

Тема: Питание микроорганизмов.

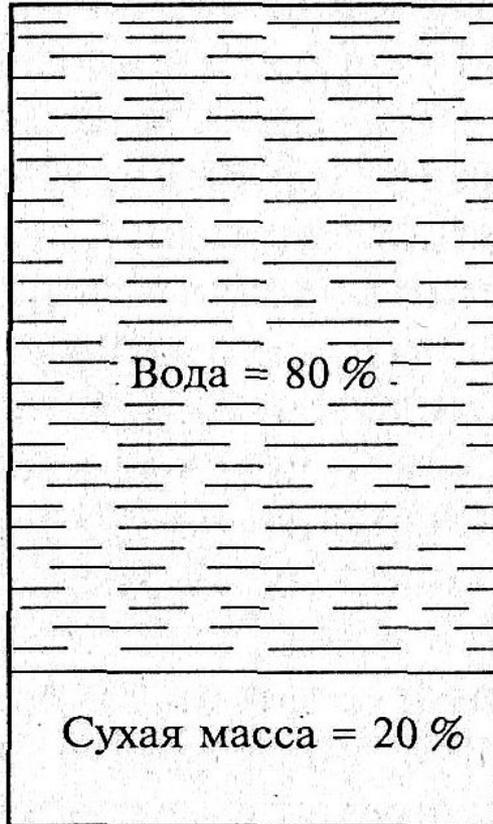
Методы выделения чистых культур микроорганизмов.

Методы определения количества бактерий.

Методы стерилизации и дезинфекции.

# Химический состав бактериальной клетки

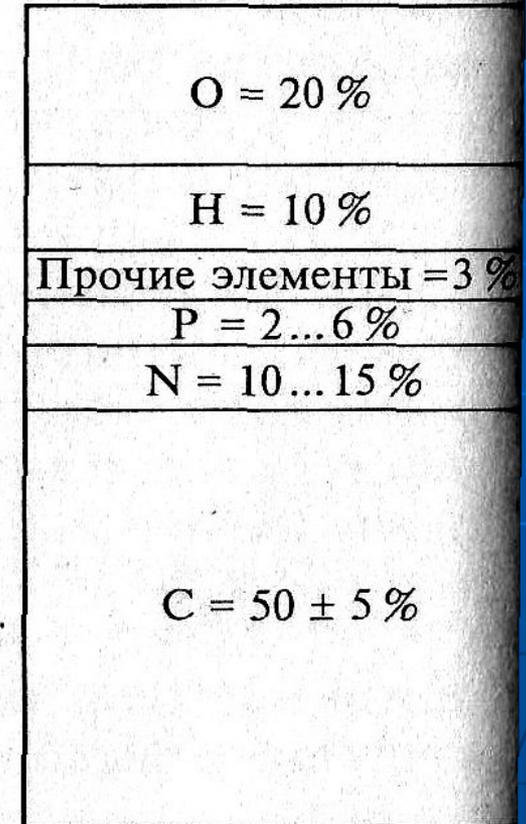
## Сухое вещество



## 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)

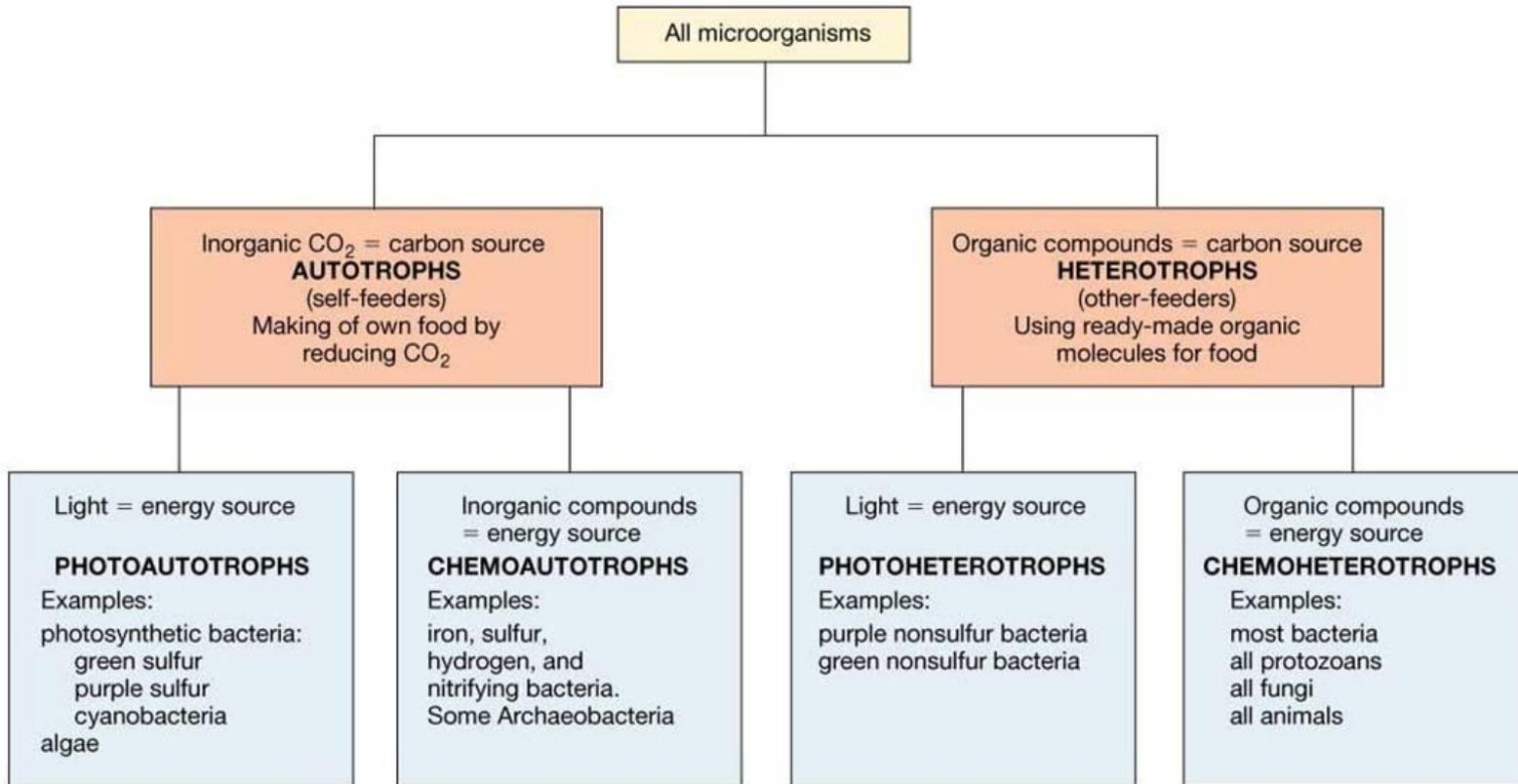
1. Аминокислоты

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 <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> S, NH <sub>3</sub> , Fe <sup>2+</sup> и др.)	молекулярный кислород	CO <sub>2</sub>	хемолитоаэроавтотрофия	нитрифицирующие, тионовые, водородные бактерии	
			органические соединения	хемолитоаэрогетеротрофия	некоторые водородные и железобактерии	
		CO <sub>2</sub> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	CO <sub>2</sub>	хемолитоанаэроавтотрофия	метанобразующие бактерии	
			органические соединения	хемолитоанаэрогетеротрофия	сульфатовосстанавливающие бактерии	
	органические соединения	молекулярный кислород	CO <sub>2</sub>	хемоорганонаэроавтотрофия	окисление муравьиной кислоты бактериями	
			органические соединения	хемоорганонаэрогетеротрофия	большинство бактерий*	
		органические соединения	CO <sub>2</sub>	хемоорганонаэроавтотрофия	метанобразующие бактерии	
			органические соединения	хемоорганонаэрогетеротрофия	молочнокислые, маслянокислые и другие бактерии, осуществляющие брожение	
	Свет	неорганические соединения (H <sub>2</sub> O, H <sub>2</sub> S, S и др.)	—	CO <sub>2</sub>	фотолитоавтотрофия	цианобактерии, большинство пурпурных и зеленых серобактерий, некоторые несерные пурпурные бактерии**
				органические соединения	фотолитогетеротрофия	некоторые цианобактерии, большинство пурпурных и зеленых серобактерий
органические соединения		—	CO <sub>2</sub>	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

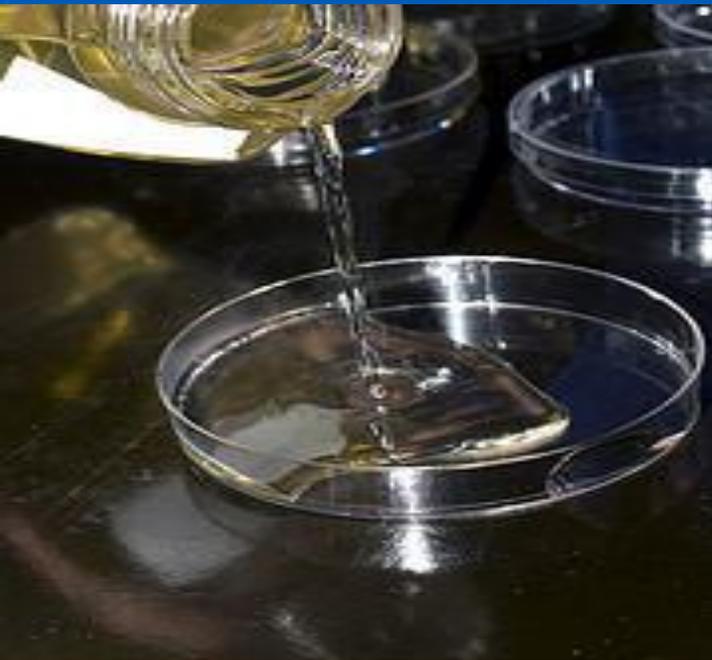
**Классификация микроорганизмов**  
**в зависимости от конечного**  
**акцептора электронов**

- 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)

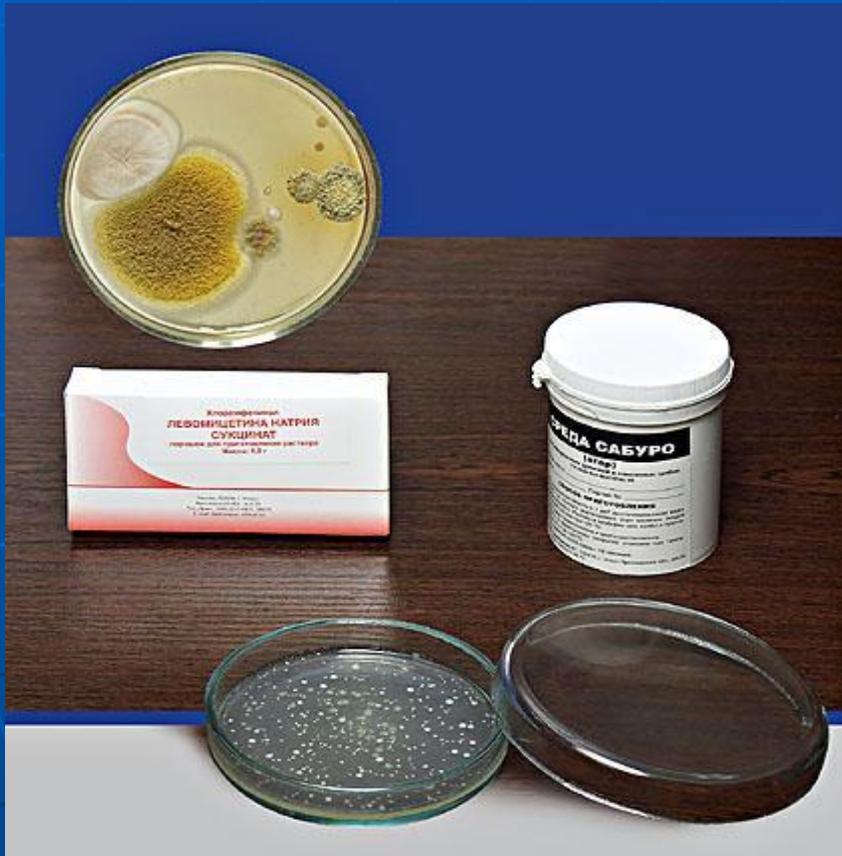


- *Щелочной агар* для холерного вибриона



- *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 ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ),
- ❖ 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



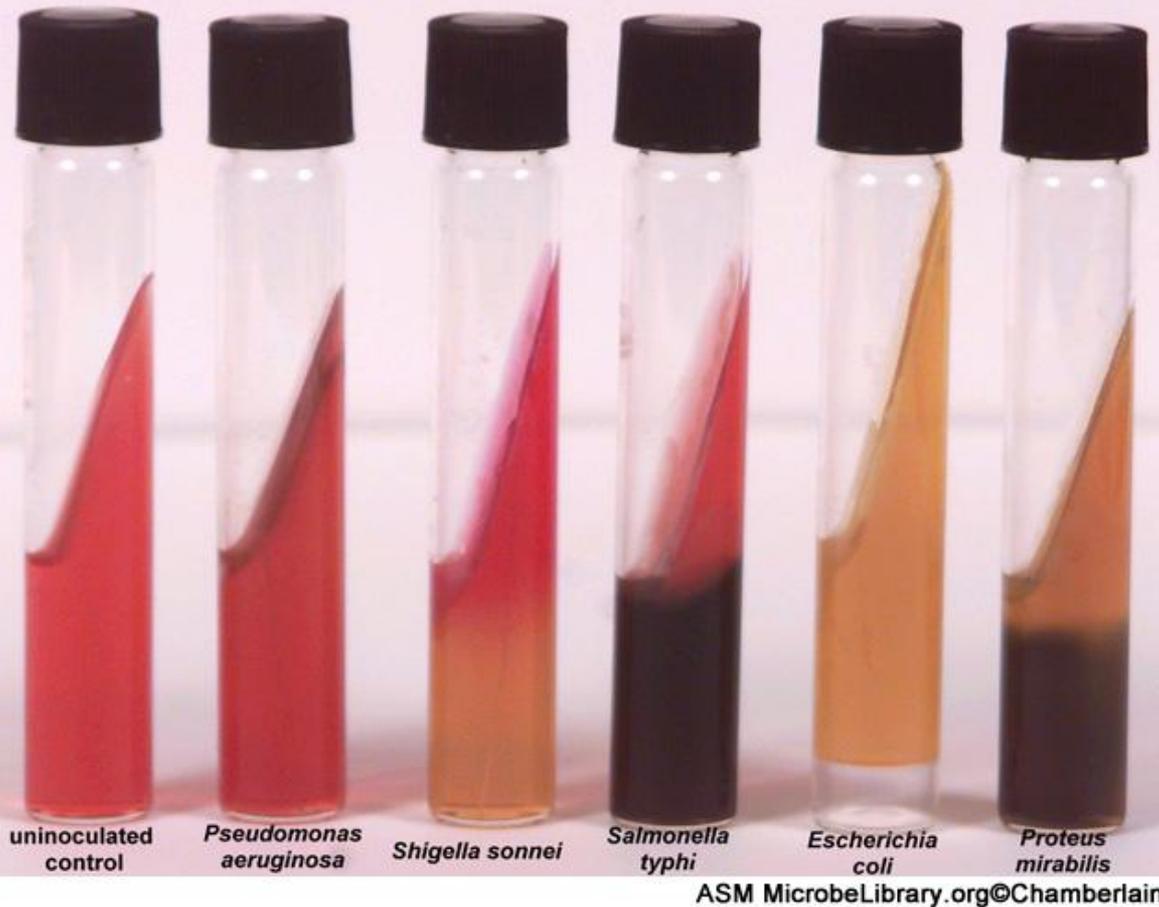
- ❖ селективная среда для выделения шигелл и сальмонелл.
- ❖ В состав среды Плоскирева входят ингибирующие вещества (желчные соли, бриллиантовый зеленый, йод), вследствие чего она должна полностью подавлять рост грамположительной флоры, значительно задерживать (первые 24 ч) рост эшерихий и другой сопутствующей микрофлоры, подавлять роение протей.
- ❖ 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 рН, при этом изменяется окраска индикатора

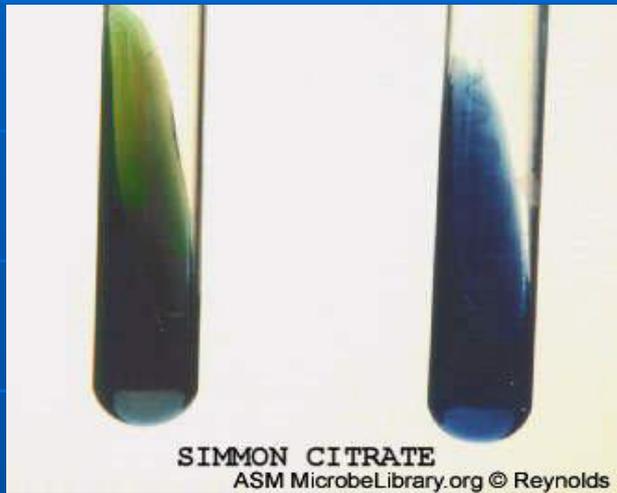


## Среда Клиггера:

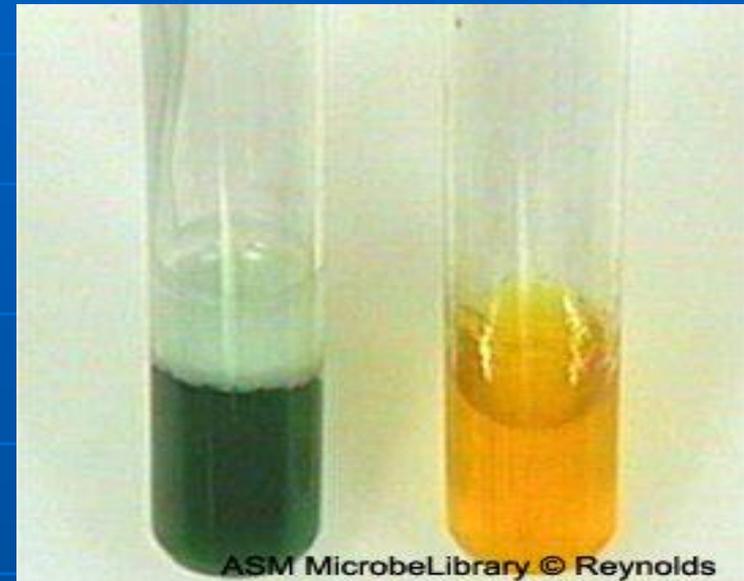


Содержит 1% лактозу, 0.1% глюкозу, тиосульфат натрия и сульфат железа, индикатор фенол рот. Посев по поверхности и уколом в столбик агара. При ферментации только глюкозы – желтый столбик, скошенная часть не меняет окраску. При ферментации и глюкозы, и лактозы (*E.coli*) – весь агар желтый. При образовании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

## 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:



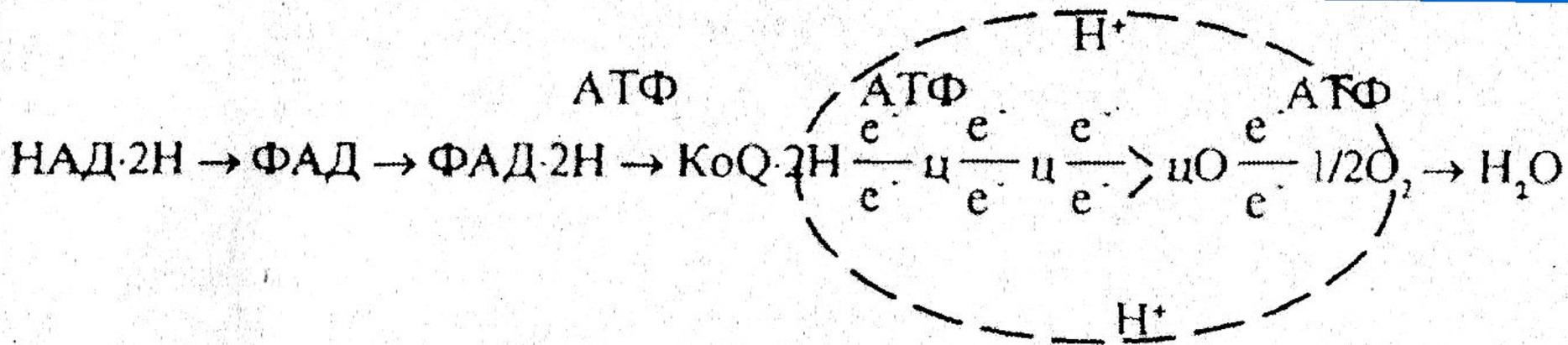


Схема дыхательной цепи

Аэробное дыхание:



Анаэробное дыхание:



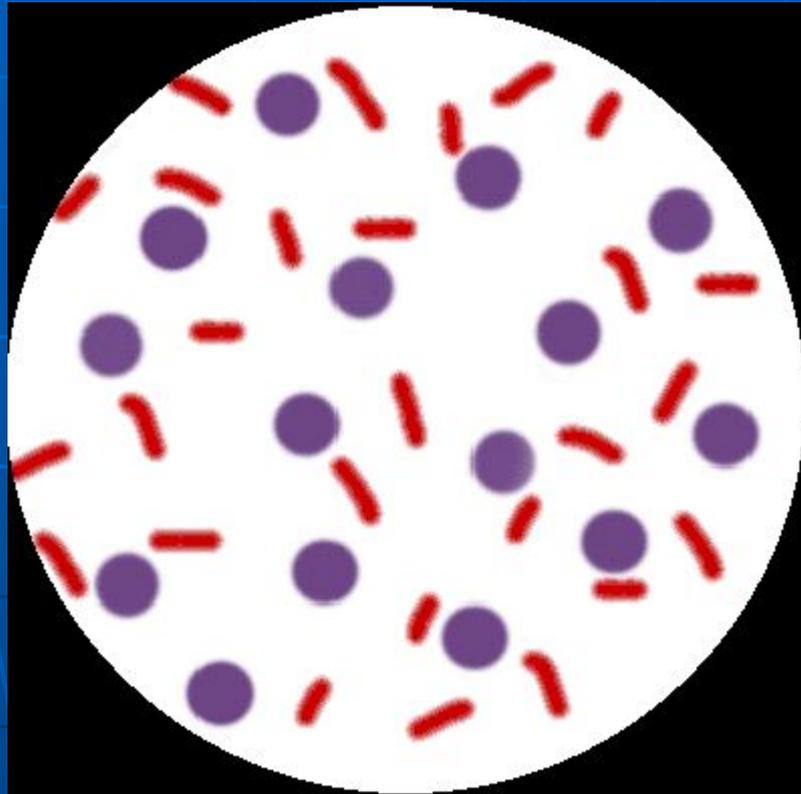
# Методы окраски микроорганизмов

- 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

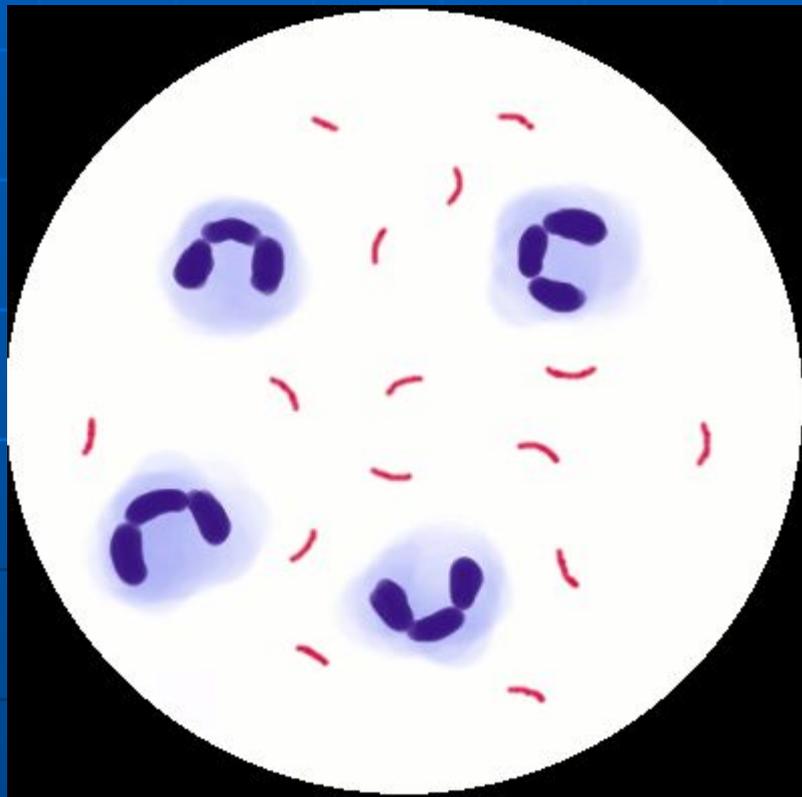


# Метод окраски по Граму

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.

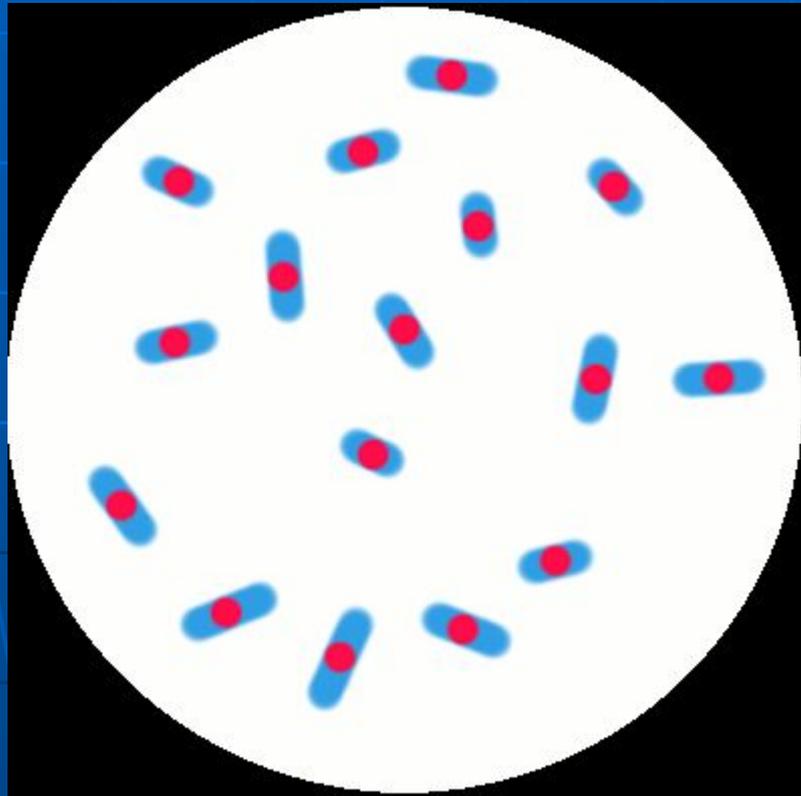
1. Мазок окрашивают карболовым фуксином Циля (основной краситель) при нагревании 3-5 мин.
2. Обесцвечивают раствором серной кислоты (дифференцирующее вещество) в течение 1-2 мин.
3. Промывают водой.
4. Докрашивают 3-5 мин метиленовым синим (дополнительный краситель).

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.

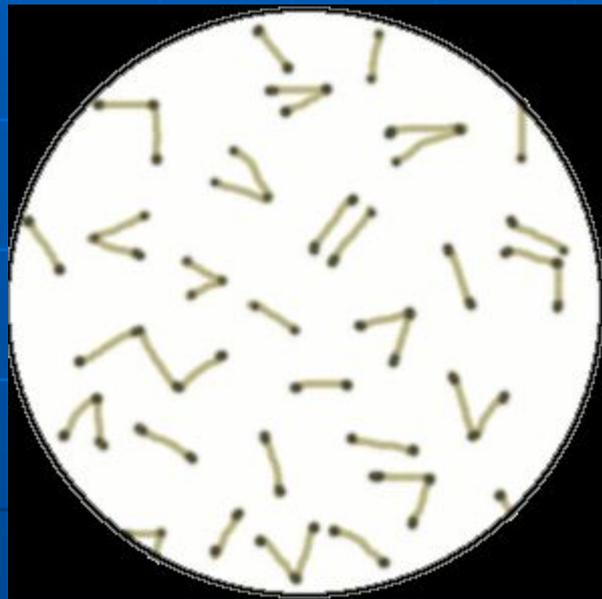
# Метод окраски по Ожешко



# 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.

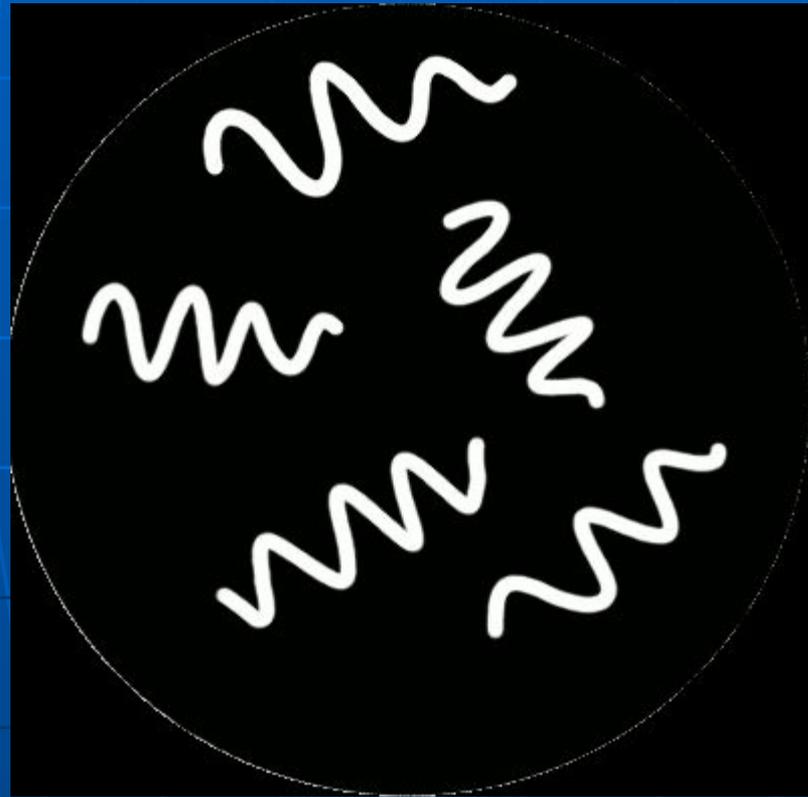
# Метод окраски по Нейссеру



# Метод окраски по Нейссеру

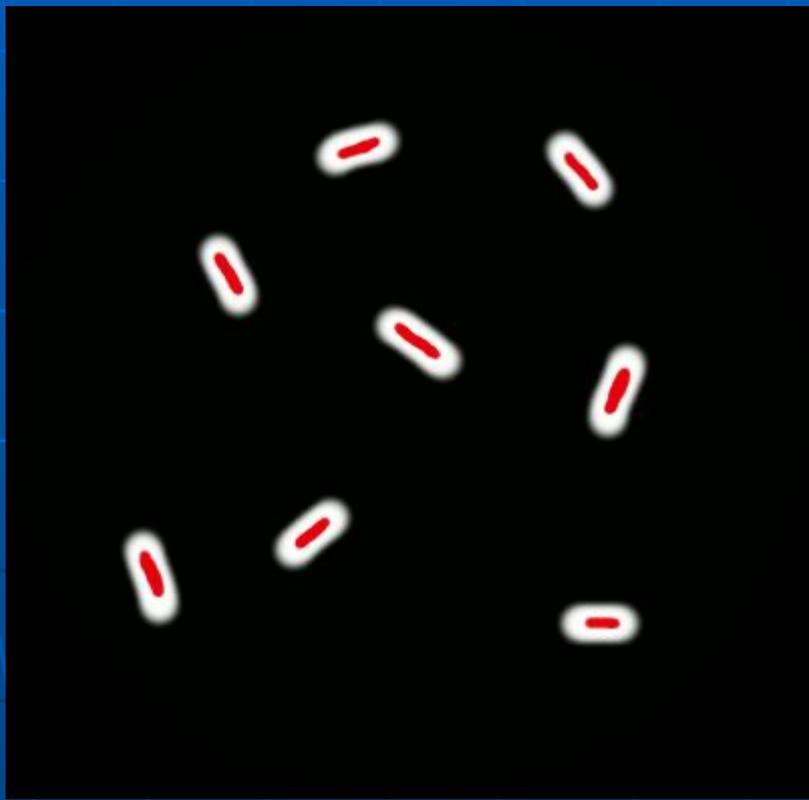
Метод Нейссера используется для выявления зерен волютина. Мазок окрашивается уксуснокислым метиленовым синим 2-3 минуты, при этом происходит химическое взаимодействие красителя и волютина. Зерна волютина окрашиваются в черный цвет. При промывке водой тело клетки обесцвечивается и затем в течение 1 мин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

# Метод окраски по Бурри



# Метод окраски по Бурри

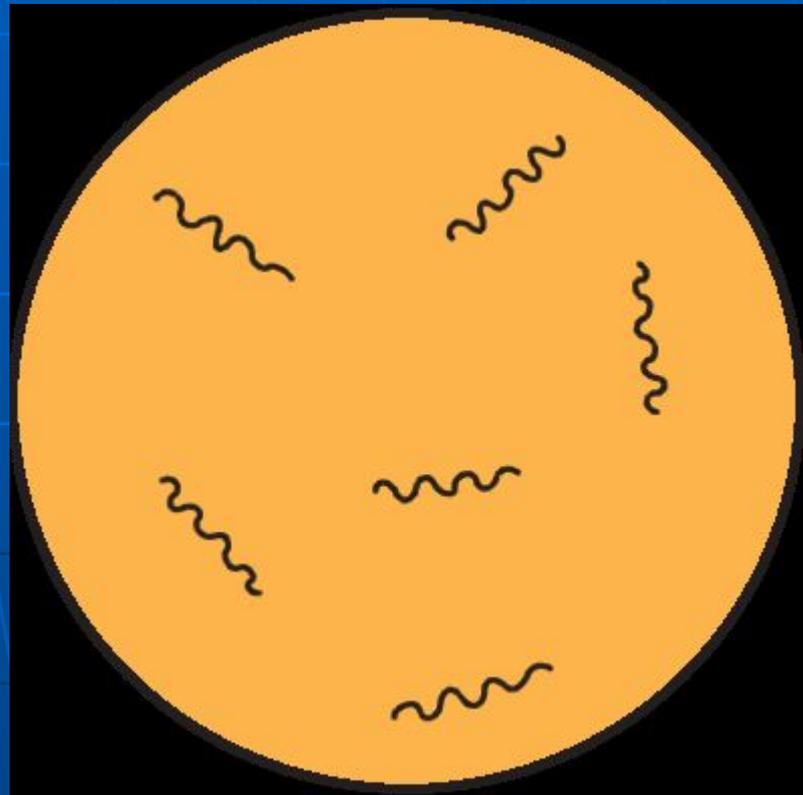
Метод Бурри является негативным методом окраски: окрашивается фон, и не окрашиваются сами микроорганизмы. Для этого используют красители, не окрашивающие бактерии, например тушь. Готовят тушевой препарат: каплю материала смешивают с каплей туши, готовят мазок (как мазок крови) и высушивают. В результате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

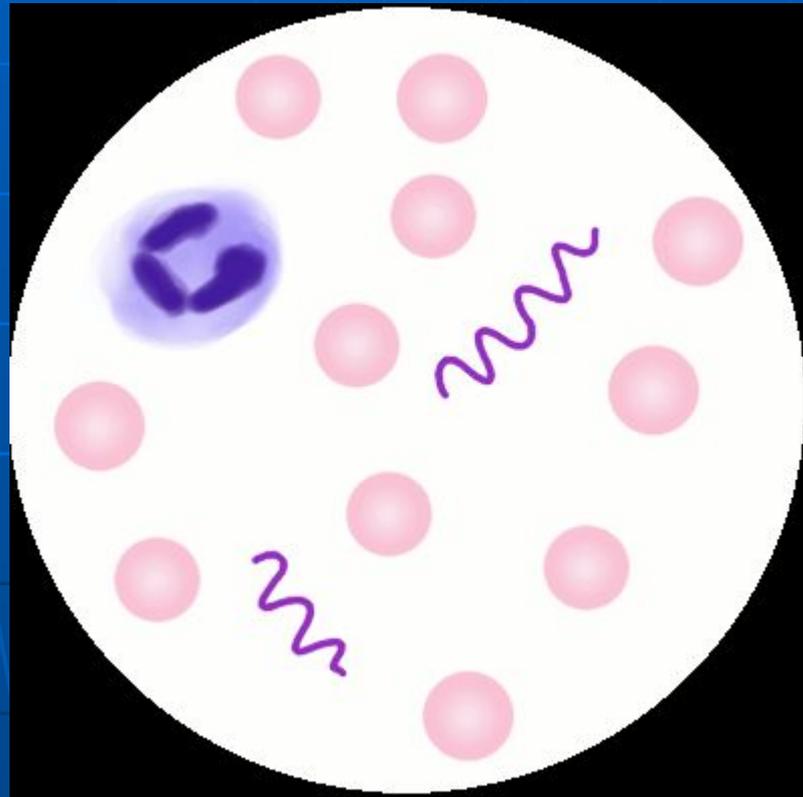
# Метод окраски по Морозову



# 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

