



**импульс**  
образовательный центр

# «Методы исследования в микробиологии»

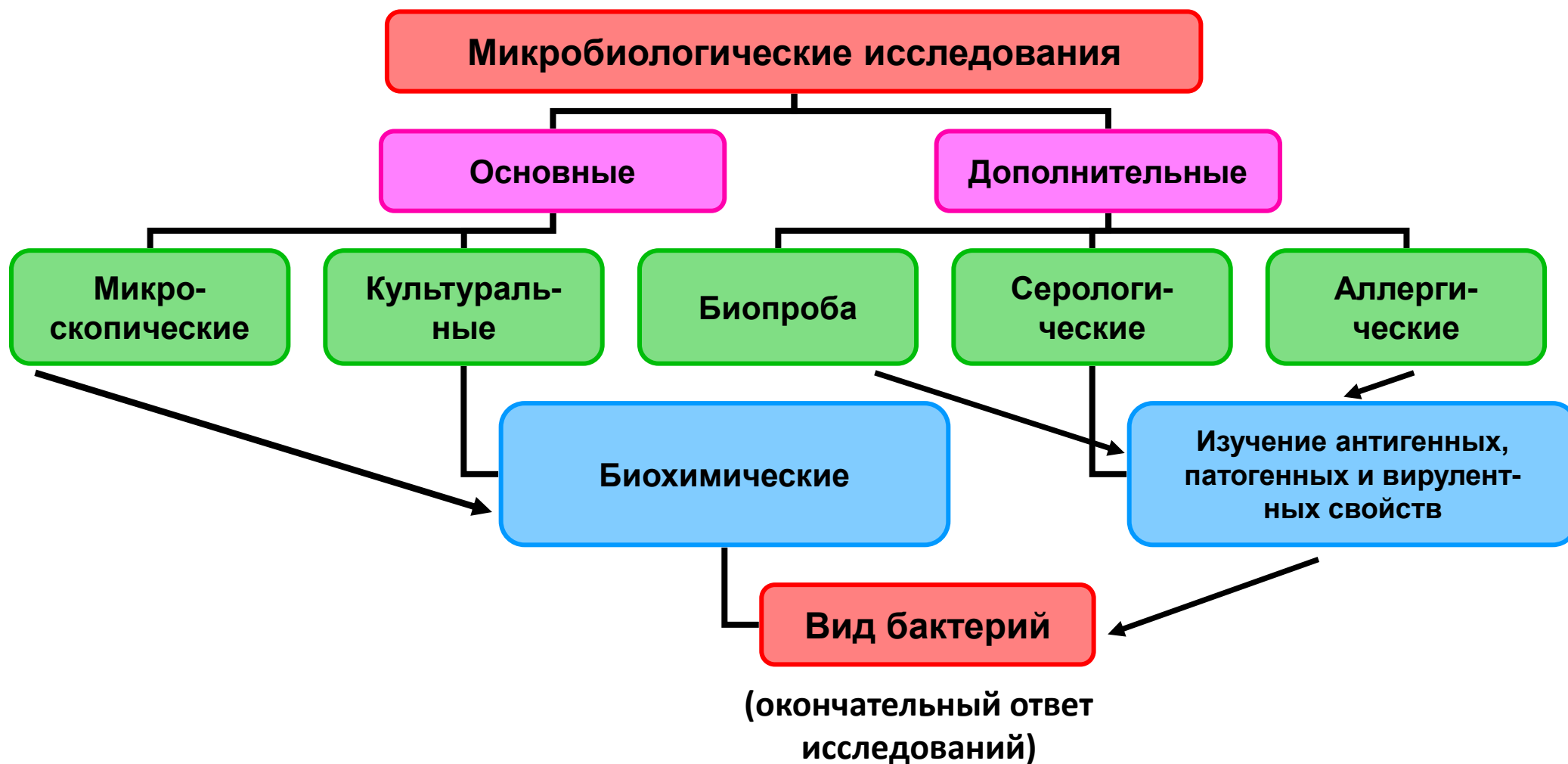
**Лысцева Алина Алексеевна,**

**Методист АОУ ДО ВО «Региональный центр дополнительного  
образования детей», образовательный центр «Импульс»**

**Март 2022 г.**



# Методы исследования в микробиологии





# Методы исследования в микробиологии

- **Микроскопический метод**: оптическая, фазово-контрастная, темнопольная, флуоресцентная, электронная;
- **Культуральный метод** (бактериологический, вирусологический, микологический);
- **Биологический метод** (заражение лабораторных животных с воспроизведением инфекционного процесса на чувствительных моделях);
- **Серологический метод** — выявления антигенов микроорганизмов или антител к ним;
- **Молекулярно-генетический метод** (ПЦР, биочипы, секвенаторы и др.).



# Методы исследования в микробиологии

**Цель микробиологических исследований** — установить факт наличия или отсутствия возбудителей на объектах окружающей среды.

**Задачи микробиологических исследований** —

1. Идентифицировать микроорганизмы в исследуемом материале и определить их видовую принадлежность по морфологическим, биохимическим, токсигенным и антигенным свойствам;
2. Установить чувствительность выделенных микроорганизмов к антимикробным препаратам.



# Методы исследования в микробиологии

## МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Микроскопические методы включают приготовление мазков и препаратов для микроскопирования.
- В большинстве случаев результаты микроскопических исследований носит ориентировочный характер. Микроскопией материала можно определить наличие или отсутствие микроорганизмов в исследуемых образцах.

- Для микроскопических исследований (изучение бактерий под микроскопом) используют несколько типов микроскопов:



Оптический



Бинокулярный



Люминесцентный



Электронный



# Методы исследования в микробиологии







# Методы исследования в микробиологии

## Методы окраски мазков

- ***Простой метод.*** Фиксированный мазок окрасить каким-либо одним красителем, например фуксином водным (1-2 мин) или метиленовым синим (3-5 мин), промыть водой, высушить и микроскопировать.
- ***Сложные методы.*** Последовательно нанести на препарат определенные красители, различающиеся по химическому составу и цвету, протравы, спирты, кислоты и др. Это позволяет выявить определенные структуры клеток и дифференцировать одни виды микроорганизмов от других. Окрас методом Грама является сложным методом.



# Методы исследования в микробиологии

## Простые методы окраски

- Стандартные красители, используемые для окраски бактерий, — карболовый фуксин Циля, фуксин Пфайфера и метиленовый синий по Лёффлеру.
- Для получения более информативных результатов в светоптической микроскопии используют специальные и дифференцирующие методы окраски.





# Методы исследования в микробиологии

## Сложные методы окраски

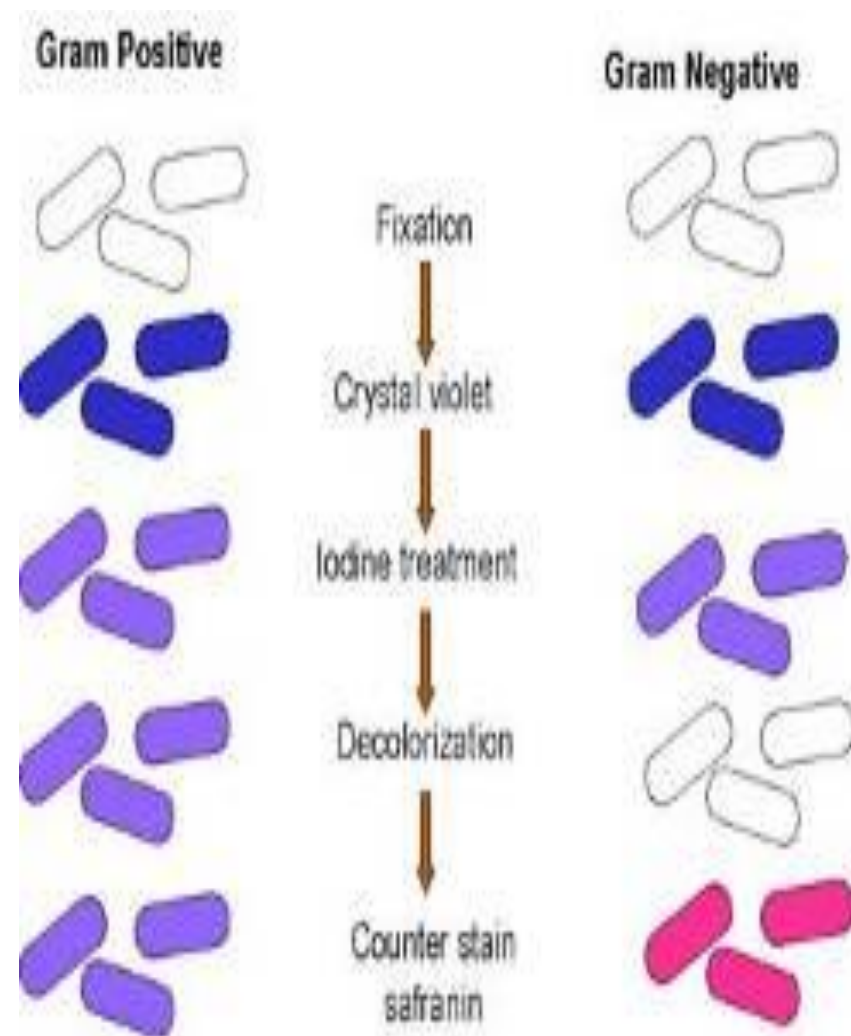
- **Дифференцирующие методы окраски бактерий.** Наибольшее распространение нашли методы *Грама* и *Циля-Нильсена* .
- **Специальные методы** обычно применяют для окрашивания различных морфологических структур.
- **Капсулы.** Для окраски капсул бактерий применяют методы Хисса, Лейфсона и Антони; последний метод наиболее прост и включает окраску кристаллическим фиолетовым с последующей обработкой 20% водным раствором  $\text{CuSO}_4$ .
- **Жгутики.** Для окраски жгутиков предложены методы Лёффлера, Бейли, Грея и др. Для этих методов характерны первоначальное протравливание препарата [обычно растворами таннина,  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ ,  $\text{HgCl}_2$ ] и последующая окраска (чаще карболовый фуксин Циля).
- **Споры.** Окраску спор бактерий проводят после предварительной обработки их стенок. Наиболее прост метод Пешкова, включающий кипячение мазка с синькой Лёффлера на предметном стекле с последующей докраской нейтральным красным. Споры окрашиваются в синий цвет, вегетативные клетки — в розовый.



# Методы исследования в микробиологии

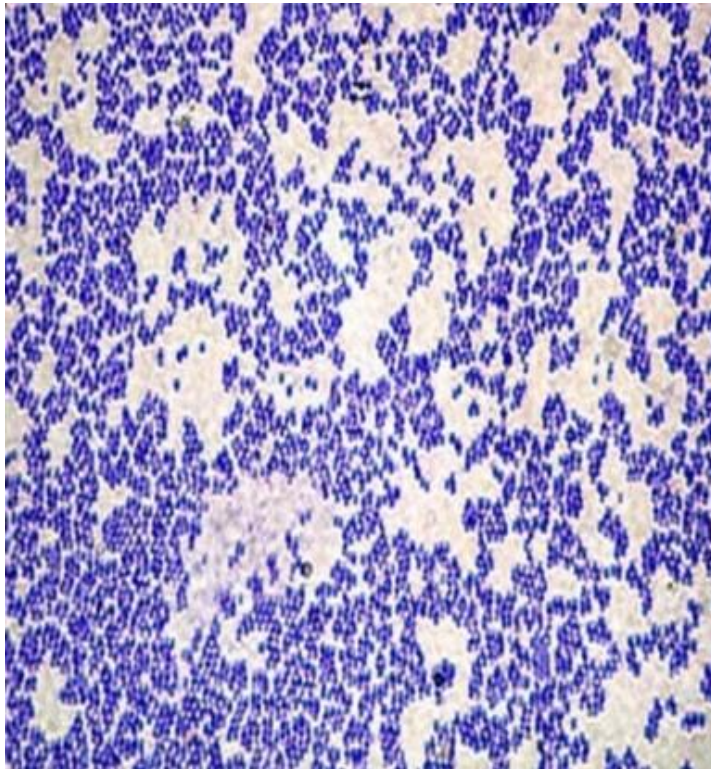
## Окраска по методу Грама

- На фиксированный мазок нанести карболово-спиртовой раствор генцианового фиолетового через полоску фильтровальной бумаги. Через 1-2 мин ее снять, а краситель слить.
- Нанести раствор Люголя на 1-2 мин.
- Обесцветить этиловым спиртом в течение 30-60 с до прекращения отхождения фиолетовых струек красителя.
- Промыть водой.
- Докрасить водным раствором фуксина в течение 1-2 мин, промыть водой, высушить и микроскопировать.
- Грамположительные бактерии окрашиваются в темно-фиолетовый цвет, грамотрицательные - в красный.

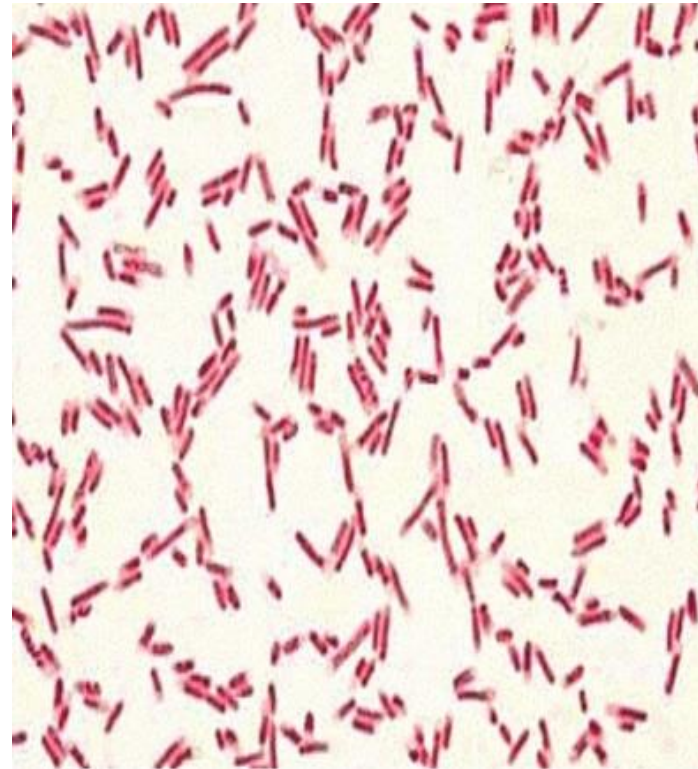




# Методы исследования в микробиологии



Грамположительные



Грамотрицательные





# Методы исследования в микробиологии

## Культуральные исследования

- Для выделения чистых культур патогенных бактерий применяют оптимальные для их роста питательные среды с фиксированным pH;
- Большинство бактерий способно расти на различных питательных средах;
- Все питательные среды должны отвечать следующим требованиям:





# Методы исследования в микробиологии

- содержать основные питательные вещества в легкоусвояемой форме;
- быть влажными, изотоничными и нетоксичными (для исследуемых микробов);
- иметь определенную вязкость;
- иметь оптимальный показатель pH и окислительно-восстановительный (редокс) потенциал;
- обладать буферными свойствами;
- быть стерильными;
- по возможности быть прозрачными.



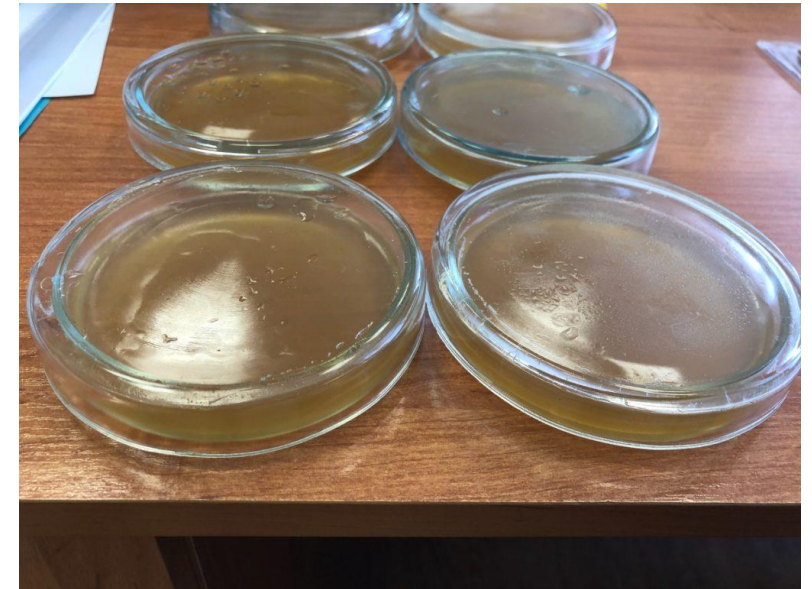


# Методы исследования в микробиологии

## Посев на специальные питательные среды

### I этап – Посев на питательные среды

- ✓ В первый день исследования производят посев материала последовательно на 2-3 чашки с агаром. В некоторых случаях посев производят на жидкие среды.
- ✓ Посевы помещают в термостат на 18-24 часа.
- ✓ На дне чашки пишут дату посева, место откуда брали образец.



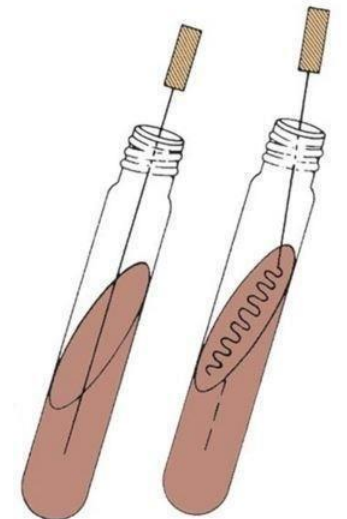
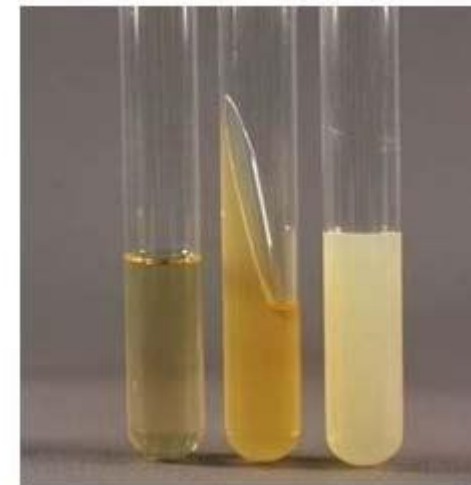
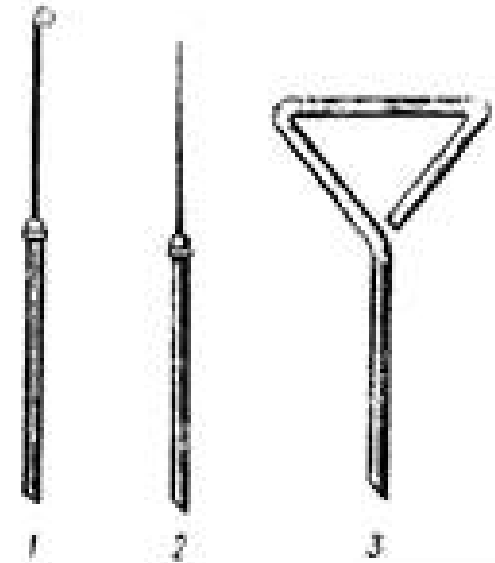


# Методы исследования в микробиологии

## Посев на специальные питательные среды

II этап – Выделение чистой культуры (откол колоний)

- ✓ Изучение внешнего вида выращенных колоний, их формы, величины и окраски.
- ✓ Из подозрительных колоний делают мазки и окрашивают их по Граму.
- ✓ Для получения чистой культуры делают петлей пересев подозрительной колонии на косой агар, который ставят в термостат.





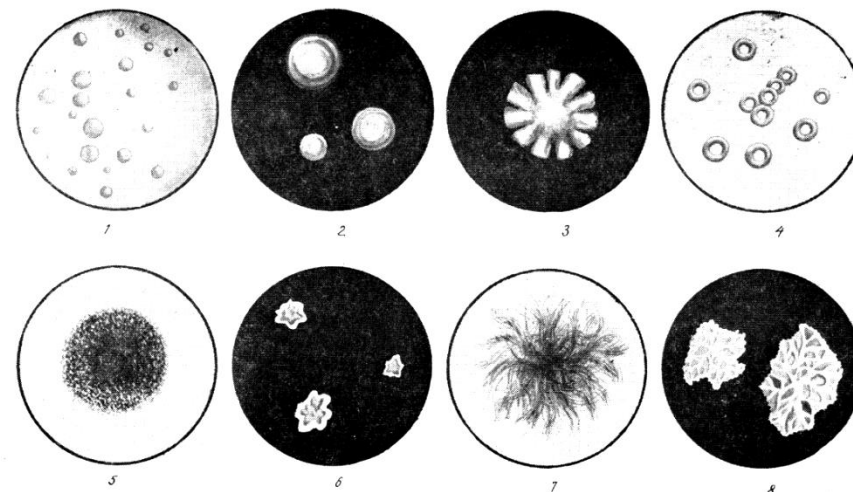
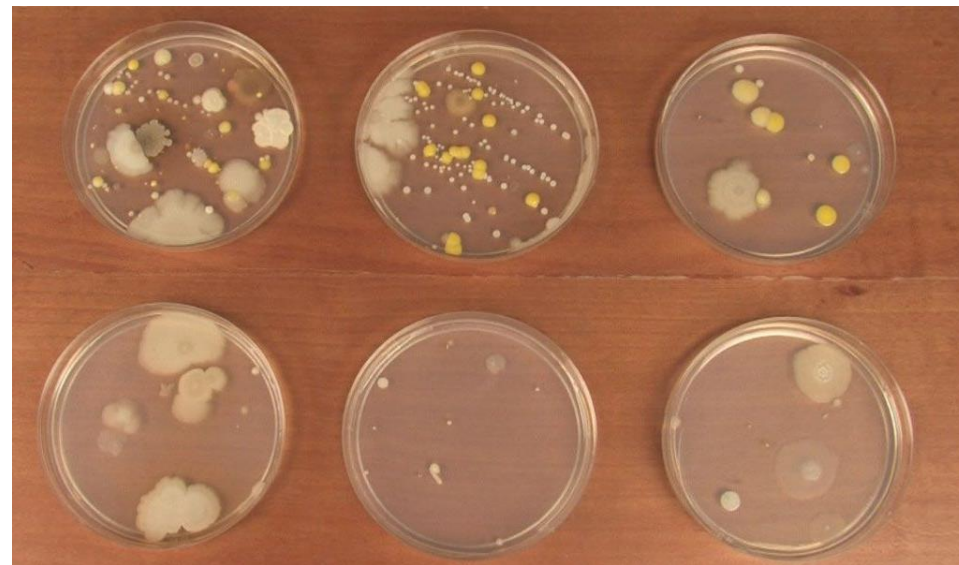


# Методы исследования в микробиологии

## Посев на специальные питательные среды

### III этап – Идентификация чистой культуры

- ✓ Изучение чистой культуры по совокупности морфологических, культуральных, биохимических и антигенных свойств.
- ✓ Для обнаружения этих свойств делают пересев чистой культуры на соответствующие питательные среды, которые ставят в термостат.





# Методы исследования в микробиологии

## Посев на специальные питательные среды

### IV этап – Определение чувствительности к антимикробным препаратам

- ✓ Определяют свойства чистой культуры, чувствительность к антибиотикам.
- ✓ Окончательное определение вида чистой культуры производят при помощи реакции агглютинации на стекле микроба с иммунной сывороткой.



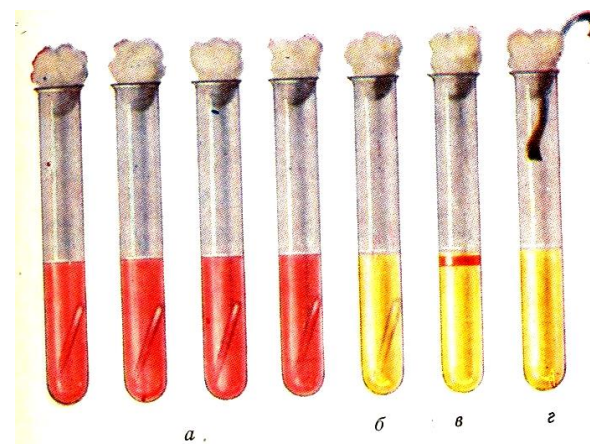
# Методы исследования в микробиологии

## Биохимические исследования

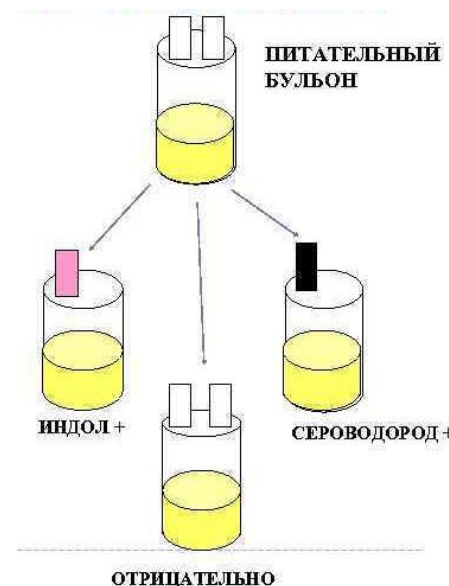
**1. Посев «чистых» колониальных культур на «пестрый ряд»** - жидкие питательные среды с разными моноуглеводами и индикатором Андреде для определения ферментативных свойств бактерий. При расщеплении углеводов образуются кислые продукты, изменяется цвет среды (индикатор pH) и выделяется газ.

**2. Реакция на аммиак** (лакмусовой бумагой под пробкой).

**3. Реакция на сероводород** (бумага с ацетатом свинца чернеет).



«Пестрый» ряд:  
а-ферментация углеводов,  
б-отсутствие ферментации,  
в-индолообразование,  
г-образование сероводорода.





**импульс**  
образовательный центр

---

# Спасибо за внимание!

---

Март 2022 г.