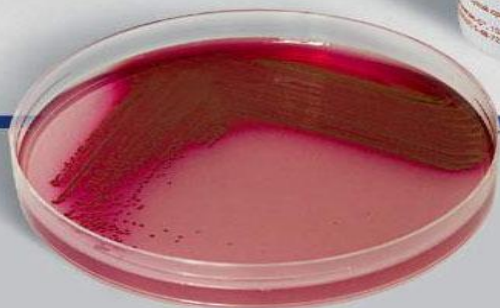


Агар Сабуро
для обнаружения
дрожжей и
плесневых грибов

Дифференциально-диагностические среды

- Позволяют дифференцировать группы или виды бактерий по ферментативной активности
- *Среды Эндо, Левина, Плоскирева* – используются для выделения чистой культуры энтеробактерий на 1 этапе; позволяют дифференцировать бактерии, способные и неспособные ферментировать лактозу
- *Среды Гисса* – используются на 3 этапе выделения чистой культуры для определения спектра сахаролитической активности.

Среда Эндо



E. coli ферментирует
лактозу



Salmonella* и *Shigella

не способны ферментировать
лактозу

- ❖ Состав: мясопептонный агар, лактоза, фуксин, сульфит натрия (Na_2SO_3),
- ❖ Принцип действия: фуксин обесцвечивается сульфитом натрия (образуется бесцветная фуксинсернистая кислота);
- ❖ Энтеробактерии, сбраживающие лактозу, в процессе брожения выделяют муравьиную кислоту, которая даёт цветную реакцию с реактивами на альдегиды, в том числе и 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).

Среда Плоскирева



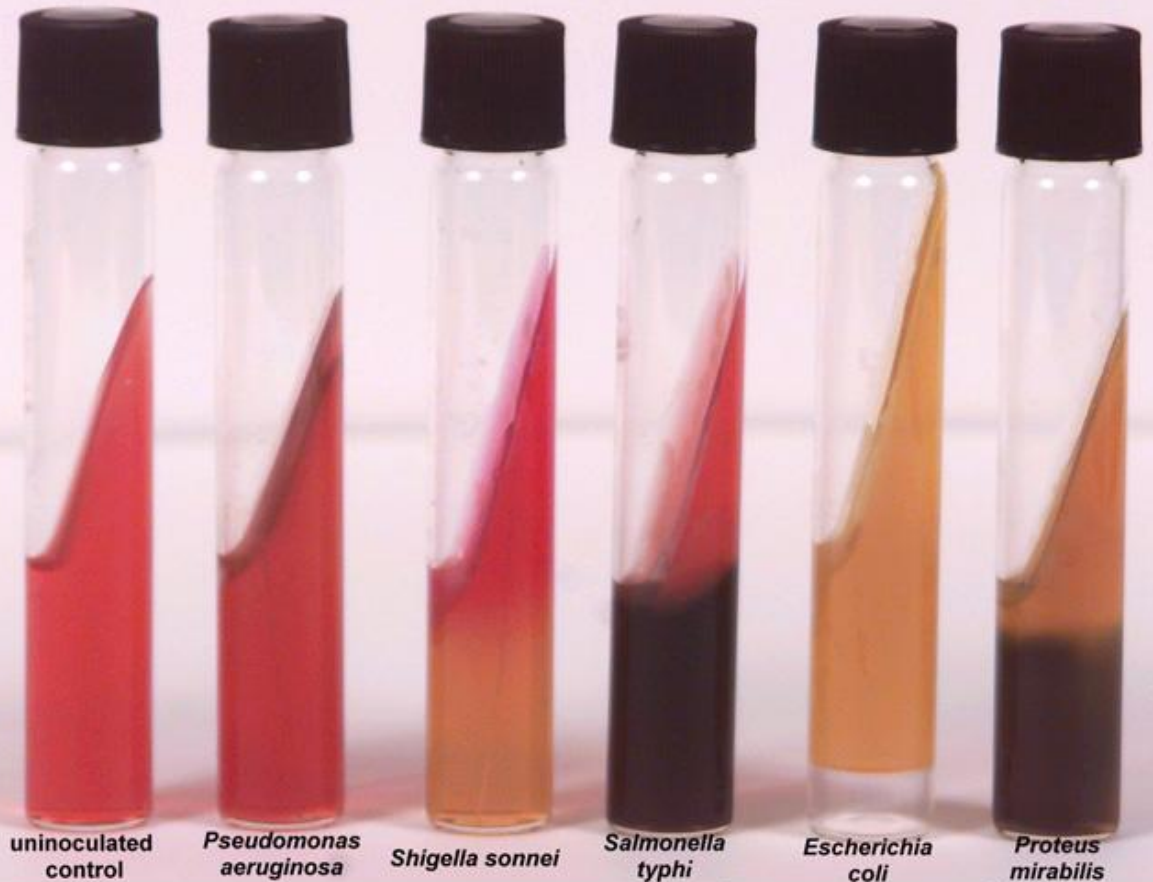
- ❖ селективная среда для выделения шигелл и сальмонелл.
- ❖ В состав среды Плоскирева входят ингибирующие вещества (желчные соли, бриллиантовый зеленый, йод), вследствие чего она должна полностью подавлять рост грамположительной флоры, значительно задерживать (первые 24 ч) рост эшерихий и другой сопутствующей микрофлоры, подавлять роение протея.
- ❖ Дифференцирующие свойства агара Плоскирева основаны на изменении pH в кислую сторону при росте лактозоферментирующих бактерий, которые образуют колонии брусничного цвета (индикатор нейтральный красный).
- ❖ Лактозоотрицательные бактерии вырастают в виде бесцветных или слабоокрашенных колоний.

Среды Гисса :

- Состав: МПА, набор углеводов, индикатор
- Принцип действия: при ферментации углевода образующиеся кислые продукты меняют pH, при этом изменяется окраска индикатора



Среда Клиггера:



ASM MicrobeLibrary.org©Chamberlain

Содержит 1% лактозу, 0.1% глюкозу, тиосульфат натрия и сульфат железа, индикатор фенол рот. Посев по поверхности и уколом в столбик агара. При ферментации только глюкозы – желтый столбик, скошенная часть не меняет окраску. При ферментации и глюкозы, и лактозы (*E.coli*) – весь агар желтый. При образовании сероводорода (*сальмонеллы, протей*) – агар чернеет

Дифференциально-диагностические среды (продолжение)



Среда Симмонса для определения способности микроорганизмов утилизировать цитраты



Окислительно-ферментативные среды для определения типа дыхания бактерий

- Выделение отдельных видов бактерий из исследуемого материала, содержащего, как правило, смесь различных микроорганизмов, является одним из этапов любого бактериологического исследования, проводимого с различными целями: диагностики заболеваний, определения микробной обсемененности окружающей среды и т.д.
- Для выделения чистой культуры применяют методы, основанные на:
 - ❖ 1) механическом разобщении бактериальных клеток (см. метод Дригальского);
 - ❖ 2) предварительной обработке исследуемого материала с помощью физических или химических факторов, оказывающих избирательное антибактериальное действие;
 - ❖ 3) избирательном подавлении размножения сопутствующей микрофлоры физическими или химическими факторами во время инкубации посевов;
 - ❖ 4) способности некоторых бактерий быстро размножаться в организме чувствительных к ним лабораторных животных (биопробы)

Определение числа бактерий

- *Общее число клеток* определяется а) путем подсчета клеток под микроскопом в окрашенном мазке б) по бактериальному стандарту (набор эталонов для определения концентрации бактериальных клеток в микробной взвеси по ее мутности; представляет собой запаянные пробирки, содержащие водную взвесь мелких частиц стекла пирекс).
- *Число живых клеток* определяется по числу колоний, образуемых жизнеспособными клетками

Способы поступления питательных веществ в клетку

1. Пассивная диффузия
2. Облегченная диффузия
3. Активный транспорт
4. Фосфотранспортная система

Пути выведения метаболитов из клетки

1. Пассивная диффузия
2. Облегченная диффузия
3. Активный транспорт
4. Фосфотранспортная система
5. Контрансляционная секреция
6. Фосфотрансферазная реакция

Классификация ферментов:

I. По механизму действия:

1. Оксидоредуктазы
2. Трансферазы
3. Гидролазы
4. Лиазы
5. Изомеразы
6. Лигазы (синтетазы)

II. По локализации:

1. Эндоферменты
2. Экзоферменты

III. По субстрату воздействия:

1. Сахаролитические
2. Протеолитические
3. Липолитические

IV. По концентрации в окружающей среде:

1. Конститутивные
2. Индуцибельные
3. Репрессибельные

Механизмы получения энергии:

1. Фотофосфорилирование
2. Субстратное фосфорилирование (брожение)
3. Окислительное фосфорилирование

$C_6H_{12}O_6$ (дыхание)

$2C_2H_5OH + 2CO_2 + 0,1 * 10^6$ Дж – спиртовое брожение

$2CH_3CHOHCOOH + 0,075 * 10^6$ Дж – молочно-кислое брожение

$C_3H_7COOH + 2CO_2 + 2H_2 + 0,063 * 10^6$ Дж – масляно-кислое брожение

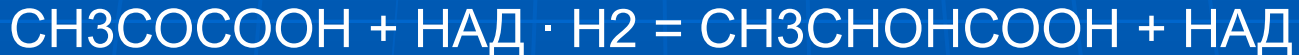
$2CH_3CH_2COOH + CH_3COOH + CO_2 + H_2O$ – пропионово-кислое брожение

АНАЭРОБНЫЕ ПРОЦЕССЫ

СПИРТОВОЕ БРОЖЕНИЕ:



МОЛОЧНО – КИСЛОЕ БРОЖЕНИЕ:



ПРОПИОНОВО – КИСЛОЕ БРОЖЕНИЕ:



МАСЛЯНО – КИСЛОЕ БРОЖЕНИЕ:



АЭРОБНЫЕ ПРОЦЕССЫ

ОКИСЛЕНИЕ ЭТИЛОВОГО СПИРТА ДО УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ:



ОКИСЛЕНИЕ УГЛЕВОДОВ ДО ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ:



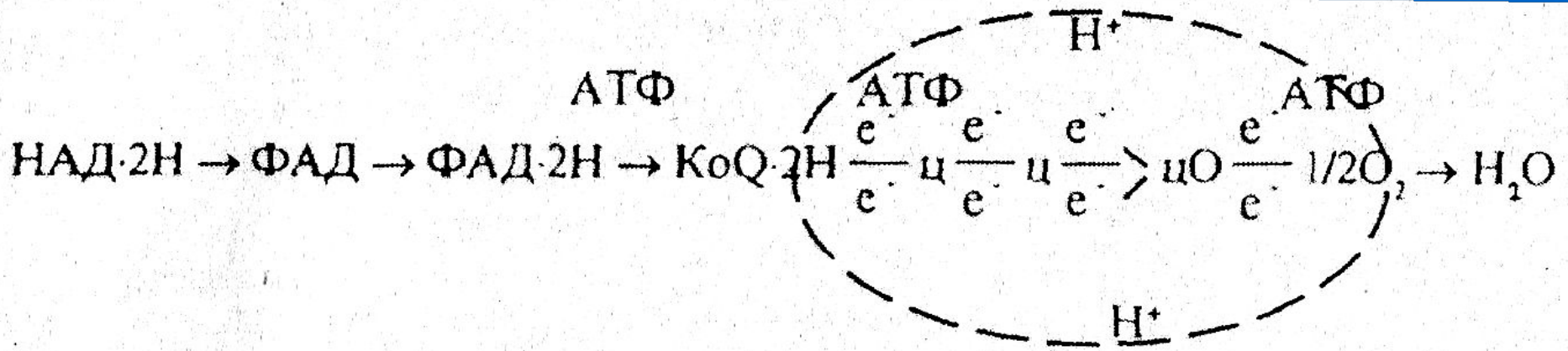


Схема дыхательной цепи

Аэробное дыхание:



Анаэробное дыхание:



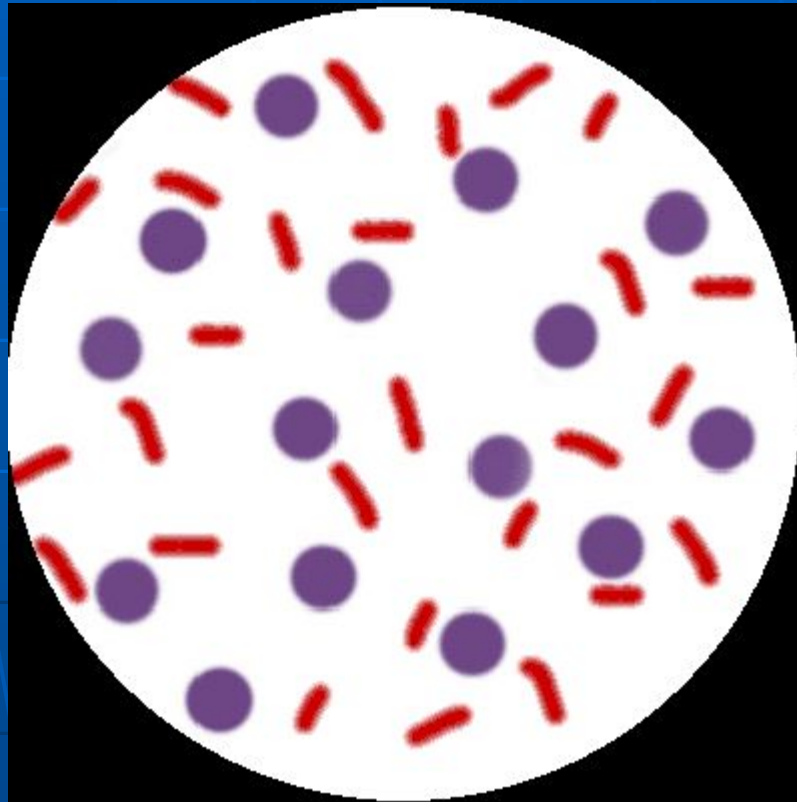
Методы окраски микроорганизмов

- Клетки микроорганизмов окрашивают главным образом анилиновыми красителями.
- Различают кислые и основные красители. К кислым красителям относятся эозин, кислый фуксин, эритрозин и др. Эти красители интенсивно связываются с цитоплазматическими компонентами клетки.
- Основные красители - метиленовый синий, основной фуксин, генциановый фиолетовый, кристаллический фиолетовый, сафранин - интенсивнее связываются с ядерными компонентами клетки.
- В микробиологической практике применяются почти исключительно основные красители.
- Различают простые и сложные (дифференциальные) способы окраски микроорганизмов.

Простые методы окраски

- Простая окраска позволяет быстро изучить морфологические особенности микроорганизмов.
- Для простой окраски используют только один краситель, чаще всего красного цвета - фуксин, фиолетового - генцианвиолет (окраска производится в течение 1-2 мин) или синего - метиленовый синий (окраска производится в течение 3-5 мин).
- Чтобы приготовить мазок, на середину чистого предметного стекла наносят небольшую каплю воды, с помощью бактериальной петли помещают в нее исследуемый материал и равномерно распределяют его на стекле до образования тонкого мазка.
- Препарат высушивают и фиксируют над пламенем горелки. После окраски промывают водой и высушивают, после чего его можно микроскопировать.

Метод окраски по Граму

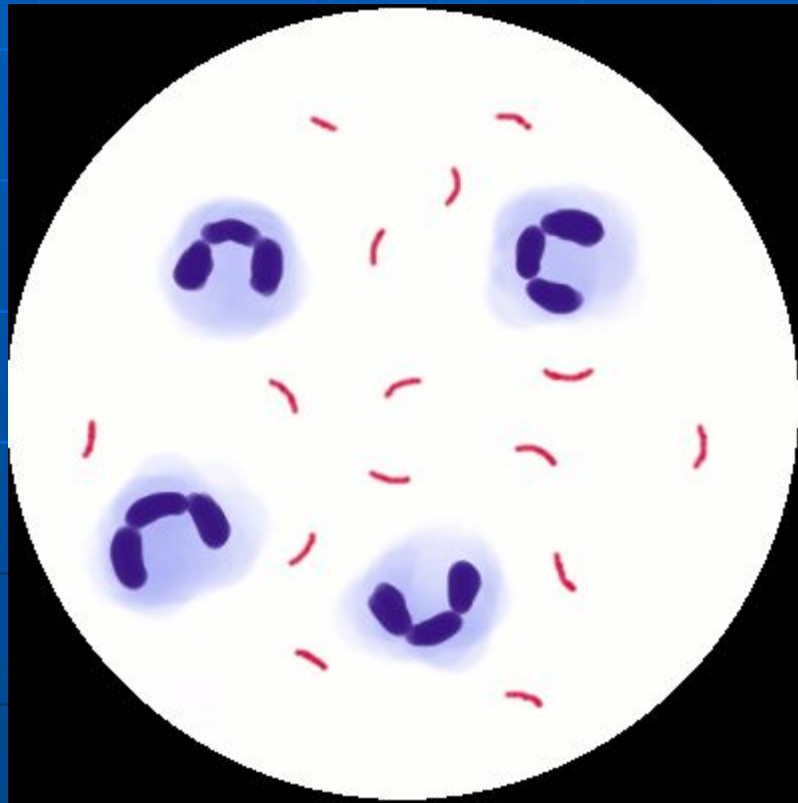


Метод окраски по Граму

1. Фиксированный мазок окрашивают карболовым раствором генцианового фиолетового в течение 1-2 минут.
2. В течение 1 минуты обрабатывают мазок раствором Люголя.
3. Обесцвечивают спиртом 10-20 сек.
4. Промывают водой.
5. Докрашивают мазок водным раствором фуксина 1-2 минуты.

Метод окраски по Граму является важным диагностическим методом. Все бактерии по отношению к окраске по Граму делятся на грамположительные - темно-фиолетового цвета и грамотрицательные - красного. Способность окрашиваться в тот или иной цвет зависит от строения их клеточной стенки и коррелирует со многими другими свойствами бактерий. у грамположительных бактерий имеется магниевая соль рибонуклеиновой кислоты, отсутствующая у грамотрицательных. Она и образует прочный химический комплекс с белком, генцианвиолетом и йодом, который не разрушается при кратковременном действии спирта.

Метод окраски по Цилю-Нильсену



Метод окраски по Цилю-Нильсену

Метод Циля-Нильсена предназначен для дифференциации кислотоустойчивых бактерий (возбудителей туберкулеза и лепры) от некислотоустойчивых.

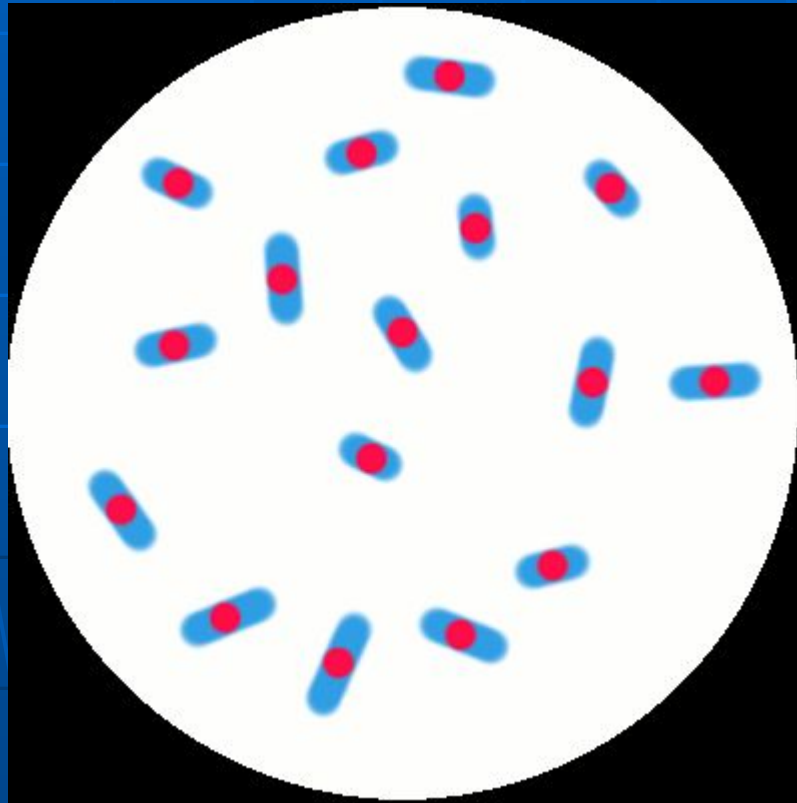
1. Мазок окрашивают карболовым фуксином Циля (основной краситель) при нагревании 3-5 мин.
2. Обесцвечивают раствором серной кислоты (дифференцирующее вещество) в течение 1-2 мин.
3. Промывают водой.
4. Докрашивают 3-5 мин метиленовым синим (дополнительный краситель).

Клеточная стенка кислотоустойчивых бактерий отличается высоким содержанием липидов. Они с трудом окрашиваются, но затем удерживают основной краситель при обесцвечивании кислотой.

Некислотоустойчивые бактерии легко окрашиваются, а затем легко обесцвечиваются кислотой и окрашиваются дополнительным красителем.

Кислотоустойчивые микроорганизмы окрашиваются в рубиново-красный цвет, некислотоустойчивые - в сине-голубой.

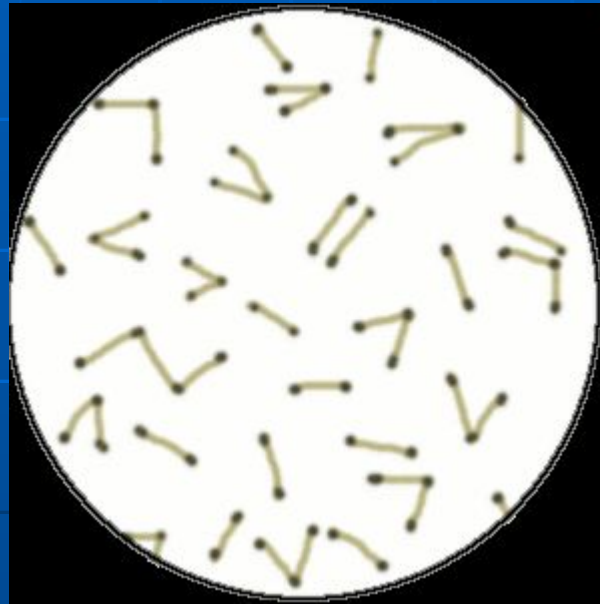
Метод окраски по Ожешко



Метод окраски по Ожешко

Метод Ожешко сходен с методом Циля-Нильсена, но отличается использованием раствора соляной кислоты в качестве протравы, разрыхляющей оболочку споры, которая плохо воспринимает красители. После протравы соляной кислотой при нагревании в течение 2-3 мин мазок фиксируется и окрашивается по методу Циля-Нильсена. При этом цитоплазма клетки окрашивается в синий цвет, а споры в красный.

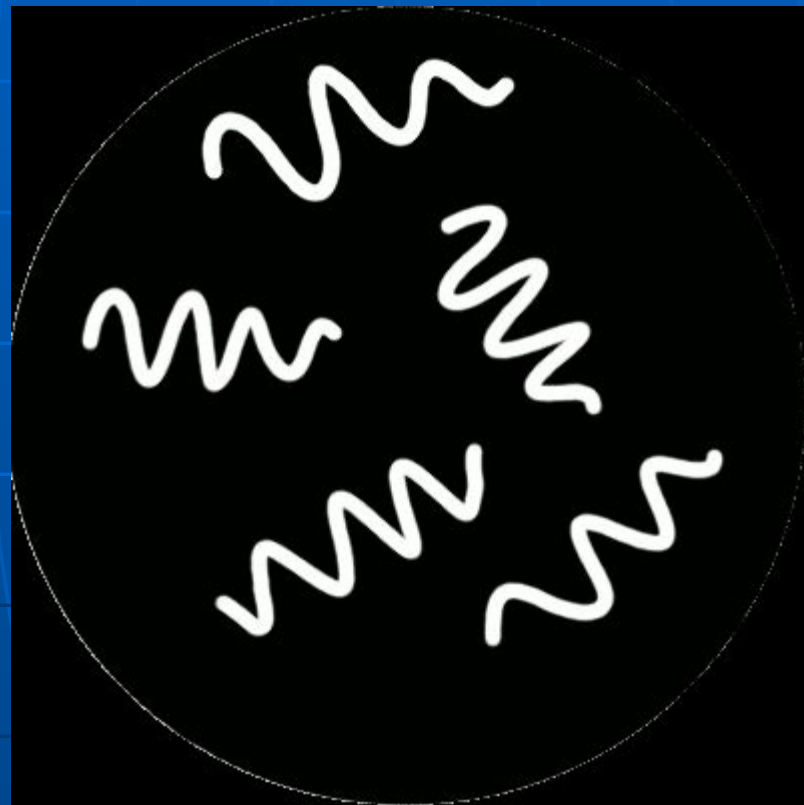
Метод окраски по Нейссеру



Метод окраски по Нейссеру

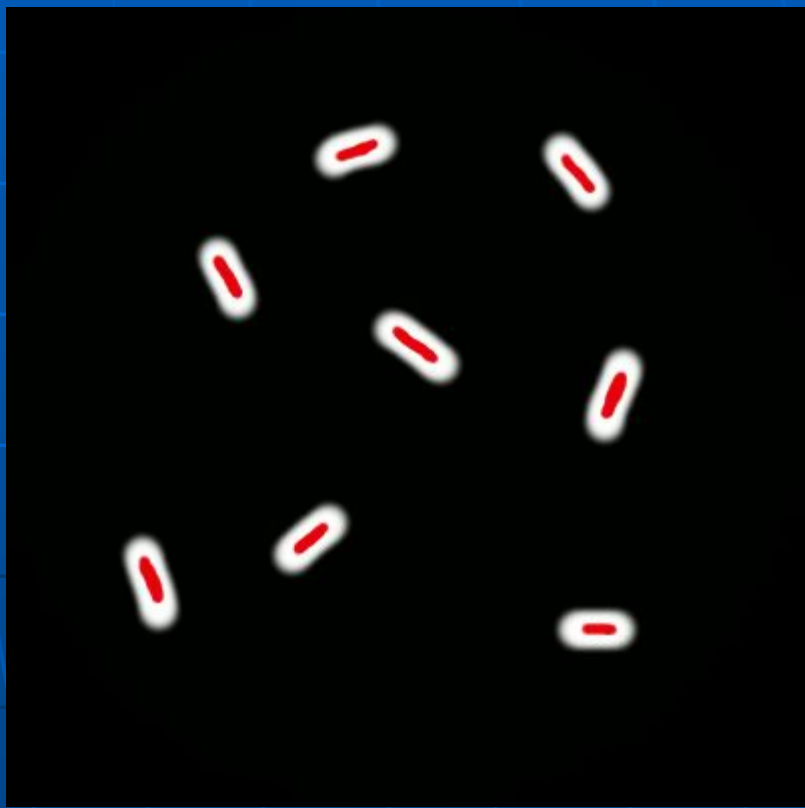
Метод Нейссера используется для выявления зерен волютина. Мазок окрашивается уксуснокислым метиленовым синим 2-3 минуты, при этом происходит химическое взаимодействие красителя и волютина. Зерна волютина окрашиваются в черный цвет. При промывке водой тело клетки обесцвечивается и затем в течение 1 мин докрашивается везувином в желто-коричневый цвет.

Метод окраски по Бурри



Метод окраски по Бурри

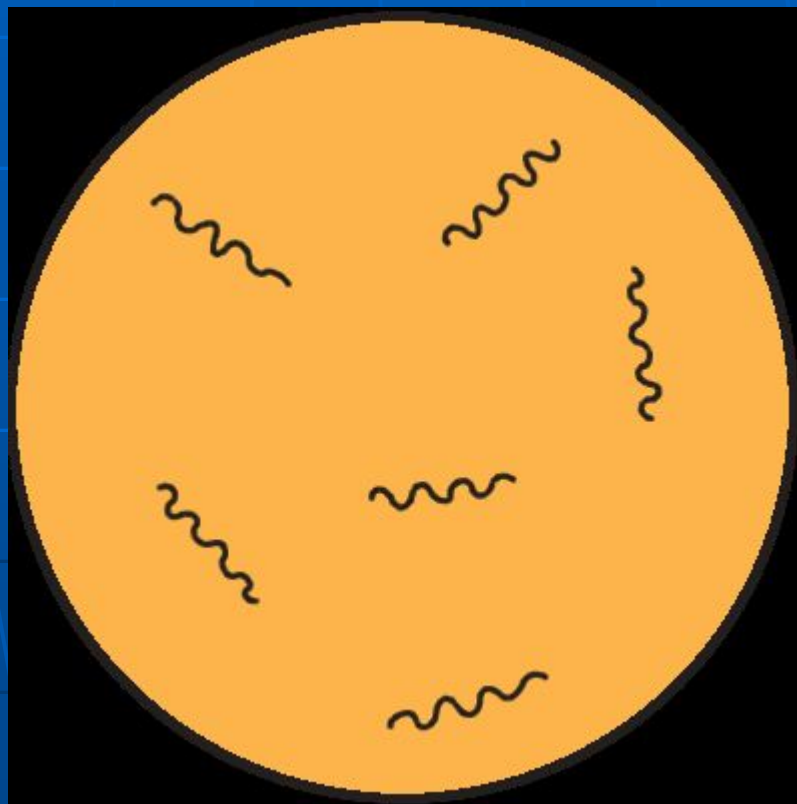
Метод Бурри является негативным методом окраски: окрашивается фон, и не окрашиваются сами микроорганизмы. Для этого используют красители, не окрашивающие бактерии, например тушь. Готовят тушевой препарат: каплю материала смешивают с каплей туши, готовят мазок (как мазок крови) и высушивают. В результате на темном фоне видны неокрашенные микроорганизмы.



Метод окраски по Бурри-Гинсу

Метод Бурри-Гинса используется для окраски капсульных бактерий и основан на том, что капсула не воспринимает красители. Капсулу выявляют негативным контрастированием фона по Бури. Для этого черную тушь смешивают в культурой и высушивают. После этого проводят фиксацию в пламени горелки, окрашивают тела микробных клеток по Гинсу - водным фуксином в течение 1 минуты и промывают водой 5-10 секунд. В результате на темном фоне хорошо видна бесцветная капсула и красные тела микробов.

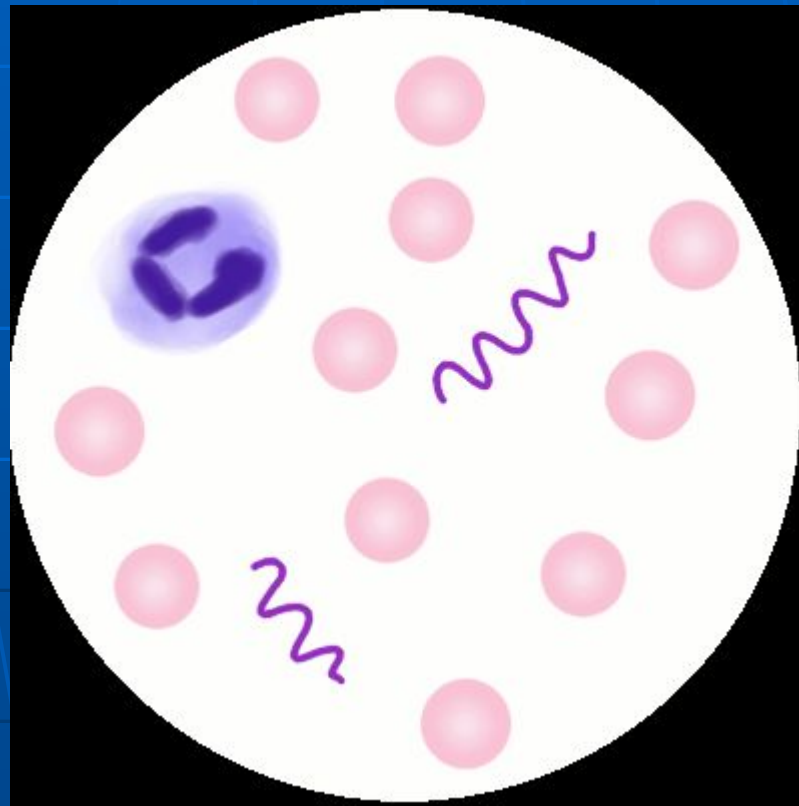
Метод окраски по Морозову



Метод окраски по Морозову

Метод Морозова предназначен для обнаружения путём импрегнации серебром вирусов, а также выявления микроструктуры бактерий (в том числе риккетсий, спирохет), жгутиков, аргирофильных и аргентофильных включений и гранул. Принцип метода состоит в том, что при обработке аммиачным раствором серебра эта соль восстанавливается в исследуемом объекте и специфические ингредиенты объекта избирательно окрашиваются в коричневато-чёрный цвет. При этом капсиды вирионов не окрашиваются и наблюдаются в виде светлого ободка, фон препарата - бесцветный или желтоватый.

Метод окраски по Романовскому-Гимзе



Метод окраски по Романовскому-Гимзе

Универсальным методом окраски микроорганизмов является окраска по Романовскому-Гимзе (смесью азура, эозина и метиленового синего). При окрашивании простейших их цитоплазма приобретает голубой цвет, а ядра - красно-фиолетовый. Этот метод используют также при исследовании риккетсий, хламидий, спирохет, форменных элементов крови.

До следующей среды

