

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В МИКРОБИОЛОГИИ.

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ.

Световой микроскоп



Фронтальная линза объектива



Рис. 1.5. Микроскопия без иммерсионной жидкости

Фронтальная линза объектива

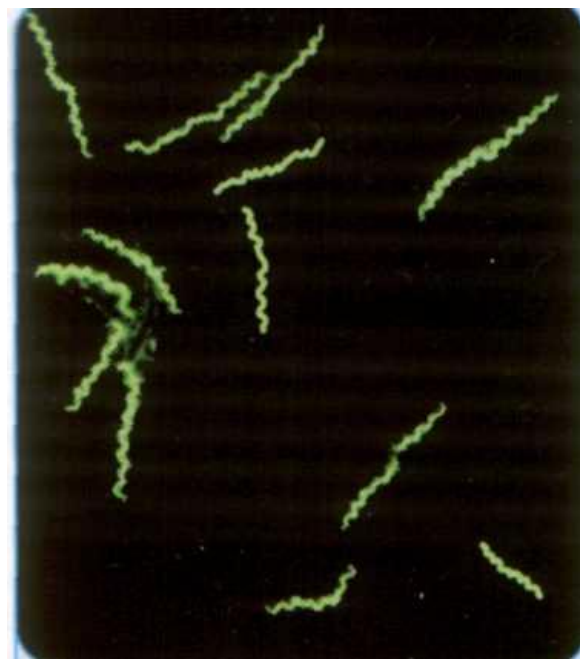
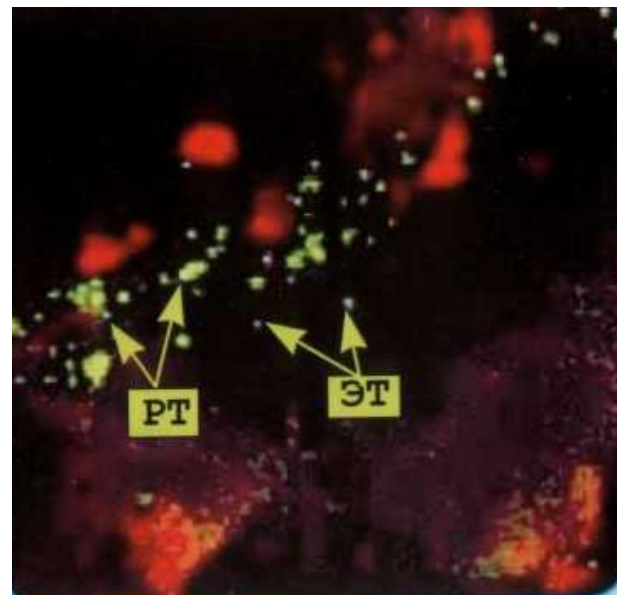


Рис. 1.6. Микроскопия с иммерсионной жидкостью

ТЕМНОПОЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ



Люминесцентный микроскоп



Электронный

микроскоп

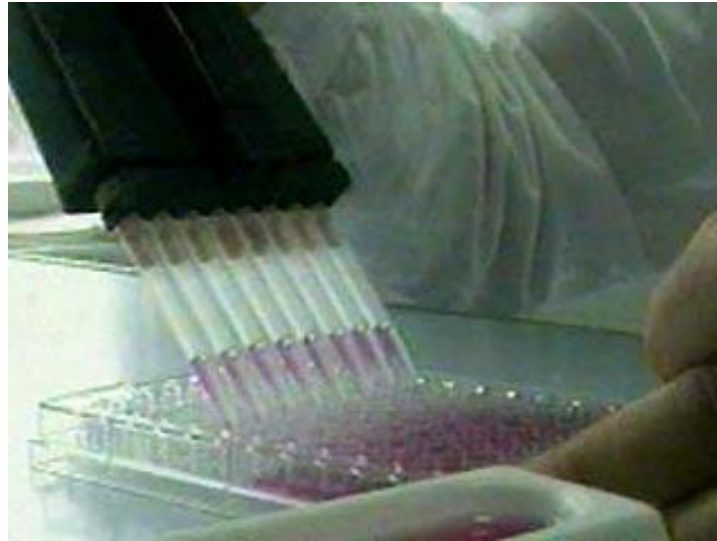
photo.mnc.ru



ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ (СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ):

1. СЕРОИДЕНТИФИКАЦИЯ

2. СЕРОДИАГНОСТИКА



БИОЛОГИЧЕСКИЙ

МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧЕСКИЙ

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ:

**БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ
ИЛИ**

**ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЙ
ИЛИ**

МИКОЛОГИЧЕСКИЙ

Микробиологическое исследование при чуме

Содержимое бубонов, кровь, мокрота, отделяемое язвы, испражнения, мат-ал вскрытия и др.

Бактериоскопическое
иссл-ие



Бактериологическое
иссл-ие

Посевы на бульон Мартена, Хоттингера МПА, среду Туманского (сод-ит генциан фиолетовый, подавляющий рост сопутст-вующей МФ). Посевы инкубируют при 28°C. Для ускорения роста применяют стимуляторы (экстракты некоторых бактерий, например сарции, свежегемолизированную кровь, сульфат Na и др.)



Серологическое
иссл-ие
(для обнаружения АГ)

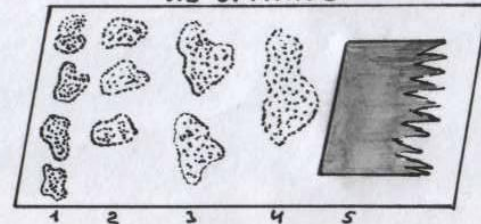
РПГА РТПГА

Биопроба

Заражение морской свинки

Вскрытие животного

Мазки-отпечатки из органов



1. лимфатические узлы
2. лёгкое
3. селезенка
4. печень
5. мазок крови

МАЗОК, ОКР-КА метиленовым синим (лимфатические узлы)

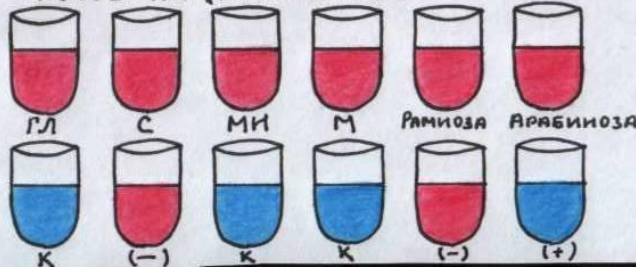


Посев на скошенный АГАР (выделение чистой культуры)



Биопроба

Посев на пестрый ряд



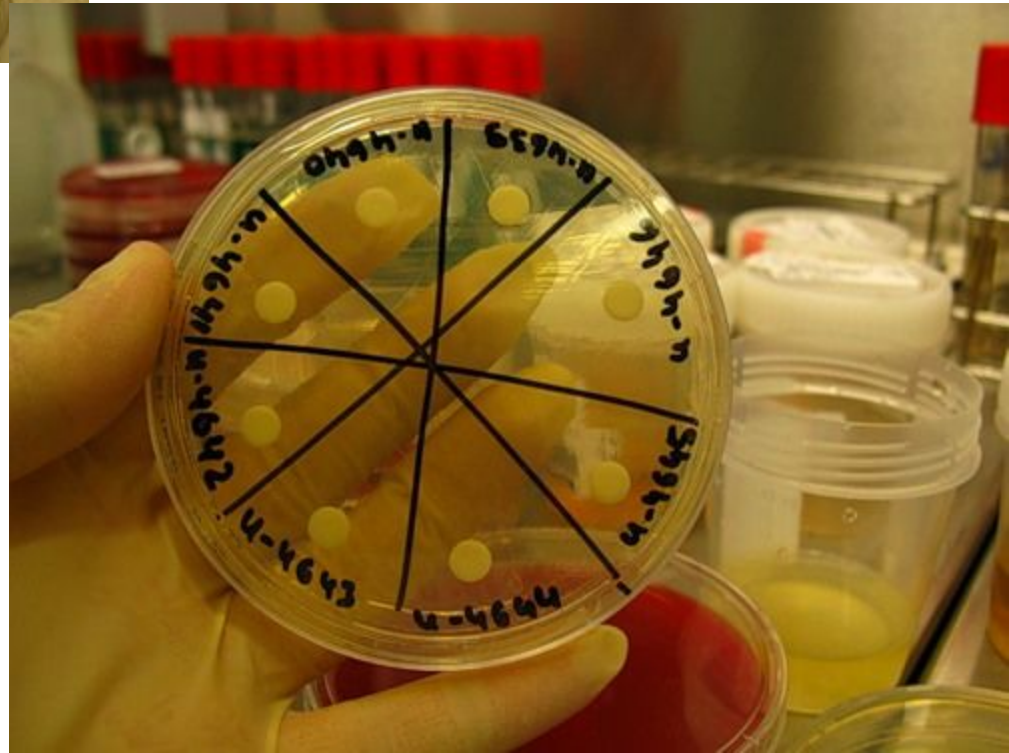
Определение чувствительности к Б/ф

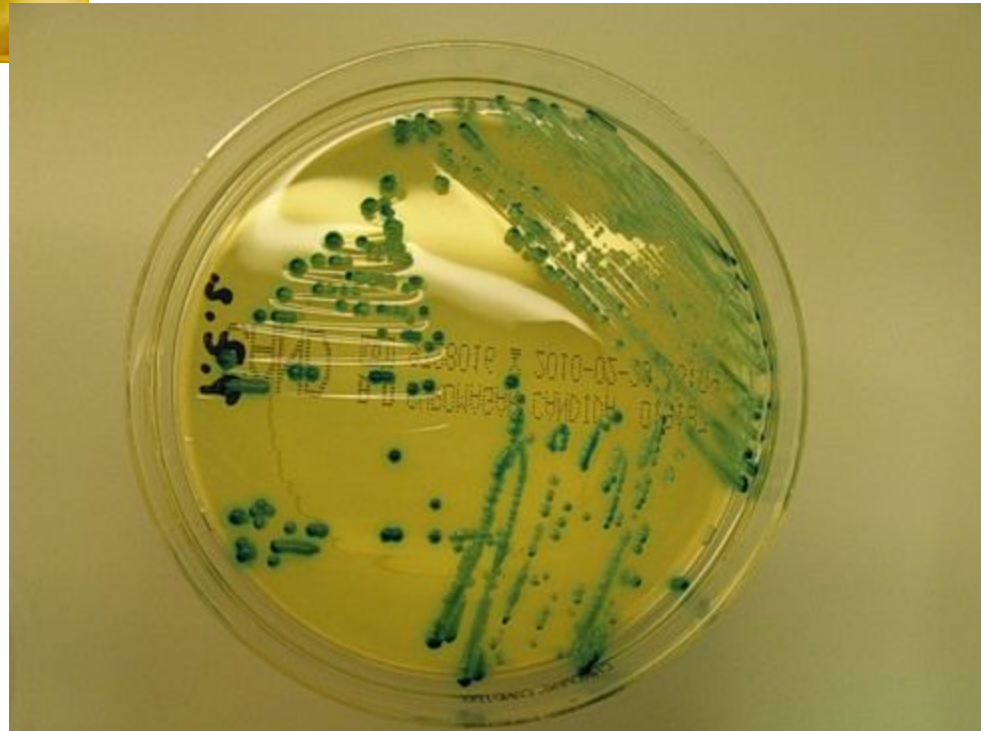
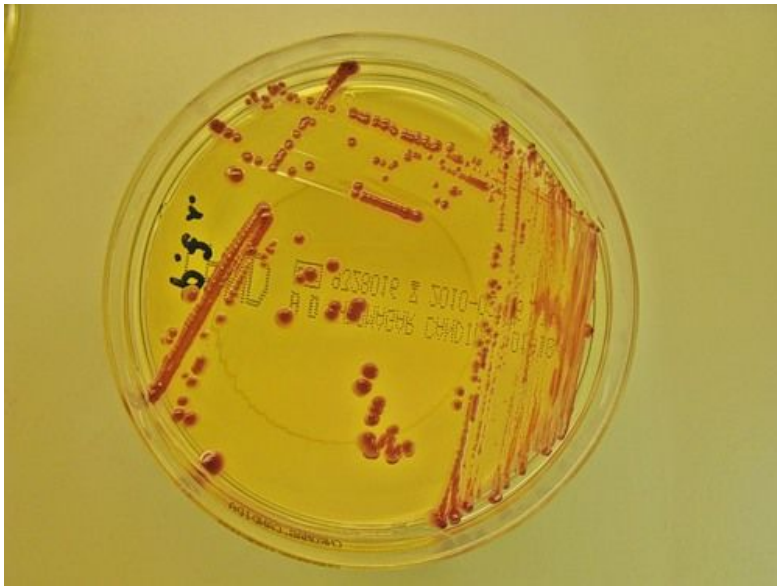
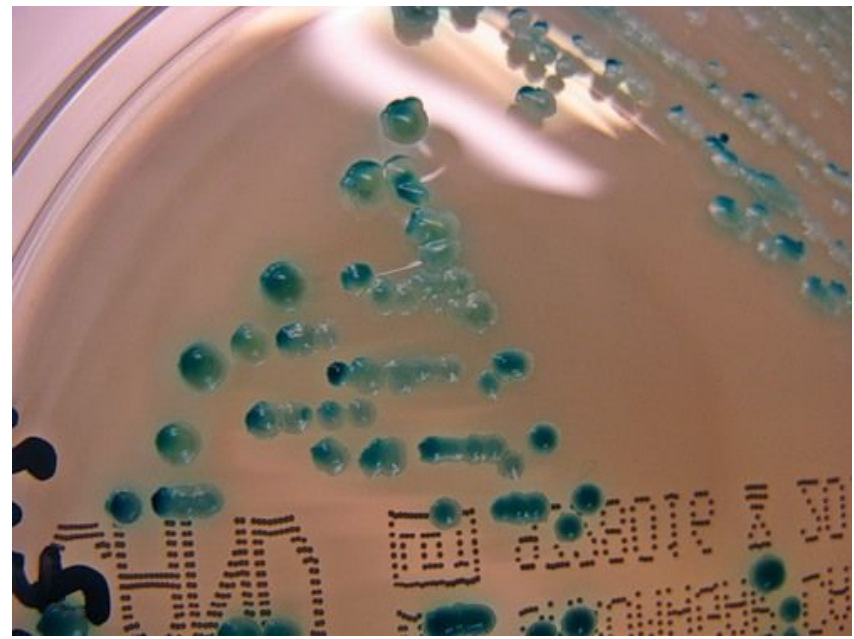
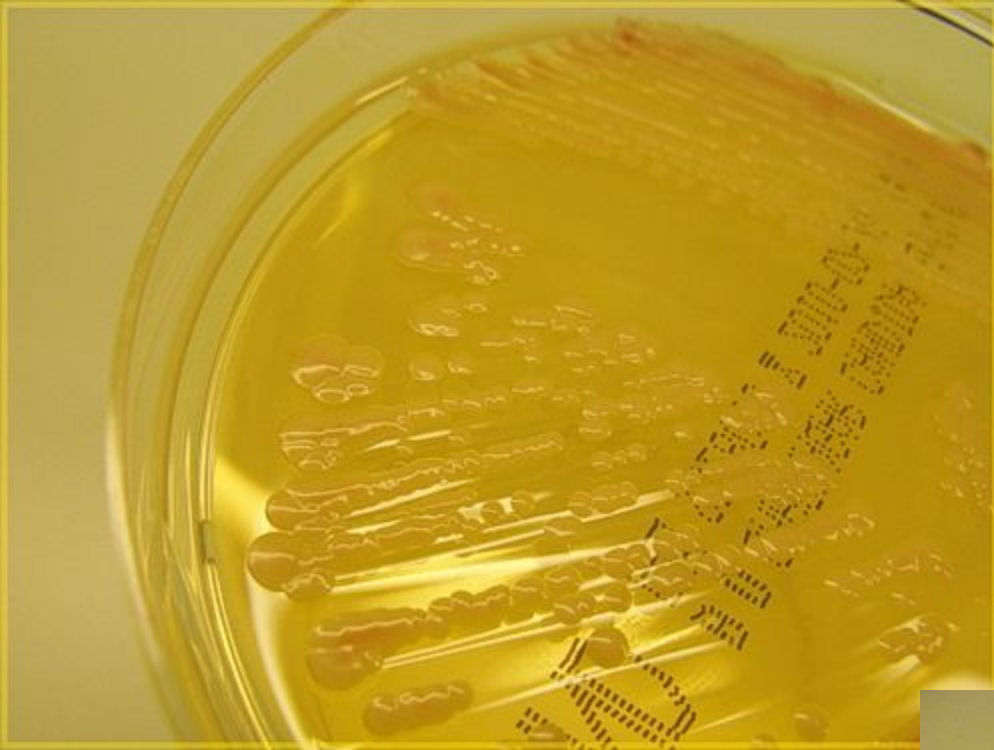


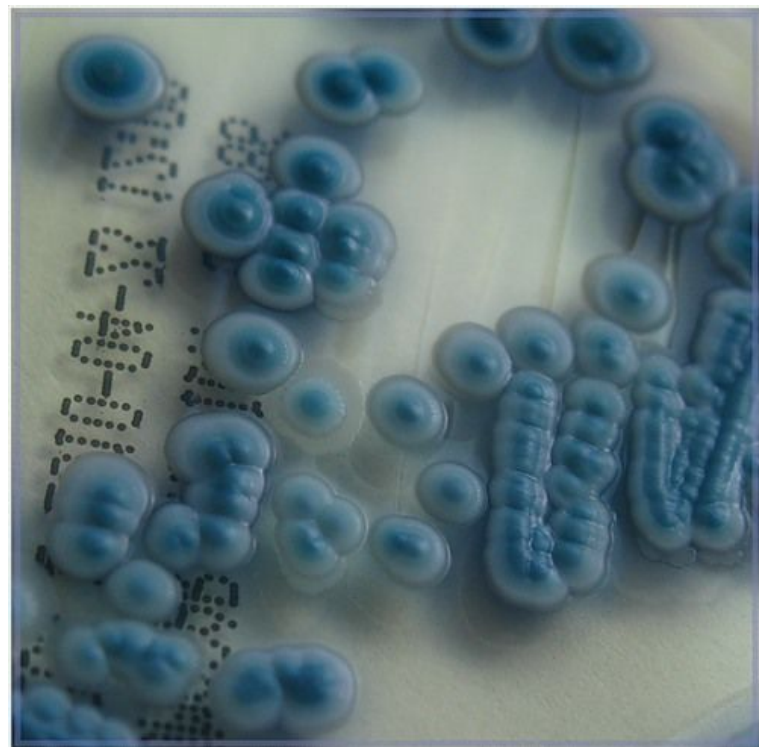


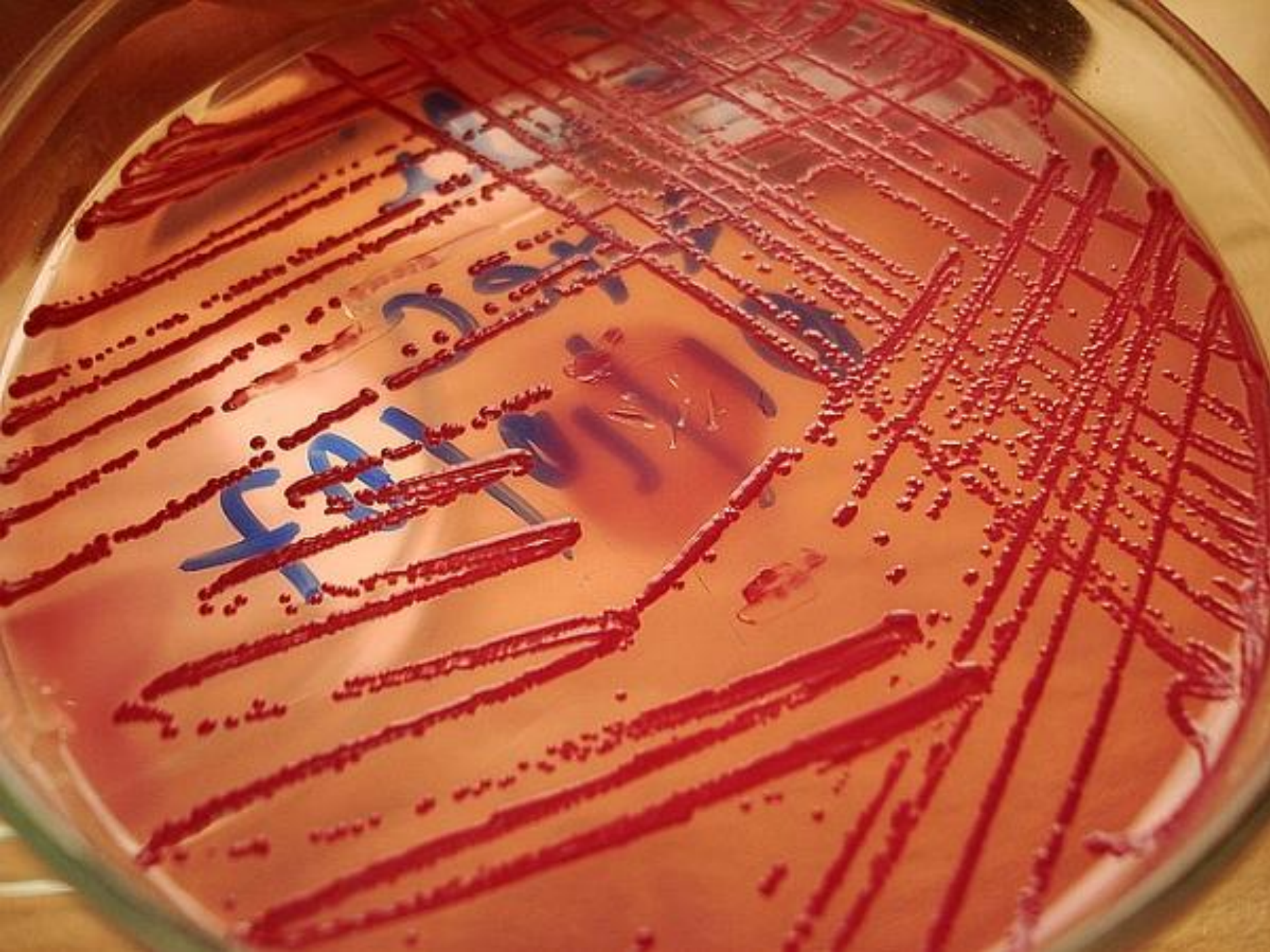
1

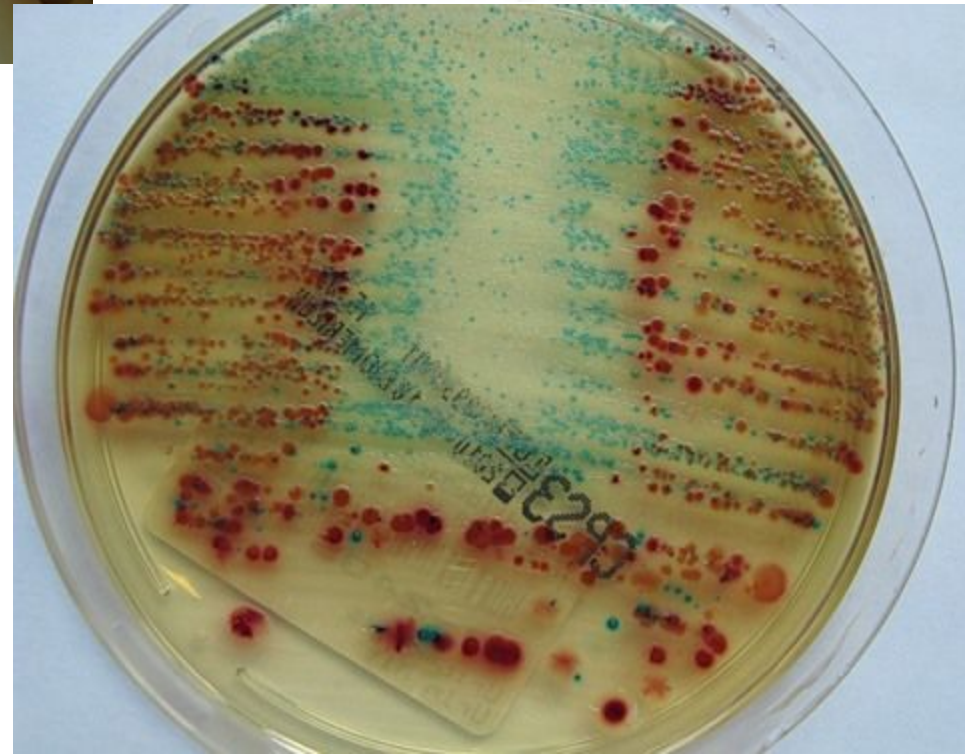
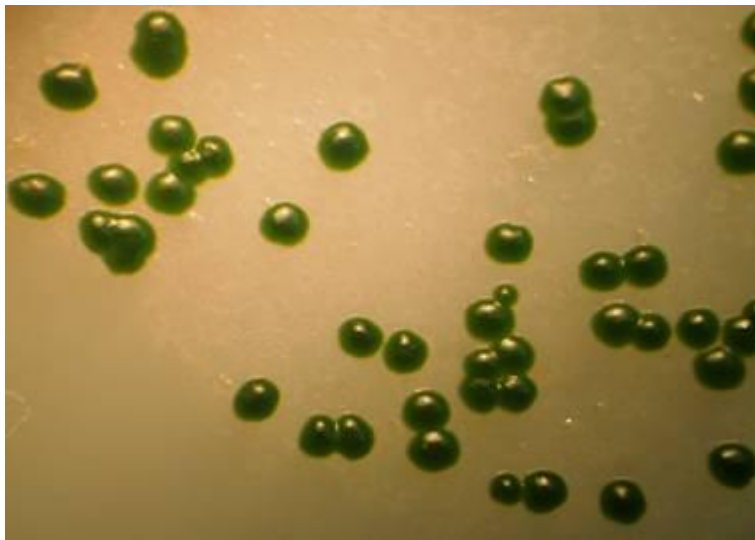
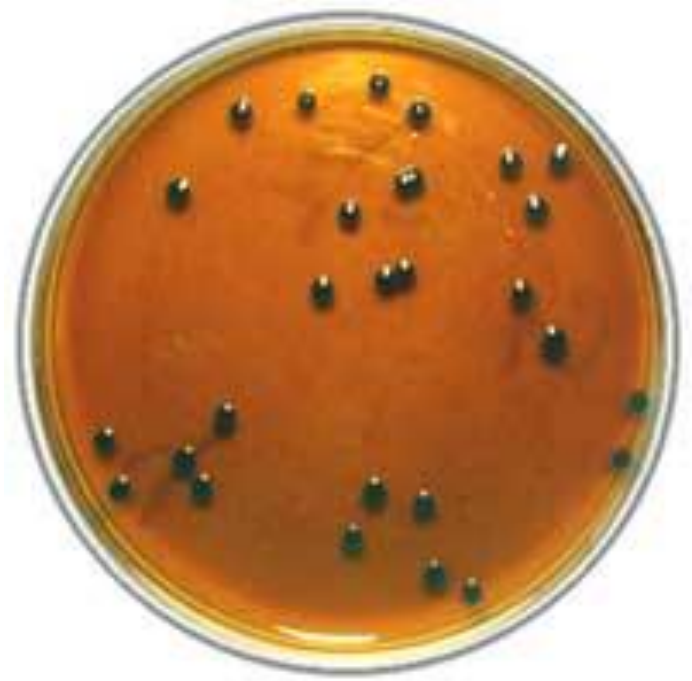




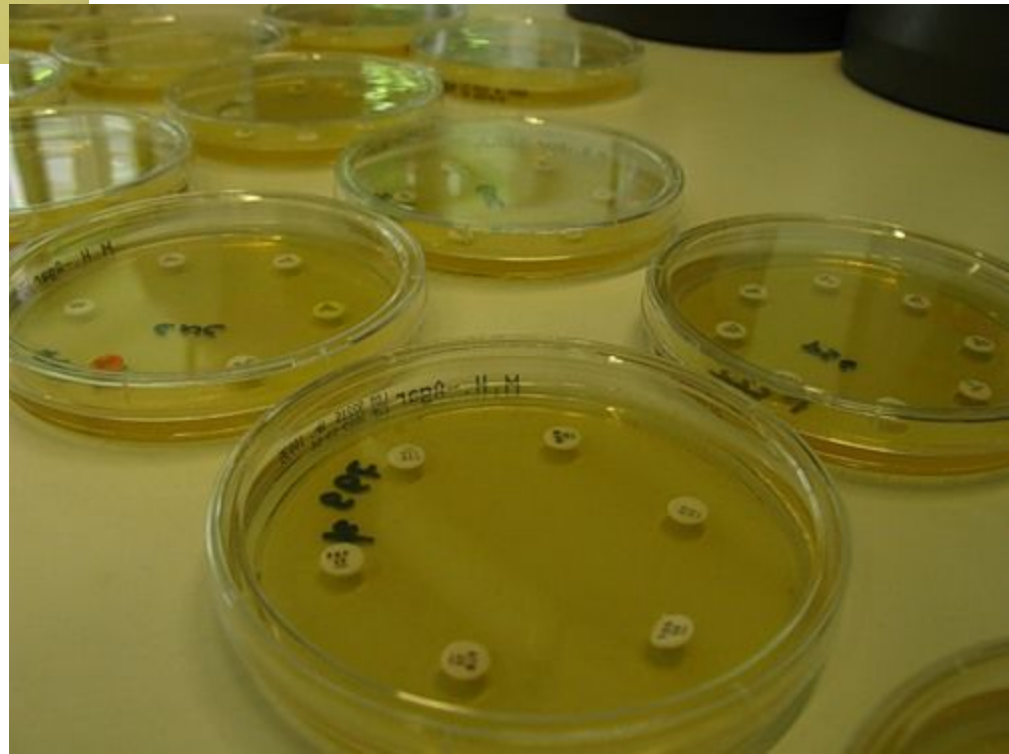












**Питательная среда —
вещество или смесь
веществ, применяемая для
культивирования
макро- и микроорганизмов**

Требования, предъявляемые к средам

- быть **питательными**, то есть содержать в легко усвояемом виде все вещества, необходимые для удовлетворения пищевых и энергетических потребностей. При культивировании ряда микроорганизмов в среды вносят *факторы роста* — витамины, некоторые аминокислоты, которые клетка не может синтезировать.
- иметь **оптимальную** концентрацию водородных ионов — **pH**, так как только при оптимальной реакции среды, влияющей на проницаемость оболочки, микроорганизмы могут усваивать питательные вещества.
- Для большинства **патогенных бактерий** Для большинства патогенных бактерий оптимальна слабощелочная среда (pH 7,2-7,4). Исключение составляют **холерный вибрион** Для большинства патогенных бактерий оптимальна слабощелочная среда (pH 7,2-7,4). Исключение составляют холерный вибрион — его оптимум находится в щелочной зоне (pH 8,5-9,0) и **возбудитель туберкулёза**, нуждающийся в слабокислой реакции (pH 6,2-6,8).
- Чтобы во время роста микроорганизмов кислые или щелочные продукты их жизнедеятельности не изменили pH, среды должны обладать *буферностью*, то есть содержать вещества, нейтрализующие продукты обмена.
- быть **изотоничными** для микробной клетки; то есть **осмотическое давление** для микробной клетки; то есть осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки. Для большинства микроорганизмов оптимальная среда, соответствующая 0,5 % раствору **натрия хлорида**.
- быть **стерильными**, так как посторонние микробы препятствуют росту изучаемого микроба, определению его свойств и изменяют свойства среды.
- плотные среды должны быть **влажными** и иметь оптимальную для микроорганизмов консистенцию.
- обладать определённым **окислительно — восстановительным** потенциалом, то есть соотношением веществ, отдающих и принимающих электроны, выражаемым индексом RH_2 . Например, **анаэробы** размножаются при RH_2 , не выше 5, а **аэробы** — при RH_2 не ниже 10.
- быть по возможности **унифицированным**, то есть содержать постоянное количество отдельных ингредиентов.
- Желательно, чтобы среды были *прозрачными* — удобнее следить за ростом культур, легче заметить загрязнение среды посторонними микроорганизмами.

I. По составу различают:

- 1. **Натуральные (естественные) среды, которые состоят из продуктов животного или растительного происхождения и имеют неопределенный химический состав. К таким средам относятся овощные и фруктовые соки, животные ткани, кровь, молоко, яйца, желчь, сыворотка крови, а также отвары и экстракты, полученные из различных природных субстратов - мяса, различных частей растений, почвы.**
- 2. **Полусинтетические среды в состав которых наряду с веществами неопределенного состава входят соединения известной химической природы.**
- 3. **Синтетические среды, содержат только химически чистые соединения в точно указанных концентрациях, т.е. состав их полностью известен. Преимущества таких сред - стандартность и воспроизводимость с высокой степенью точности. Их используют, главным образом, для экспериментального изучения метаболизма микроорганизмов, реже - для аналитических целей, диагностики, хранения культур.**

III. По консистенции различают:

- 1. Жидкие среды - применяют для изучения биохимических и физиологических свойств микроорганизмов, для накопления биомассы или продуктов обмена, хранения микроорганизмов, плохо развивающихся на плотных средах.
- 2. Полужидкие среды - используют для хранения культур, реже - для накопления биомассы.
- 3. Плотные среды - используют для выделения чистых культур, морфологии колоний, диагностических целей, хранения культур, количественного учета, изучения антагонистических свойств.

Плотные и полужидкие среды готовят из жидких, к которым прибавляют [агар-агар](#) или желатин. Кроме того, в качестве плотных сред применяют свёрнутую сыворотку крови, свёрнутые яйца, картофель, среды с силикагелем. *Некоторые микроорганизмы используют желатин как питательное вещество — при их росте среда разжижается.*

- 4. Сыпучие среды - используются для хранения посевного материала, культур-продуцентов в микробиологической и медицинской промышленности.
- 5. Сухие питательные среды - представляют собой гигроскопические порошки влажностью до 10%, используемые для приготовления готовых питательных сред.

II. По назначению различают:

- 1. Питательные среды общего назначения (базовые питательные среды) - пригодны для выращивания многих видов микроорганизмов и могут применяться в качестве основы для приготовления специальных питательных сред.
- 2. Специальные селективные (избирательные) среды - применяются для выделения микроорганизмов из мест их естественного обитания или получения накопительных культур. Эти среды обеспечивают преимущественное развитие одного вида или группы микроорганизмов, что достигается путем создания оптимальных условий для развития для одних микроорганизмов, т.е. положительной селекцией, или угнетением роста других, т.е. методом отрицательной селекции.
- 3. Специальные дифференциально-диагностические среды - применяют для изучения биохимических свойств и дифференцировки одного вида (рода) микроорганизмов от другого по характеру их ферментативной активности. Дифференцирующие свойства питательной среды создаются путем внесения субстрата, к которому определяется отношение микроорганизма, и соответствующих рН-индикаторов.
- 4. Специальные консервирующие (транспортные) среды - используются в клинической практике для сохранения жизнеспособности микроорганизмов в период от момента взятия биоматериала до посева, основная цель использования - сохранение жизнеспособности возбудителя и подавление размножения сопутствующей флоры в период

- По составу:
 - простые: мясопептонный бульон(МПБ), мясопептонный агар(МПА), , питательный желатин,
 - сложные — готовят прибавляя к простым средам кровь, сыворотку, углеводы и другие вещества.
- По назначению:
 - основные — служат для культивирования большинства патогенных микробов. МПБ, МПА, бульон и агар Хоттингера, пептонная вода.
 - специальные — служат для выделения и выращивания микроорганизмов, не растущих на простых средах.
 - селективные(избирательные) — служат для выделения определённого вида микробов, росту которых они благоприятствуют, задерживая или подавляя рост сопутствующих микроорганизмов. Среда становится селективной при добавлении к ним определённых антибиотиков, солей, изменения pH. Жидкие селективные среды называют средами *накопления*.
 - дифференциально-диагностические — позволяют отличить один вид микробов от другого по ферментативной активности.
 - консервирующие — предназначены для первичного посева и транспортировки исследуемого материала.

Этапы приготовления

- **варка:** среды варят на открытом огне, водяной бане: среды варят на открытом огне, водяной бане, автоклаве или варочных котлах.
- **установление pH:** ориентировочно производят с помощью индикаторной бумаги: ориентировочно производят с помощью индикаторной бумаги, для точного определения пользуются потенциометром или компаратором. При стерилизации pH снижается на 0,2, поэтому сначала готовят более щелочной раствор.
- **осветление** производят, если при варке среды мутнеют или темнеют. Для этого используют белок куриного яйца или сыворотку крови.
- **фильтрация** жидких и расплавленных желатиновых сред производят через влажный бумажный или матерчатый фильтры. Фильтрация агаровых сред затруднена — они быстро застывают. Обычно их фильтруют через ватно-марлевый фильтр.
- **разливают** среды не более чем на $\frac{3}{4}$ емкости, так как при стерилизации могут намокнуть пробки и среды утратят стерильность.
- **стерилизация:** режим стерилизации зависит от состава среды и указан в её рецепте

Контроль

- для контроля *стерильности* среды ставят на 2 суток в термостат, после чего их просматривают.
- *химический* контроль окончательно устанавливает pH, содержание общего и амминого азота, пептона, хлоридов.
- для *биологического* контроля несколько образцов среды засевают специально подобранными культурами, и по их росту судят о питательных свойствах среды.







Селенитовый
бульон

Бульон для
иерсиний

