

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Б1.В.ДВ.12.02 Спецсеминар

Направление подготовки 06.03.01 Биология

Профиль образовательной программы Микробиология

Форма обучения очная

СОДЕРЖАНИЕ

1. Методические указания по выполнению лабораторных работ.....	3
1.1 Лабораторная работа № ЛР-1 «Механизмы выживания бактерий в окружающей среде. Спорообразование, капсулообразование. Окраска спор, капсул».....	3
1.2 Лабораторная работа № ЛР-2 «Факторы персистенции бактерий. Определение антилизосимной, антиинтерфероновой, антилактоферриновой активности»	6
1.3 Лабораторная работа № ЛР-3 «Микроорганизмы атмосферного воздуха. Санитарно-микробиологическая оценка воздуха».....	8
1.4 Лабораторная работа № ЛР-4 «Микроорганизмы почвы. Санитарно-микробиологическая оценка почвы».....	10
1.5 Лабораторная работа № ЛР-5 «Микрофлора тела животных и человека. Определение микробной обсемененности кожи человека».....	12
1.6-7 Лабораторная работа № ЛР-6-7 «Микроорганизмы – паразиты животных, человека и растений. Возбудители наиболее распространенных бактериальных заболеваний человека и животных».....	16
1.8 Лабораторная работа № ЛР-8 «Микроорганизмы, используемые в молочной промышленности, в производстве напитков. Изучение морфологии микроорганизмов заквасок».....	25
1.9 Лабораторная работа № ЛР-9 «Пищевые продукты, получаемые микробным путем.....	28
1.10 Лабораторная работа № ЛР-10 «Антибиотики микробного происхождения, их использование для лечения инфекционных заболеваний».....	31
1.11 Лабораторная работа № ЛР-11 «Микроорганизмы, используемые в очистке и переработке, промышленных и бытовых отходов. Изучение морфологии и культуральных свойств некоторых из них».....	33
1.12 Лабораторная работа № ЛР-12 «Вещества микробного происхождения, используемые для лечения и профилактики и диагностики инфекционных заболеваний человека и животных. Рассмотрение различных аллергенов, антигенов, вакцинных препаратов».....	34

1. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

1.1 Лабораторная работа №1 (2 часа).

Тема: «Механизмы выживания бактерий в окружающей среде. Спорообразование, капсулообразование. Окраска спор, капсул»

1.1.1 Цель работы: ознакомить студентов с различными механизмами выживания бактерий в окружающей среде.

1.1.2 Задачи работы:

1. Рассмотреть L-формы бактерий, как способ выживания в макроорганизме.
2. Покой как форма адаптации микроорганизмов
3. Спорообразование и капсулообразование как способ выживания, методы окраски спор и капсул.

1.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Культура *B. subtilis* на стадии спорообразования, 20-ти часовая культура *E.coli*.
2. Готовые окрашенные мазки-отпечатки с *B. anthracis*, окрашенные по Михину и Ольту.
3. Табличный материал.
4. Красители, предметные и покровные стекла, стекла с лунками, физиологический раствор, бактериологические петли, спиртовые горелки, вазелин.
5. Световые микроскопы бинкулярные XSP-103P.

1.1.4 Описание (ход) работы:

L-формы — бактерии, частично или полностью лишённые клеточной стенки, но сохранившие способность к развитию. Впервые обнаружены в 1894 году Н.Ф. Гамалеем. Буква L — первая буква названия Листеровского института в Лондоне, где впервые Эмми Кляйнебергер-Нобель обратила внимание на развитие морфологически весьма необычных клеток в культуре бактерий *Streptobacillus moniliformis*, выделенной из жидкости уха крысы. Позже были описаны L-формы у самых разных видов бактерий. Было показано, что L-формы возникают спонтанно или индуцировано - под воздействием агентов, блокирующих синтез клеточной стенки: антибиотиков (пенициллины, циклосерин, цефалоспорины, ванкомицин), ферментов (лизоцим, амидаза, эндопептидаза) ультрафиолетовых и рентгеновских лучей, аминокислоты глицина. L-формы образуются в результате несбалансированного роста нормальных бактериальных клеток в длину и в толщину и поэтому полиморфны. В культурах L-форм обнаруживаются шаровидные, нитевидные или вовсе бесструктурные клетки размером от 0,2 до 50 мкм. Они спокойно проходят через бактериальные фильтры и легко разрушаются при механических воздействиях. В отличие от нормальных клеток L-формы часто содержат крупные вакуоли. Их метаболическая активность очень низкая. Клеточное деление происходит нестандартно, за счёт образования элементарных тел путём отпочкования от поверхности клетки или от мембраны вакуоли. Культивировать L-формы можно только на специальных средах препятствующих осмотическому разрушению клеток. L-формы лучше растут на плотной, чем в жидкой среде. На плотной среде они образуют колонии, вырастающие в агар и имеющие характерную форму перевернутой шляпы. Колонии растут медленно, хотя иногда достигают значительных размеров.

Различают стабильные и нестабильные L-формы. Нестабильные L-формы имеют полноценную систему генетического контроля синтеза клеточной стенки и способны превращаться в нормальные бактериальные клетки после исключения действия фактора, вызвавшего их образование. При этом происходит восстановление всех основных

биологических свойств такой клетки, включая патогенность. Если же генетический контроль синтеза клеточной стенки нарушен необратимо L-формы становятся стабильными, и по своим морфологическим, культуральным и иным свойствам становятся неотличимы от микоплазм. Они крайне редко возвращаются в исходные бактериальные формы и существуют без изменений в различных условиях среды. Переход в L-форму можно рассматривать как способ переживания бактериями неблагоприятных условий, особенно в случаях патогенных микроорганизмов.

Исследования L-форм представляют существенный интерес для медицинской микробиологии, поскольку в этой форме в организме человека и животных могут сохраняться патогенные бактерии. При нерациональном использовании антибиотиков, приводящем к образованию L-форм из бактерий, может наступить улучшение состояния больного. Однако после прекращения приема лечебного препарата наступает превращение L-форм в бактерии исходного вида с восстановлением их вирулентности, что приводит к рецидиву болезни. L-формы можно рассматривать как свойственную всем бактериям форму приспособления к неблагоприятным условиям (подобно спорообразованию), которая способствует сохранению вида в природе. Клеточная стенка и её синтез чувствительны к действию антител и различных химиопрепаратов. Освобождение от неё не лишает микроорганизм жизнеспособности, но позволяет переживать действие этих неблагоприятных факторов, а после устранения их воздействия возвращаться в исходное состояние).

Циста (от греч.— пузырь) — временная форма существования микроорганизмов (обычно бактерий и простейших, многих одноклеточных), характеризующаяся наличием защитной оболочки, в неблагоприятных условиях или в определенные моменты их жизненного цикла, а также сама эта оболочка. Цисты представителей рода *Azotobacter* являются более устойчивыми к действию неблагоприятных факторов внешней среды, чем вегетативные клетки — так, цисты в два раза более устойчивы к действию ультрафиолетового излучения чем вегетативные клетки, устойчивы к высушиванию, гамма-излучению, солнечной радиации, действию ультразвука, однако не являются устойчивыми к действию высоких температур. Формирование цист индуцируется изменением концентрации питательных веществ в питательной среде, добавлением некоторых органических веществ (например этанола, н-бутанола и β -гидроксibuтирата) к питательной среде, цисты редко образуются в жидких питательных средах, инцистирование может быть индуцировано химическими факторами, инцистирование сопровождается метаболическими сдвигами, изменениями в катаболизме и дыхании, изменениями в биосинтезе макромолекул. Циста представляет собой сферическое тело, состоящее из т. н. центрального тела, представляющего собой уменьшенную копию вегетативной клетки с большим количеством вакуолей, и двуслойной оболочки, внутренняя часть которой называется интима, имеющая волокнистое строение, а внешняя экзина, представленная ровной, отражающей структурой, имеющей гексагональное кристаллическое строение, экзина частично гидролизует трипсином и устойчива к действию лизоцима в отличие от центрального тела. Центральное тело может быть изолировано в жизнеспособном состоянии некоторыми хелатирующими агентами. Главными компонентами внешней оболочки цисты являются алкилрезорцинолы, состоящие из длинных алифатических цепей и ароматических колец, также представлены среди других бактерий, животных и растений.

Покоящиеся формы микроорганизмов — это специализированные анабиотические формы (такие как эндо- и экзоспоры, микроспоры, цисты) известны лишь для ограниченного круга микроорганизмов. Однако как у спорообразующих микроорганизмов (*Bacillus cereus*) на фоне подавления спорообразования, так и у споронеобразующих (*Pseudomonas carboxidoflava*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*) бактерий внеклеточные микробные метаболиты, проявляющие свойства индукторов анабиоза, вызывают образование цистоподобных рефрактерных клеток (термин связан с переходом целой

клетки в покоящуюся форму и увеличенной способностью данных клеток по сравнению с обычными сильно преломлять свет).

В этих клетках снижение метаболической активности (гипометаболизм) сопровождается развитием резистентности к экстремальным воздействиям. Эти формы отличаются нерегистрируемым уровнем эндогенного дыхания, повышенной терморезистентностью и специфической ультраструктурой. По сравнению с вегетативными клетками, цистоподобные рефрактерные клетки обладают рядом особенностей ультраструктурной организации: у них снижена плотность рибосом в цитоплазме, цитоплазма приобретает мелкозернистую структуру, увеличена толщина клеточной стенки, в самой клеточной стенке появляются слоистость и некоторые плотные включения. Для споронеобразующих микроорганизмов цистоподобные рефрактерные клетки — единственная покоящаяся форма, способная сохраняться в течение нескольких лет, а для спорообразующих бактерий — альтернатива спорообразования. Поскольку рефрактерные клетки невозможно выявить с помощью традиционных бактериологических подходов, то в самое ближайшее время они могут создать серьёзную проблему при оценке их эпидемиологической и экологической значимости.

Бактериальные эндоспores — это особый тип покоящихся клеток грамположительных бактерий, формирующихся эндогенно, т. е. внутри цитоплазмы «материнской» клетки, обладающих специфическими структурами (многослойными белковыми покровами, наружной и внутренней мембранами, кортексом) и повышенной устойчивостью к повреждающим факторам внешней среды (к высокой и низкой температурам, обезвоживанию, высокой кислотности среды, радиации, механическим воздействиям). Поскольку эндоспores обладают многослойными, труднопроницаемыми для молекул основных красителей оболочками, при простом окрашивании клеток метиленовым синим, фуксином и генциановым фиолетовым, они не окрашиваются и обнаруживаются в окрашенной цитоплазме в виде бесцветных включений. Все имеющиеся специальные способы окраски спор основаны на том, что первоначально сильным красителем с подогреванием красят одновременно клетку и спор, а затем обесцвечивают протоплазму, оставляя спор окрашенной. После этого протоплазму красят дополнительно в другой цвет. Примером дифференциального способа окраски спор является окраска по методу Вальдмана, Шеффера-Фултона.

Окраска по методу Вальдмана. На фиксированный мазок наносят щелочную синьку Леффлера и нагревают до кипения, остужают и промывают водой. Докрашивают 1%-м водным раствором нейтральрота — 30 с. Препарат промывают водой и подсушивают. Микроскопическая картина: споры красные, вегетативные клетки синие.

Окраска по методу Шеффера-Фултона. Фиксированный мазок покрывают фильтровальной бумагой, наливают 0,5%-й водный раствор малахитовой зелени и выдерживают 5 мин над кипящей водой, промывают водой и окрашивают 2%-м водным раствором сафранина 30 сек. Промывают. Микроскопическая картина: споры зеленые; клетки вегетативные — красные.

Капсула — это слизистый слой над клеточной стенкой бактерии. Вещество капсулы четко отграничено от окружающей среды. В зависимости от толщины слоя и прочности соединения с бактериальной клеткой различают видимую макрокапсулу толщиной 0,2 мкм в световом микроскопе, и микрокапсулу толщиной менее 0,2 мкм, обнаруживаемую лишь при электронной микроскопии или выявляемую химическими и иммунологическими методами. Макрокапсулу (истинную капсулу) образуют *B. anthracis*, *Cl. perfringens*, микрокапсулу — некоторые штаммы *Escherichia coli*. Капсула не является обязательной структурой бактериальной клетки, ее потеря не приводит к гибели бактерии. Известны бескапсульные мутанты бактерий, например сибиреязвенный вакцинный штамм СТИ¹. Вещество капсул состоит из высокогидрофильных мицелл, химический же состав их весьма разнообразен. Основные компоненты большинства капсул прокариот — гомо- или гетерополисахариды (энтеробактерии и др.).

У некоторых видов бацилл капсулы построены из полипептида. Капсулы обеспечивают выживание бактерий, защищая их от механических повреждений, высыхания, токсических веществ, заражения фагами, а у патогенных форм - от действия защитных сил макроорганизма: инкапсулированные клетки плохо фагоцитируются. У некоторых видов бактерий, в том числе и патогенных, капсула способствует прикреплению клеток к субстрату. Для окрашивания капсул применяют специальные методы: Романовского — Гимзы, Гинзы — Бурри, Ольта, Михина и др. Микрокапсулу и слизистый слой определяют серологическими реакциями (РА), антигенные компоненты капсулы идентифицируют при помощи иммунофлюоресцентного метода (РИФ) и РДП.

1.2 Лабораторная работа № 2 (2 часа)

Тема: «Факторы персистенции бактерий. Определение антилизоцимной, антиинтерфероновой, антилактоферриновой активности»

1.2.1 Цель работы: познакомить студентов с факторами персистенции патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

1.2.2 Задачи работы:

1. Ознакомление с факторами персистенции микроорганизмов.
2. Методики определения антиинтерфероновой, антилактоферриновой активности.

1.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Набор диагностический для определения антилактоферриновой активности методом ИФА
2. Оборудование для постановки ИФА.

1.2.4 Описание работы

Персистенция (лат. *persisto* — постоянно пребывать, оставаться, длительное существование, присутствие) — длительное пребывание инфекта в организме животных и человека либо без клинических патологических проявлений (латентное течение, ремиссия инфекционного процесса), либо способных при определенных условиях (иммунный дисбаланс и иммунная недостаточность различной этиологии — стресс, переохлаждение, интеркуррентная инфекция, обострение хронического заболевания и т.д.) к активации с исходом в заболевание (активное течение, обострение инфекционного процесса). В механизме развития и активации персистирующей инфекции значительная роль отводится блокированию процессов апоптоза клеток хозяина. В группу патогенов, способных к персистирующему течению, относят возбудителей инфекции, в большей части обладающих свойствами внутриклеточного существования в макроорганизме. Это некоторые бактерии (хламидии, микоплазмы, хеликобактер и др.), но главным образом — вирусы (группа герпесвирусов, гепатита, ВИЧ и многие другие), токсоплазмы и др. Вызываемый ими инфекционный процесс развивается медленно, возбудитель стремится быть не узанным иммунной системой и сохранить себя в человеческих популяциях, интегрируясь с геномом человека (ретровирусы, герпесвирусы, вирус гепатита В, С, хламидии, микоплазмы, токсоплазмы и др.), либо как плазменное образование. Продолжительность таких инфекционных процессов не лимитируется иммунной системой хозяина. К настоящему времени персистенция микробов и вирусов установлена на всех уровнях макроорганизма и рассматривается как закономерное биологическое явление. Микробные агенты обнаружены на коже, в естественных полостях и тканях органов, в цитоплазме и ядре клеток хозяина. Они обитают в кровеносных сосудах и внутри эритроцитов. Уже известно, что при многих болезнях, ранее считавшихся неинфекционными, выявляется причинно-значимый инфекционный агент. Значительное количество исследований, проводящихся сегодня в мире, все чаще указывают на

персистирующую инфекцию как на этиологический и патогенетический фактор развития хронических соматических заболеваний — атеросклероз с поражением органов кровообращения, кардиты, аритмии сердца, бронхиальная астма, хронические и рецидивирующие обструктивные заболевания легких, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, рефрактерные формы хронического гломерулонефрита, сахарный диабет, синдром хронической усталости, шизофрения, онкологические процессы. Длительная персистенция микробов является необходимым условием формирования вирус- и бактерионосительства, которое с общебиологической точки зрения представляет собой новый уровень равновесного отношения между микро- и макроорганизмами, а с медицинской является одной из форм инфекционного процесса. Механизмы, препятствующие действию на микроорганизмы специфических и неспецифических факторов защиты хозяина, следующие: перекрестные с макроорганизмом антигены; подавление фагоцитоза микробными субстанциями (полисахаридами, белково-липидными комплексами и др.); повреждающее действие микроорганизмов на клетки иммунной системы; способность микроорганизмов секретировать вещества, препятствующие действию иммунных факторов (антилизоцимная, антилактоферриновая, антикомплементарная активность и др.); смена антигенного состава возбудителей благодаря мутации; сорбция белков хозяина на поверхности возбудителей и экранизация их антигенности; подавление процессинга и представления антигена, активности ЕК-клеток, апоптоза инфицированных клеток, выработки цитокинов и активности комплемента; нейтрализация цитокинов и их клеточных рецепторов с помощью микроорганизмов.

Изучение антилактоферриновой активности микроорганизмов (АЛФА) проводится методом, основанным на определении остаточного количества лактоферрина в инкубационной смеси с помощью иммуноферментного анализа (ИФА).

Способ определения антилактоферриновой активности осуществляется следующим образом:

- 1) Исследуемые культуры микроорганизмов выращиваются в 3 мл жидкой питательной среды (для каждого вида микроорганизмов используется соответствующий тип питательной среды) при 37°C в течение 24-36 часов.
- 2) Во все пробы добавляют 0,1 мл хлороформа, перемешивают и инкубируют при комнатной температуре в течение 40-60 минут, периодически встряхивая.
- 3) Супернатант отделяют от бактериальных клеток центрифугированием в течение 20 минут при 3000 об/мин.
- 4) На забуференном физиологическом растворе (Sigma, P4417. Состав: 0.01M фосфатный буфер, 0.0027M KCl, 0.137M NaCl, pH 7,4 при 25°C) готовят раствор лактоферрина с концентрацией 2,5 мг/мл.
- 5) Супернатант исследуемых культур микроорганизмов объемом 0,8 мл смешивают с 0,1 мл приготовленного раствора лактоферрина.
- 6) Параллельно с опытными готовят 2 контрольные пробы:
Контроль 1. К 0,1 мл лактоферрина добавляют 0,8 мл жидкой питательной среды.
Контроль 2. К 0,1 мл забуференного физиологического раствора добавляют 0,8 мл жидкой питательной среды.
- 7) Инкубируют пробы в течение 2 часов при 37°C.
- 8) После инкубации в опытные и контрольные пробы добавляют по 0,1 мл взвеси тест-культуры *M.luteus* ГИСК N 211001. Для этого 16-18-часовую агаровую культуру *M.luteus* смывают забуференным физиологическим раствором и готовят взвесь с оптической плотностью 0,160 при длине волны 450 нм. Полученную взвесь разводят в 10000 раз.
- 9) Далее по 100 мкл опытной и контрольной проб инокулируют в лунки полистиролового планшета с 200 мкл питательного бульона. Планшет помещают в термостатируемый блок микробиологического анализатора iEMS-MF (Labsystems, Финляндия) и проводят первое измерение оптической плотности в опыте и контролях непосредственно по достижении

режима термостатирования (37°C) и второе измерение через 18-24 часа инкубации (по достижении максимальной оптической плотности индикаторной культуры в соответствии с общепринятыми микробиологическими стандартами, затем рассчитывают антилактоферриновую активность по формуле.

Определение антиинтерфероновой активности осуществляют следующим образом. К 1,5%-ному питательному агару добавляют препарат человеческого лейкоцитарного интерферона в разведении 1/60-1/40 и разливают в чашки Петри. После застывания среды и ее подсушивания на поверхность наносят петлей в виде отдельных "пятачков" суточную агаровую культуру исследуемых штаммов. Чашки инкубируют сутки при 37° С, после чего выросшие колонии бактерий убивают парами хлороформа в течение 20-25 мин, а затем на "пятачки" культур разливают слой питательного агара (3-4 мл) с 0,2 мл 1 млн. взвеси суточной агаровой культуры *Corynebacterium xerosis*, 4060. Затем повторно инкубируют чашки 24 ч при 37 С. Учет опыта проводится по наличию роста *C. xerosis*. Тест-культура вырастает вокруг колоний тех штаммов, которые нейтрализовали внесенный в питательную среду человеческий лейкоцитарный интерферон.

Для выявления антилизозимной активности исследуемую культуру микроорганизма выращивают в жидкой питательной среде, отделяют супернатант и смешивают его с лизоцимом, параллельно готовят контроль, опытную пробу и контроль смешивают с суспензией тест-культуры *Micrococcus lysodeikticus* и определяют антилизозимную активность по оптической плотности полученных смесей, при этом в качестве контроля используют смесь питательного бульона с лизоцимом, осуществляют инкубирование супернатанта с лизоцимом, вводят инкубированную смесь в предварительно обработанную трилоном Б тест-культуру и проводят измерение оптической плотности опытной пробы и контроля через 30 и 150 с, затем рассчитывают антилизозимную

$$A = \frac{V_1 \cdot C \cdot (1 - \Delta D_0 / \Delta D_k)}{V_2 \cdot Y}$$

активность по формуле где А - антилизозимная активность, мкг

инактивированного лизоцима /мл супернатанта • ед. оптической плотности бульонной культуры; V₁- объем раствора лизоцима исходной концентрации; V₂- объем супернатанта бульонной культуры исследуемого штамма; С - исходная концентрация лизоцима; Y - оптическая плотность бульонной культуры исследуемого штамма, ед. оптической

плотности; ΔD₀ - изменение оптической плотности суспензии тест-культуры в опыте между 30 и 150 с; ΔD_к - изменение оптической плотности суспензии тест-культуры в контроле между 30 и 150 с.

1.3 Лабораторная работа № 3 (2 часа)

Тема: «Микроорганизмы атмосферного воздуха. Санитарно-микробиологическая оценка воздуха».

1.3.1 Цель работы: познакомить студентов со спектром микроорганизмов, обнаруживаемых в воздухе и санитарно-микробиологической оценкой воздуха.

1.3.2 Задачи работы:

1. Дать представления о микробной обсемененности воздуха.
2. Оценить санитарно-микробиологическое состояние воздуха аспирационным методом.

1.3.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Прибор для подсчета колоний, аппарат Кротова, световые микроскопы бинокулярные XSP-103P.
2. Чашки Петри с МПА, чашки Петри с кровяным МПА.
3. Наборы для окраски по Граму, стекла, физиологический раствор, спиртовые

горелки, бактериологические петли, предметные стекла.

1.3.4 Описание работы

Вместе с пылью в воздухе содержатся разнообразные микроорганизмы. Последние находятся на пылинках (твердые аэрозоли) или включены в капельки (жидкие аэрозоли) и вместе с ними удерживаются в воздухе, оседают вниз на поверхность предметов, переносятся воздушными течениями на значительные расстояния. Вне субстрата свободных, взвешенных в воздухе микроорганизмов сравнительно мало (преимущественно споры грибов). Между количеством пыли и количеством микроорганизмов воздуха имеется прямая связь и зависимость.

Количество микроорганизмов в атмосферном воздухе различно — от нескольких сотен до нескольких десятков и сотен тысяч в 1 м³. Однако воздух представляет неблагоприятную среду для развития попавших в него микроорганизмов. Значительная часть их погибает вследствие высыхания, действия прямых солнечных лучей и отсутствия в воздухе питательных веществ. В воздухе находится больше микроорганизмов весной и летом, чем осенью и зимой. Сильные ветры способствуют увеличению пыли и микроорганизмов. Атмосферные осадки, наоборот, вымывают их из воздуха.

Микрофлора воздуха по видовому составу не отличается от представителей почвенной, кормовой и водной микрофлоры. Среди микроорганизмов, выделяющихся из воздуха, преобладают спорогенные и пигментные виды, а также споры плесеней и дрожжей. В атмосферном воздухе отмечают около 100 видов микроорганизмов, главным образом непатогенных, отличающихся высокой устойчивостью к высыханию, ультрафиолетовым лучам и другим неблагоприятным условиям внешней среды. Патогенные и условно патогенные бактерии встречаются довольно редко. Воздух — среда, не поддерживающая размножение микроорганизмов; это определяется отсутствием питательных веществ и недостатком влаги. Кроме того, в воздухе более выражено микробицидное действие солнечных лучей УФ-спектра. Жизнеспособность микроорганизмов в воздухе обеспечивают взвешенные частицы воды, слизи, пыли и фрагментов почвы. Атмосферный воздух и воздух закрытых помещений значительно различаются по количественному и качественному составу микрофлоры. Бактериальная обсемененность жилых помещений всегда выше, чем атмосферного воздуха; это справедливо и в отношении патогенных микроорганизмов, попадающих в воздух от больных людей, животных и бактерионосителей.

Микрофлору воздуха условно разделяют на резидентную (постоянно обнаруживаемую) и временную (обнаруживают спорадически). Наибольшее количество микробов содержится в приземных слоях атмосферы. По мере удаления от земной поверхности воздух становится чище. Постоянная микрофлора атмосферного воздуха формируется почвенными микроорганизмами. Более или менее регулярно в её состав входят *Micrococcus roseus*, *M. flavus*, *M. candidum*, *Sarcina lutea*, *S. alba*, *S. rosea*, *Bacillus subtilis*, *B. mycoides*, *B. mesentericus*, виды *Actinomyces*, грибы родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* и др. Временная микрофлора атмосферного воздуха также формируется за счёт микроорганизмов почвы и видов, поступающих с поверхности водоёмов. Находящиеся в атмосферном воздухе микроорганизмы подвергаются солнечному и температурному воздействию, атмосферным осадкам и ветру. Поэтому микрофлора воздуха весьма динамична, непрерывно меняется и обновляется.

Контаминация воздуха патогенными микроорганизмами происходит капельным путём; микробы содержатся в составе аэрозоля, образующегося при разговоре, кашле, чихании. Кроме того, микроорганизмы попадают в воздух со слущивающимся эпителием кожных покровов, пылью из загрязнённого постельного белья и заражённой почвы. Аэрозоль — коллоидная система, состоящая из воздуха, капелек жидкости или твёрдых частиц, и включающая различные микроорганизмы. Размер аэрозольных частиц варьирует от 10 до 2000 нм. При чихании может образовываться до 40 000 капель. В зависимости от размера частиц, электрического заряда, скорости движения в воздухе различают

капельную и пылевую фазы аэрозоля, а также капельные ядрышки. Капельная фаза представлена мелкими каплями, длительно сохраняющимися в воздухе, но испаряющимися до оседания. Пылевая фаза — крупные, быстро оседающие частицы, в результате, образующие пыль, способную подниматься в воздух. Капельные ядрышки — мелкие капельки аэрозоля (до 100 нм); высыхая, остаются в воздухе во взвешенном состоянии и образуют устойчивую аэродисперсную систему. В них частично сохраняется влага, поддерживающая жизнеспособность микроорганизмов. Последние в составе капельных ядрышек могут переноситься на значительные расстояния.

Санитарную оценку воздуха осуществляют по двум показателям: 1) определение микробного числа воздуха; 2) определение количества санитарно-показательных бактерий — гемолитических стрептококков и стафилококков. Количественные микробиологические методы исследования воздуха основаны на принципах осаждения (седиментации), аспирации или фильтрации.

Седиментационный метод осаждения Коха. Чашки Петри с МПА оставляют открытыми на 5...10 мин. Для определения санитарно-показательных бактерий берут чашки Петри с кровяным МПА и время экспозиции увеличивают до 40 мин. Чашки выдерживают при 37°C и комнатной температуре 24 ч и подсчитывают выросшие колонии. Микробное число воздуха (общее количество бактерий в 1 м³) определяют по формуле Омелянского

$$X = a * 100 * 1000 * 5 / (b * 10 * T),$$

Аспирационный метод. Более точный количественный способ определения микробного числа воздуха, так как посев микроорганизмов из воздуха производят с помощью приборов. При использовании аппарата Кротова воздух с заданной скоростью засасывается через щель плексигласовой пластины и ударяется о поверхность питательной среды открытой чашки Петри, находящейся на вращающейся подставке, благодаря чему происходит равномерный посев бактерий из воздуха на поверхность МПА (при определении микробного числа) или кровяного МПА (при выделении гемолитических стафилококков и стрептококков). После инкубации в термостате в течение двух суток подсчитывают количество выросших колоний и определяют микробное число воздуха. При исследовании воздуха могут быть использованы и другие приборы (Дьякова, Киктенко, ПАБ-1 — прибор аэрозольный бактериологический и ПОВ-1 — прибор для отбора воздуха). В практику входят ускоренные методы индикации микрофлоры воздуха с помощью мембранных фильтров, каскадных импакторов, фильтров Петрякова и др.

1.4 Лабораторная работа № 4 (2 часа)

Тема: «Микроорганизмы почвы. Санитарно-микробиологическая оценка почвы»

1.4.1 Цель работы: познакомить студентов с микробным пейзажем почвы и санитарно-микробиологической оценкой почвы.

1.4.2 Задачи работы:

1. Дать представления о микробном пейзаже почвы.
2. Познакомить студентов с этапами санитарно-микробиологической оценки почвы.

1.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Световые микроскопы бинокулярные XSP-103P.
2. Колбы с пробами воды, бактериологические пробирки с 9 мл воды, пробирки с 10 мл расплавленного агара, мерные стерильные пипетки на 2 мл, стерильные чашки Петри, чашки Петри с МПА, навески почвы, стерильная водопроводная вода в колбе — 270 мл, пробирки со средой Кесслера, Вильсона—Блера.
3. Наборы для окраски по Граму, стекла, физиологический раствор, спиртовые горелки, бактериологические петли, предметные стекла, стерильные совки.

1.4.4 Описание работы

Почва состоит из минеральных и органических соединений. Она – продукт жизнедеятельности микроорганизмов, осуществляющих процесс её формирования, самоочищения, круговорота азота, углерода, серы и железа в природе. Микроорганизмы почвы фиксируют азот из воздуха (около 100 млн т ежегодно), образуют гумус почвы и высвобождают питательные вещества для растений, выполняют санитарную функцию почвы. Очаговость распространения микроорганизмов – главная особенность их экологии в почве, позволяющая сохранить виды почвенных микроорганизмов и специфичность группировок по горизонтам почвы. В верхних слоях обитают актиномицеты и аэробы. В нижних – грибы и анаэробы. Общее количество микроорганизмов уменьшается по мере углубления в почву. Независимо от глубины наиболее густо всегда заселена околокорневая (ризосферная) зона растений (от греч. *rhiza* – одежда). Качественный состав околокорневой микрофлоры зависит от вида растений, но во всех случаях преобладает грибная флора. Количество микроорганизмов околокорневой зоны в тысячи раз превышает микробное число не занятой растениями почвы. Этот факт используется при обезвреживании почвы, обсемененной патогенными бактериями. Микрофлора почвы включает все известные группы микроорганизмов: споровые и споронеобразующие бактерии, актиномицеты, грибы, спирохеты, архебактерии, простейшие, сине-зеленые водоросли, микоплазмы и вирусы. В 1 г почвы насчитывается до 6 млрд микробных тел. На качественный и количественный состав микрофлоры почвы влияет тип почвы, её плодородие, влажность, аэрация и физико – химические свойства. На микробиоценоз почвы существенно влияет деятельность человека: обработка почвы, внесение удобрений, мелиорация, загрязнение отходами производств. Особо опасным в санитарном отношении является загрязнение почвы необезвреженными отходами животноводства (навоз, моча, отходы боенского производства, трупы животных). Самоочищающая способность почвы ограничена, а методы обеззараживания почвы громоздки и малоэффективны (например, 5 кг хлорной извести на 1 м кв почвы). Некоторые патогенные микроорганизмы в зависимости от экологических особенностей вегетируют в почве, и почва для них является естественным местом обитания. Другая группа, в том числе и споронеобразующие, длительно сохраняются в почве определенного физико – химического состава, где при благоприятном температурно – влажностном режиме размножается. К третьей группе относятся возбудители хламидиозов, риккетсии, вирусы и особо прихотливые бактерии. Они быстро отмирают в почве. Обеззараживающая способность разных почв неодинакова и подчас почва может служить благоприятным субстратом для патогенных микроорганизмов. Почва как субстрат, состоящий из твердой фазы и воды, служит естественным местом обитания для возбудителей многих заразных болезней: клостридиозов, сибирской язвы, псевдотуберкулеза, листериоза, лептоспироза, эризипелоида, туберкулеза, мелиоидоза, синегнойной инфекции, дерматомикозов, микотоксикозов, холеры, иерсиниоза, сальмонеллеза.

Санитарно-микробиологическое исследование почвы. Анализ почвы включает в себя определение микробного числа, коли-титра, перфрингенс-титра и титра термофильных бактерий. Предварительно делают отбор проб почвы. На обследуемой территории площадью до 1000 м² выделяют два участка по 25 м² (один — вблизи источника загрязнения, другой — в отдалении от него), берут пробы из 5 точек (4 — по углам участка, 1 — в центре) на глубине 10...20 см стерильным совком (из более глубоких мест - с помощью специального бура Некрасова или Френкеля). Пробы почвы по 200...300 г отбирают в широкогорлые стеклянные банки с ватными пробками (можно все взятые с одного участка пробы перемешать и на исследование направить 1 кг). На банки наклеивают этикетки, отправляют с нарядным и сопроводительным письмом. Пробы почвы полагается исследовать сразу же или в течение 6... 18 ч, сохраняя их при

температуре не выше 1...5°C. В лаборатории почву измельчают, просеивают через сито, тщательно перемешивают и отвешивают 30 г. В колбу на 500 мл наливают 270 мл стерильной водопроводной воды и вносят в нее отвешенную пробу почвы, все интенсивно встряхивают 10 мин, не давая отстояться частицам суспензии, готовят серию десятикратных последовательных разведений. Для относительно чистых почв достаточно 4 степени разведения, для загрязненных — 6...9 разведений. В штатив ставят нумерованные пробирки с 9 мл стерильной воды в каждой. В первую вносят 1 мл суспензии пробы почвы, смешивают, затем 1 мл из первой пробирки вносят во вторую, смешивают, из нее — 1 мл в третью и т. д. В результате в пробирке № 1 получается разведение 1:100, № 2 - 1:1000 и т.д. Подготовленные таким образом пробы почвы исследуют.

Определение общего микробного числа. Из последних 3...4 пробирок с разведенной суспензией отдельными стерильными пипетками вносят по 1 мл в стерильные чашки Петри (каждое разведение в отдельности). В каждую чашку добавляют еще по 10... 15 мл расплавленного и охлажденного до 45°C МПА. Равномерными осторожными круговыми движениями содержимое чашек перемешивают, оставляют на столе для уплотнения (затвердения) агара. С застывшей средой чашки переворачивают вверх дном, надписывают и помещают в термостат для культивирования на 24...48 ч при 37 °С. Выросшие колонии подсчитывают в каждой чашке, умножают на степень разведения, полученные числа суммируют и вычисляют среднеарифметическое число, что составит количество микробов, содержащихся в 1 г почвы.

1.5 Лабораторная работа № 5 (2 часа)

Тема: «Микрофлора тела животных и человека. Определение микробной обсемененности кожи человека»

1.5.1 Цель работы: познакомить студентов со спектром микроорганизмов, обитающих в теле животных и человека и методикой определения микробной обсемененности кожи.

1.5.2 Задачи работы:

1. Знакомство со спектром микроорганизмов, обитающих в организме животных и человека
2. Определение микробной обсемененности кожи человека.

1.5.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Стерильные квачи, пробирки со стерильным физиологическим раствором.
2. Чашки Петри с МПА, ЖСА, кровяным агаром.
3. Набор красок для окраски по Циллю-Нильсену, световые микроскопы бинкулярные XSP-103P, спиртовые горелки, предметные стекла, бактериологические петли.

1.5.4 Описание работы

Микрофлора кожи человека. На кожных покровах микроорганизмы подвержены действию бактерицидных факторов сального секрета, повышающих кислотность (соответственно значение pH снижается). В подобных условиях живут преимущественно *Staphylococcus epidermidis*, микрококки, сардины, аэробные и анаэробные дифтероиды. Другие виды — *Staphylococcus aureus*, а-гемолитические и негемолитические стрептококки — правильнее рассматривать как транзиторные. Основные зоны колонизации — эпидермис (особенно роговой слой), кожные железы (сальные и потовые) и верхние отделы волосяных фолликулов. Микрофлора волосяного покрова идентична микрофлоре кожи. Первичная колонизация кожных покровов плода происходит при родах, но эта микрофлора (фактически флора родовых путей матери) в течение недели замещается вышеуказанными бактериями. Обычно на 1 см² выявляют 10³— 10⁴

микроорганизмов; на участках с повышенной влажностью их число может достигать 10^6 . Соблюдение элементарных правил гигиены может уменьшить число бактерий на 90%.

Микрофлора верхних дыхательных путей представлена стрептококками, дифтероидами, моракселлами, псевдомонадами. Основная масса микрофлоры рото- и носоглотки приходится на долю зеленеющего стрептококка (до 99% всех микроорганизмов). Постоянно, но в меньшем количестве, встречаются нейссерии, коринебактерии (дифтероиды) и стафилококки. На состав микрофлоры оказывают влияние бактерицидные вещества слюны (лизоцим, ингибин), фагоцитарная активность лейкоцитов, адсорбционные свойства слизи и ресничек эпителиальных клеток. При спокойном дыхании человек с каждым вдохом поглощает от 1 500 до 14 000 и более микробных клеток, но все они задерживаются в верхних отделах дыхательных путей (это было доказано исследованиями плеврального воздуха при естественном пневмотораксе). Слизистая оболочка гортани, трахеи, бронхов и альвеолы здорового человека не содержат микроорганизмов.

Желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) человека – место обитания сообщества более 400 видов патогенных и непатогенных бактерий. Но количество бактерий в разных отделах желудочно-кишечного тракта неодинаково. Микрофлора пищевода и желудка у здорового человека не бывает стабильной и постоянной, поскольку тесным образом связана с характером принимаемой пищи. Пищевод вообще не имеет постоянной микрофлоры, а присутствующие бактерии представляют микробный мир полости рта. Микробный спектр желудка беден. Высоко бактерицидный желудочный сок остается практически стерильным, так как микрофлора, попадающая в желудок в составе пищевого комка, погибает в течение 30 мин. По мере продвижения содержимого внутри кишечной трубки увеличивается плотность бактерий, при этом наблюдается достоверное увеличение количества анаэробных бактерий с одновременным уменьшением числа аэробных бактерий. Два различающихся по анатомо-физиологическим и экологическим характеристикам биотопа, какими является тонкая и толстая кишка, отделяет эффективно функционирующий барьер – баугиниевая заслонка, которая открывается и закрывается наподобие привратника, пропускает содержимое кишечника только в одном направлении и удерживает обсемененность кишечной трубки в количествах, необходимых здоровому организму. Факторы, способствующие избыточному росту микрофлоры тонкой кишки: повреждение баугиниевой заслонки, наличие свища между толстой и тонкой кишкой, хирургические операции на кишечнике, применение ингибиторов протонной помпы или блокаторов H_2 -рецепторов гистамина в высоких дозах и длительно, атрофический гастрит, дивертикулиты тонкой кишки, кишечная непроходимость, нарушения моторики кишки. Высокая степень микробной обсемененности наблюдается в толстой кишке. В основном, это бифидобактерии и бактероиды, на долю которых приходится 90% всех микроорганизмов. Остальные 10% составляют: кишечная палочка, лактобактерии, энтеробактерии, стрептококки и др. Плотность бактерий в различных отделах желудочно-кишечного тракта составляет: 1) желудок – менее 1000 в мл; 2) тощая кишка – менее 10 000 в мл; 3) подвздошная кишка – менее 100 000 в мл; 4) ободочная кишка – менее 1 триллиона в мл. В 1 г содержимого толстой кишки можно обнаружить представителей 17 различных семейств, 45 родов и больше 400 видов микроорганизмов. Несмотря на сходство преобладающих в толстой кишке бактерий, для каждого здорового человека характерен индивидуальный тип микрофлоры кишечника, и понятие нормы в микроэкологии человека весьма относительно. В микрофлоре желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) различают пристеночную и просветную флору. Состав их различен. Пристеночная флора более стабильна и представлена главным образом бифидобактериями и лактобактериями, которые обуславливают защиту кишки от колонизации патогенными бактериями. Просветная флора наряду с бифидо- и лактобактериями включает и других постоянных обитателей кишечника.

Нормальная микрофлора здорового человека выступает как единое целое, согласованно работающее в интересах всей системы организма хозяина, в котором она локализована. Нормальная микрофлора является чутким индикатором физиологического состояния организма человека при воздействии на него различных факторов.

Функции микрофлоры кишечника

- Заселив слизистую оболочку кишечника, нормальная микрофлора не допускает на свою территорию патогенные и условно-патогенные бактерии. Иными словами, она защищает человека от возможных кишечных инфекций.
- Микрофлора толстой кишки заканчивает переваривание пищи, способствуя поступлению питательных веществ в кровь, кроме того, она влияет и на моторную функцию кишечника.
- Микрофлора синтезирует витамины группы В, витамин К, усиливает активность ферментов.
- Микрофлора поддерживает высокие уровни лизоцима, иммуноглобулина, интерферона и другие компоненты иммунной системы.
- Микрофлора способствует детоксикации организма за счет деградации и выведения эндогенных и экзогенных токсичных субстанций.
- Микрофлора обладает антиканцерогенной и антимутагенной активностью.

Аутомикрофлора, рассматриваемая в качестве специфичного дополнительного жизненно важного органа, функционирует как единая экологическая система на основе взаимовыгодных симбиотических отношений между хозяином и его микробиотой. Состояние равновесия между организмом хозяина, микроорганизмами, его заселяющими, и окружающей средой носит название эубиоз.

Микрофлора мочеполового тракта менее обильна, но по видовому составу разнообразна и представлена стафилококками, дифтероидами, стрептококками, микобактериями, бактероидами, фузобактериями. В наружных отделах половых органов и мочевыводящих путей чаще всего обнаруживаются микобактерии смегмы и фузобактерии. Во влагалище здоровых женщин преобладают молочнокислые палочки Додерлейна и дифтероиды, значительно реже встречаются стрептококки, стафилококки, пептострептококки, клостридии и грамотрицательные палочки. Число бактерий в мочеполовом тракте значительно уменьшается по мере удаления от его наружных отделов. Полость матки, фаллопиевы трубы и мочевой пузырь здоровых людей обычно микробов не содержат. На состав микрофлоры мочеполового тракта оказывают влияние бактерицидные свойства секретов половых путей, а у женщин — высокая кислотность влагалищного секрета (рН 4,0—4,6), которая регулируется молочнокислой палочкой Додерлейна (разные виды рода *Lactobacillus*).

Видовой состав и количественная характеристика микрофлоры важнейших областей тела животного. С организмом животного ассоциированы десятки и сотни видов различных микроорганизмов. Они являются облигатными для организма в целом. Многие виды микроорганизмов встречаются во многих областях тела, изменяясь лишь количественно.

Микрофлору желудочно-кишечного тракта принято делить на облигатную (молочнокислые бактерии, *E. coli*, энтерококки, *Cl. perfringens*, *Cl. sporogenes* и др.), которая адаптировалась к условиям этой среды и стала постоянным ее обитателем, и факультативную, изменяющуюся в зависимости от вида корма и воды. В настоящее время установлено, что на долю строго анаэробных видов в кишечнике приходится 95—99%, а все аэробные и факультативно анаэробные виды составляют оставшиеся 1—5%. Микрофлора желудочно-кишечного тракта. Наиболее активно микроорганизмы заселяют желудочно-кишечный тракт из-за обилия и разнообразия в нем питательных веществ. Преобладают в нем анаэробные микроорганизмы. Характер взаимоотношений этих

микроорганизмов с хозяином может быть различным и в первую очередь зависит от особенностей его рациона. Меньше всего микроорганизмов содержится в желудке из-за высокой кислотности желудочного сока, в основном это кислотоустойчивая микрофлора - лактобактерии, стрептококки, дрожжи и т. д.

Рубец. Его анатомическое строение и условия почти идеально отвечают требованиям для жизнедеятельности микроорганизмов. В среднем, по данным различных авторов, количество бактерий составляет $10^9 - 10^{10}$ клеток в 1 г рубцового содержимого.

Помимо бактерий, в рубце осуществляют расщепление кормов и синтез важных органических соединений для животного организма также различные виды дрожжей, актиномицетов и простейших. Представляют наиболее важное в функциональном отношении значение следующие виды бактерий: *Bacteroides succinogenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus flavefaciens*, *R. aibus*, *Cillobacterium cellulosolvens*, *Clostridium cellobioparus*, *Clostridium locheadi* и др. Основными продуктами сбраживания клетчатки и других углеводов являются масляная кислота, углекислота и водород. В превращении крахмала принимают участие многие виды рубцовых бактерий, в том числе и целлюлозолитические. Из рубца выделены: *Bact. amylophilus*, *Bact. ruminicola* и др. в расщеплении крахмала большое участие принимают так же определенные виды инфузорий. Основными продуктами брожения являются уксусная кислота, янтарная, муравьиная кислоты, углекислый газ и в некоторых случаях сероводород. Из-за наличия в рубце анаэробных условий углеводы в клетках рубцовых микроорганизмов окисляются не полностью, конечными продуктами брожения являются органические кислоты, углекислота, этанол, водород, метан. Часть продуктов гликолиза (молочная, янтарная, валериановая кислоты и некоторые другие вещества) используется самими бактериями в качестве источника энергии и для синтеза клеточных соединений. Конечные продукты углеводного обмена в рубце жвачных – летучие жирные кислоты – используются в обмене веществ животного-хозяина.

В состав кишечной микрофлоры различных животных входит ряд видов бактерий, способных разрушать целлюлозу, гемицеллюлозы, пектины. У многих млекопитающих в кишечнике обитают представители родов *Bacteroides* и *Ruminococcus*. *R. albus* и *R. flavefaciens*, активно разрушающие клетчатку, обитают в кишечнике лошадей, коров, кроликов. К сбраживающим клетчатку кишечным бактериям относятся также *Butyrivibrio fibrisolvens* и *Eubacterium cellulosolvens*. Роды *Bacteroides* и *Eubacterium* представлены в кишечнике млекопитающих рядом видов, некоторые из которых разрушают также белковые субстраты.

Толстый отдел кишечника наиболее богат микроорганизмами. Основные обитатели его – энтеробактерии, энтерококки, термофилы, ацидофилы, споровые бактерии, актиномицеты, дрожжи, плесени, большое количество гнилостных и некоторых патогенных анаэробов (*Cl. sporogenes*, *Cl. putrificus*, *Cl. perfringens*, *Cl. tetani*, *F. necrophorum*). В 1 г экскрементов травоядных может содержаться до 3,5 млрд. различных микроорганизмов. Микробная масса составляет около 40% сухого вещества испражнений. В толстом отделе кишечника протекают сложные микробиологические процессы, связанные с расщеплением клетчатки, пектиновых веществ, крахмала.

Микрофлора кожи. Микроорганизмы заселяют в основном участки кожи, покрытые волосами и увлажненные потом. На участках кожи, покрытых волосами, находится около $1,5 \cdot 10^6$ клеток/см. Основные представители микрофлоры кожи: стафилококки (в первую очередь преобладает *S. epidermidis*, но на здоровой коже в небольшом количестве присутствует и *S. aureus*); коринебактерии (могут составлять до 70 % от всей микрофлоры кожи); пропионовые бактерии; плесневые грибы; дрожжи; бациллы.

Микрофлора респираторного тракта. На слизистых оболочках респираторного тракта больше всего микроорганизмов в области носоглотки, за гортанью количество их значительно меньше, еще меньше в крупных бронхах, а в глубине легких здорового организма микрофлоры вообще нет. В носовых ходах есть дифтероиды (коринебактерии),

постоянны стафилококки (*S. epidermidis*), гемофильные бактерии, стрептококки (альфа-гемолитические); в носоглотке — коринебактерии, стрептококки (*S. salivarius* и др.), стафилококки, нейссерии, гемофильные бактерии, реже встречаются энтеробактерии, бактероиды, грибы, энтерококки, лактобактерии, синегнойная палочка, *B. subtilis* и др.

Микрофлора родовых путей млекопитающих. Микрофлора, заселяющая слизистые оболочки родовых путей, разнообразна и богата в видовом отношении. Широко представлены компоненты нормальной микрофлоры, в ее составе много строго анаэробных микроорганизмов. На долю бактероидов приходится $\approx 17\%$, бифидобактерий - до 80%, пептококков и пептострептококков - до 20%, клостридии - до 1%. Основной обитатель влагалища — *B. vaginale vulgare*, обладающая выраженным антогонизмом к другим микробам. У здоровой самки плод в матке стерилен до момента начавшихся родов. Микрофлора родовых путей матери аналогична с основным группам микроорганизмов тела новорожденного, то есть облигатных представителей своей нормальной микрофлоры животное получает при прохождении через родовые пути матери.

Определение микробной обсемененности кожи осуществляют с помощью стерильного квача, которым делается смыв с определенного участка кожи и посев на питательные среды.

1.6-7 Лабораторная работа № 6-7 (2 часа)

Тема: «Микроорганизмы – паразиты животных, человека и растений. Возбудители наиболее распространенных бактериальных заболеваний человека и животных»

1.6-7.1 Цель работы: рассмотреть возбудителей наиболее распространенных инфекционных заболеваний животных и человека.

1.6-7.2 Задачи работы:

1. Рассмотреть биологические свойства возбудителей наиболее распространённых инфекционных заболеваний человека и животных.
2. Рассмотреть основные этапы лабораторной диагностики таких заболеваний.

1.7.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Готовые микроскопические препараты возбудителей инфекционных заболеваний.
2. Световые микроскопы бинокулярные XSP-103P.
3. Табличный материал.

1.7.4 Описание работы

Листерия (Listeriosis) - инфекционная болезнь животных и человека, характеризующаяся у животных поражением нервной системы, септическими явлениями, абортами и маститами. Возбудитель листериоза - *Listeria monocytogenes*. Материал для исследования: при жизни: молоко, абортёрванный плод, плодные оболочки; посмертно - труп целиком, лимфатические узлы, паренхиматозные органы, головной мозг. Микроскопия (методы окраски по Граму). Микрокартина: тонкие, прямые или слегка изогнутые палочки до 1,5 мкм, грамположительные; спор и капсулу не образуют; подвижны (культивирование при 20...22 градусах). Культивирование. Посев на питательные среды: МПА, МПБ, печеночный бульон, на кровяной МПА, МПА с теллуридом калия и полимиксином, среды, содержащие 10% хлорида натрия. Особенности выделения возбудителя: факультативные анаэробы; оптимальная температура 37°C; срок культивирования 18-20 часов – до 48 часов. Культуральные свойства: на МПА – мелкие, розинчатые, прозрачные колонии, на МПБ – легкое помутнение с образованием через 5-7 суток слизистого осадка.

Биохимические свойства: обладают сахаролитическими свойствами (расщепляют салицин, мальтозу, лактозу, трегалозу); не образуют сероводород, образует каталазу, обладает редуцирующими свойствами.

Биопроба: заражают белых мышей, морских свинок, кроликов.

Серологический метод: РА, РИФ, РСК, ИФА.

Биопрепараты. Сухая вакцина против листериоза с/х животных из штамма АУФ, листериозная сыворотка

Туберкулез - инфекционная, хронически протекающая болезнь человека, животных, в том числе птиц. Патологоанатомически характеризуется образованием в различных органах и тканях туберкулов. Возбудители туберкулеза относятся к роду *Mycobacterium* (лат. *mycos* - гриб, *bacterium* - палочка) включает в себя 49 видов как патогенных, так и непатогенных. К патогенным относят микобактерии, вызывающие туберкулез у людей (*M. tuberculosis*), животных (*M. bovis*), птиц (*M. avium*)

Материал для исследования: молоко, моча, слизь, пораженные органы и ткани.

Обсемененность патологического материала часто незначительная, поэтому материал предварительно обрабатывают по следующей методике: кусочки органов и тканей измельчают, заливают 3...10%-м раствором серной кислоты в соотношении 1 : 4, пробу центрифугируют при 3000 об/мин 10... 15 мин. Осадок суспендируют в небольшом количестве физиологического раствора и используют для посевов и приготовления мазков для микроскопии.

Микроскопия. Микобактерий — прямые или слегка изогнутые палочковидные клетки размером (0,2...0,6) x (1...10) мкм, без спор, капсул и жгутиков; грам-положительные, кислото- и спиртоустойчивые. Кислотоустойчивость связана с присутствием в клеточной стенке липидов и миколовой кислоты (до 60 %), в связи с чем, бактерии туберкулеза (и паратуберкулеза) плохо воспринимают окраску. Для окрашивания микобактерий применяют специальные методы, самый распространенный — метод Циля—Нильсена. По Цилю—Нильсену микобактерий окрашиваются в ярко-красный цвет, все остальные микроорганизмы — в синий. Более результативна люминесцентная микроскопия (окраска аурамин-родамином), благодаря которой выявляют даже незначительное количество микобактерий, которые окрашены в бело-желтый цвет.

Культивирование. Микобактерии — аэробы, температурный оптимум 37...38 °С, pH 6,4...7. Растут медленно. Для культивирования микобактерий туберкулеза используют сложные питательные среды, содержащие глицерин, картофель, яйца, витамины, аспарагиновая кислота, альбумин, глюкоза, биотин, никотиновая кислота, соли аммония и др. Наиболее часто применяют среды: Петраньяни, Левенштейна—Иенсена, Гельберга, Моделя, Сотона, при внутрилабораторных пересевах — глицериновый картофель и глицериновый МПБ. Рост микобактерий бычьего вида на плотных средах чаще обнаруживают на 20...60-е сутки, человеческого вида — на 14...40-е сутки, птичьего — на 10...20-е сутки. *M. bovis* на плотных питательных средах формирует мелкие гладкие шаровидные колонии цвета слоновой кости, иногда с морщинистым сероватым налетом. На жидких средах образует пленку на поверхности сначала в виде единичных островков, позднее — сливающихся в сплошную пленку.

M. tuberculosis на плотных питательных средах дает рост в виде сухого морщинистого налета кремового цвета. У колоний приподнятый центр, они крошковидные, с приятным запахом, по виду напоминают цветную капусту, плохо смачиваются водой. На жидких средах рост наблюдают на 5...7-е сутки в виде сухой морщинистой пленки, поднимающейся на края пробирок, среда остается прозрачной. На жидких средах и при внутриклеточном развитии образуется корд-фактор (трегалоза-6,6-дипиколат), способствующий сближению бактериальных клеток в микроколониях и их расположению в виде серпантинообразных кос, что можно наблюдать при микроскопическом исследовании.

M. avium на плотных яичных средах растет в виде гладкого маслянистого налета. Колонии округлые, слизистые, мягкие, серовато-белые, с возрастом желтеют, иногда образуют возвышение в виде пуговицы с кратерообразным углублением. При первичной изоляции из патологического материала колонии плоские и полупрозрачные. В жидких питательных средах возбудитель дает диффузный рост с формированием влажной жирной пленки и образованием рыхлого осадка

Биохимические свойства: тесты для биохимической дифференциации микобактерий: нитратный тест, реакция восстановления нитратов, амидазная проба, каталазная и арилсульфатазная активность, рост на среде с салицилатом натрия, разрушение салицилата натрия, ПАСК, использование нитрата как единственного источника азота, устойчивость к 5 %-ному хлориду натрия, пикриновой кислоте, сахаролитическая активность, гидролиз твина-80 и др.

Биопроба. Для этого используют двух кроликов массой не менее 1,5-2 кг которым в краевую вену уха вводят суспензию культуры микобактерий на физиологическом растворе. Первому вводят 0,1; второму - 0,01 мг бактериальной массы. *Mycobacterium bovis* на протяжении 3 мес вызывает генерализованное поражение бугорковой формы. При заражении *Mycobacterium tuberculosis* за этот же период возникают нетипичные туберкулезные очажки регрессивного характера. *Mycobacterium avium* вызывает у кроликов септическую форму болезни без образования специфических патологоанатомических изменений с летальным исходом в течение 2-3 нед. Заражение двух морских свинок такими же дозами культуры позволяет дифференцировать *Mycobacterium avium*, к которым они нечувствительны, от *Mycobacterium tuberculosis* и *Mycobacterium bovis*, которые вызывают у них прогрессивные туберкулезные изменения. У кур, зараженных внутривенно дозой в 1 мг бактериальной массы, *Mycobacterium avium* вызывает туберкулезные поражения селезенки, печени и кишечника. Куры к *Mycobacterium tuberculosis* и *Mycobacterium bovis* менее чувствительны.

Серологическая диагностика. Используют реакцию связывания комплемента (РСК) с антигенами УНИИЭВ и СибНИВИ; реакцию пассивной, или непрямой, гемагглютинации (РПГА); реакцию кольцепреципитации; реакцию диффузной преципитации в геле (РПГ).

Аллергическая диагностика. Применяют сухой очищенный туберкулин (протеин-пурифицированный-дериват - ППД). В ветеринарии используют стандартизированный сухой очищенный туберкулин для млекопитающих и сухой очищенный туберкулин (ППД) для птиц, который применяют для диагностики у птиц и свиней.

Биопрепараты. В медицине для профилактики тяжелых форм туберкулеза используется вакцина БЦЖ, в ветеринарной практике от вакцины БЦЖ отказались.

Сибирская язва (Anthrax) - зооантропоноз. К ней восприимчивы животные многих видов, особенно травоядные, и человек. Болезнь протекает преимущественно остро с явлениями септицемии или с образованием различной величины карбункулов. Регистрируют в виде спорадических случаев, возможны энзоотии и эпизоотии. Возбудитель сибирской язвы - *Bacillus anthracis* - относится к семейству *Bacillaceae*. Морфология. *Bacillus anthracis* - неподвижная, грамположительная (в молодых и старых культурах встречаются и грамотрицательные клетки), образующая капсулу (в организме или при культивировании на искусственных питательных средах с большим содержанием нативного белка и CO₂) и спору палочка, размером 1-1,3 x 3,0-10,0 мкм. При температуре ниже 12 и выше 42°C, а также в живом организме или не вскрытом трупе, в крови и сыворотке животных споры не образуются. В окрашенных препаратах из крови и тканей больных или погибших от сибирской язвы животных бактерии располагаются одиночно, попарно и в виде коротких цепочек по 3-4 клетки; концы палочек, обращенных друг к другу, прямые, резко обрубленные, свободные - слегка, закругленные. Иногда цепочки имеют форму бамбуковой трости. В мазках из культур на плотных и жидких питательных средах палочки располагаются длинными цепочками.

Культивирование. *Bacillus anthracis* по способу дыхания относят к факультативным анаэробам, хорошо растет на универсальных средах (МПБ, МПА, МПЖ, картофеле, молоке). Оптимальная температура роста на МПА 35-37°C, в бульоне 32-33°C. При температуре ниже 12 и выше 45°C не растет. Оптимум pH сред 7,2-7,6. На поверхности МПА в аэробных условиях при температуре 37°C 17-24-часовые культуры состоят из серовато-беловатых тонкозернистых с серебристым оттенком, похожих на снежинки колоний, имеющих шероховатый рельеф и характерных для типичных вирулентных штаммов (R-форма). Диаметр колоний не превышает 3-5 мм. На сыроваточном агаре и свернутой лошадиной сыроватке в присутствии 10-50% углекислоты колонии гладкие полупрозрачные (S-форма), а также слизистые (мукоидные), тянущиеся за петлей (M-форма), состоящие из капсульных палочек. В МПБ *Bacillus anthracis* через 16-24 ч на дне пробирки образует рыхлый белый осадок, надосадочная жидкость остается прозрачной, при встряхивании бульон не мутнеет, осадок разбивается на мелкие хлопья (R-форма). При посеве в столбик желатина на 2-5-е сут появляется желтовато-белый стержень. Культура напоминает елочку, перевернутую верхушкой вниз. Постепенно верхний слой желатин начинает разжижаться, принимая сначала форму воронки, затем мешочка. *Bacillus anthracis* при росте в молоке вырабатывает кислоту и через 2-4 дня свертывает его и пептонизирует сгусток.

Биохимические свойства. Ферменты *Bacillus anthracis*: липаза, диастаза, протеаза, желатиназа, дегидраза, цитохромоксидаза, пероксидаза, каталаза, лецитиназа и др. Ферментирует с образованием кислоты без газа глюкозу, мальтозу, сахарозу, трегалозу, фруктозу и декстрин. На средах с глицерином и салицином возможно слабое кислотообразование. Арабинозу, рамнозу, галактозу, маннозу, раффинозу, инулин, маннит, дульцит, сорбит, инозит не сбраживает. Утилизирует цитраты, образует ацетилметилкарбинол (реакция Фогеса - Проскауэра положительная). Выделяет аммиак. Редуцирует метиленовый синий и восстанавливает нитраты в нитриты. Некоторые штаммы образуют сероводород.

Для лабораторного исследования на сибирскую язву направляют ухо павшего животного. Бактериоскопия. Из патологического материала для микроскопии готовят мазки, часть красят по Граму и обязательно на капсулы по Михину и Ольту. Обнаружение типичных по морфологии капсульных палочек является важным диагностическим признаком. Посев на питательные среды. Исходный материал засевают в МПБ и на МПА (pH 7,2-7,6), инкубируют посевы при температуре 37°C в течение 18-24 ч, при отсутствии роста их выдерживают в термостате еще 2 суток.

Биологическая проба. Осуществляется на белых мышах, морских свинках, кроликах, одновременно с посевом материала на питательные среды. Белых мышей заражают подкожно в заднюю часть спины (по 0,1-0,2 мл), морских свинок и кроликов - под кожу в область живота (по 0,5-1,0 мл). Мыши погибают через 1-2 сут, морские свинки и кролики - через 2-4 сут. Павших животных вскрывают, делают мазки и посевы из крови сердца, селезенки, печени и инфильтрата на месте инъекции исследуемого материала.

Идентификация. Возбудителя сибирской язвы следует дифференцировать от сапрофитных бацилл: *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. mycoides* и *B. subtilis* на основе главных и дополнительных признаков. К главным признакам относятся патогенность, капсулообразование, тест «жемчужного ожерелья», лизабельность фагом, иммунофлюоресцентный тест. Дополнительными являются подвижность, отсутствие гемолиза, лецитиназная активность, образование фосфатазы.

Серологическое исследование. Для обнаружения сибиреязвенных антигенов при исследовании кожевенного и мехового сырья, загнившего патологического материала, а также свежего патологического материала и серологической идентификации выделенных культур применяют реакцию преципитации по Асколи. В качестве серологического теста, главным образом для изучения антигенного спектра *Bacillus anthracis*, применяют реакцию диффузионной преципитации (РДП). Используют РИФ, ИФА.

Биопрепараты. Живая вакцина против сибирской язвы из штамма № 55, ассоциированная живая жидкая вакцина против сибирской язвы и эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота, лечебно-профилактическая сибиреязвенная сыворотка

Столбняк. Острое инфекционное заболевание животных и человека, вызываемое токсином микроба *C. tetani*. Характеризуется повышенной возбудимостью и судорожными сокращениями мускулатуры тела, приводящими к асфиксии, развивается в результате попадания спор возбудителя в раны. К возбудителю восприимчивы все виды домашних животных, особенно чувствительны лошади. Болезнь может возникнуть после родовых травм, кастрации, обрезания хвостов или пуповины у новорожденных, если при этих операциях были нарушены правила асептики и антисептики.

Возбудитель столбняка - *C. tetani*, род *Clostridium*.

В лабораторию для исследования направляют кусочки тканей из глубоких слоев раневых поражений, гной, выделения из ран. При генерализации процесса возбудитель можно обнаружить во внутренних органах, поэтому берут от трупа кусочки печени и селезенки массой по 20-30 г и 10 мл крови. При возникновении столбняка вследствие родов или аборта направляют выделения из влагалища и матки, а при подозрении - труп новорожденного животного.

Микроскопия. Микрокартина в мазке, окрашенном по Граму: тонкая палочка с закругленными концами, длиной 4 -8 мкм, шириной 0,4 - 0,6 мкм ; грамположительные, полиморфные; спора на концах бактериальной клетки, придающая ей форму барабанной палочки; капсулу не образуют; подвижны.

Культивирование. Китта-Тароцци, в МПБ, на МПА и глюкозо-кровяной агар в чашках (агар Цейслера). Особенности выделения возбудителя: строгий анаэроб; оптимальная температура 36-38°C; срок культивирования 24-36 часов.

Культуральные свойства. На глюкозо-кровяного агара Цейслера вырастают нежные беловато-серые колонии с отростками и приподнятым центром, иногда в виде мелких круглых, напоминающих капельки росы; на жидких средах – интенсивное равномерное помутнение с незначительным газообразованием в виде единичных пузырьков.

Биохимические свойства: не сбраживает моносахариды и многоатомные спирты; могут ферментировать глюкозу; вызывают медленную ферментацию протеинов и пептонов до аминокислот.

Биопроба: заражают белых мышей и морских свинок. Биопробу проводят для обнаружения токсина в патологическом материале и культуре.

Серологическая диагностика. Применяют реакцию нейтрализации и непрямой гемагглютинации.

Ботулизм - это остро протекающий кормовой токсикоз, возникающий вследствие поедания кормов, содержащих токсин возбудителя. Заболевание проявляется параличом мышц глотки, языка, нижней челюсти и скелетных мышц. К ботулизму восприимчивы многие виды животных, в том числе птицы, а также люди. Из лабораторных животных — белые мыши и морские свинки.

Возбудитель ботулизма — *Clostridium botulinum* - вызывает остропротекающий кормовой токсикоз. Болезнь развивается вследствие воздействия ботулинического токсина на организм, характеризуется поражением центральной нервной системы и сопровождается парезами двигательных мышц.

Материал для исследования: кусочки пораженных мышц, отечный экссудат, кровь, взятые тотчас после гибели животного

Микроскопия. В мазках, окрашенных по Граму наблюдаются палочки с закругленными концами длиной 4-9 и ширине 0,6-0,8 мкм, располагающиеся одиночно или парами;

грамположительные, полиморфные; образуют споры, располагающиеся субтерминально, редко центрально; капсулу не образуют; подвижны.

Культивирование. В среде Китта-Тароцци на глюкозо-кровяном агаре в чашках (агар Цейслера). Особенности выделения возбудителя: строгий анаэроб; оптимальная температура 37°C; срок культивирования 48-74 часа.

Культуральные свойства. На кровяном МПА – колонии крупные с корневидными отростками и зоной гемолиза; на жидких средах – помутнение среды с газообразованием, характерный запах прогорклого масла.

Биопроба: заражают белых мышей и морских свинок, ставится РН.

Сальмонеллезы - группа инфекционных болезней преимущественно молодняка с.х. животных и промысловых животных, характеризующихся при остром течении лихорадкой и профузным поносом, при хроническом – воспалением легких. У взрослых животных болезнь может протекать бессимптомно (сальмонеллоносительство), а у беременных самок возможны аборт. У человека могут возникать пищевые токсикоинфекции при употреблении продуктов, содержащих токсины сальмонелл.

Сем. Enterobacteriaceae Род: Salmonella Виды сальмонелл, имеющих наибольшее значение в патологии животных: S. enteritidis (dublin) - у телят; S. choleraesuis (suipestifer) - у поросят; S. typhimurium - у свиней; S. typhimurium - у водоплавающей птицы; S. abortusequi - аборт кобылы; S. abortusovis - у овец; S. pullorum (S.gallinarum) - у птиц.

Материал для исследования: при жизни – кал, сыворотка крови; посмертно – трупы мелких животных и птиц, паренхиматозные органы, мезентеральные лимфатические узлы, абортирванный плод.

Микроскопия: палочки с закругленными концами до 4 мкм, располагаются одиночно или парно; грамотрицательные; спор не образуют; капсулу не образуют; подвижны (за исключением S.pullorum).

Культивирование: посев на питательные среды: МПА, МПБ, дифференциально-диагностические – Эндо, Левина, висмут-сульфит-агар, накопительные (Кауфмана, Мюллера). Особенности выделения возбудителя: факультативные анаэробы; оптимальная температура 37°C; срок культивирования 18-20 часов.

Культуральные свойства: на МПБ – интенсивное помутнение, образование легко разбивающегося осадка, на МПА – сочные, круглые с ровными краями серо-белого цвета колонии, на среде Эндо – бесцветные или розоватые колонии, на среде Левина – светло-фиолетовые колонии.

После выделения чистой культуры лактозоотрицательных бактерий устанавливают их родовую принадлежность, затем дифференцируют до вида и сероварианта. С этой целью изучают их биохимические свойства и антигенное строение путем постановки пластинчатой реакции агглютинации (серологическая дифференциация).

Биохимические свойства: обладают высокой сахаролитической активностью; для установления родовой принадлежности проводят посевы на короткий «цветной ряд» (среды Гисса) при этом сальмонеллы ферментируют глюкозу и маннит с образованием кислоты и газа, не расщепляют лактозу и сахарозу; дальнейшее изучение для установления видовой принадлежности проводят путем посевов на длинный «цветной ряд», в состав которого входят углеводы, и другие тесты; сальмонеллы не разжижают желатин, образуют сероводород, не образуют индол; дают положительную реакцию с метиловым красным: среда окрашивается в розово-красный цвет, отрицательную реакцию Фогеса-Проскауэра – желтое окрашивание среды.

Биопроба: в необходимых случаях заражают подкожно белых мышей.

Серологический метод. Используют РА с сывороткой крови (кровью) при диагностике паратифозного аборта кобыл, пуллороза у кур; используют РА для дифференциации выделенной культуры сальмонелл с целью определения их вида и сероварианта; у сальмонелл различают соматический термостабильный антиген и жгутиковый термолабильный антиген; культуру сальмонелл предварительно проверяют с групповыми

(поливалентными) сальмонеллезными агглютинирующими сыворотками в РА на стекле. На основе общего для нескольких видов сальмонелл антигена они подразделяются на серологические группы, обозначаемые заглавными буквами латинского алфавита. При положительном результате с групповой сывороткой испытания той же культуры, выросшей на скошенном МПА с отдельными монорецепторными сыворотками, входящими в смесь поливалентной сыворотки. Затем эти же культуры испытывают с монорецепторными сыворотками, 1-й и 2-й фазы, обозначенными цифрами и малыми буквами, используют также РИФ, ИФА.

Бруцеллез (Brucellessis) – хроническая инфекционная болезнь животных и человека. У многих животных проявляется абортами и задержанием последа, орхитами, рождением нежизнеспособного молодняка и бесплодием. В связи с социальной опасностью бруцеллез включен в список карантинных болезней.

Бактерии из рода *Brucella* подразделяют на 6 видов: *Br. abortus* (возбудитель бруцеллеза крупного рогатого скота); *Br. melitensis* (овец и коз; особенно восприимчив человек); *Br. suis* (свиней); *Br. neotomae* (крыс); *Br. ovis* (инфекционного эпидидимита баранов); *Br. canis* (бруцеллез собак).

Лабораторная диагностика бруцеллеза основана на результатах бактериологических и серологических исследований.

Бактериологическое исследование в основном применяют при первичной постановке диагноза на бруцеллез в ранее благополучных хозяйствах.

Материал для исследования. В лабораторию направляют пробы крови (сыворотки) для серологических исследований, абортирванный плод с плодными оболочками, околоплодную жидкость, истечения из родовых путей или желудок плода, кусочки печени, селезенки, пробы молока (последние порции). При убое животных берут паренхиматозные органы, лимфатические узлы, пораженные суставы, у самцов — семенники. Объектом исследования могут быть молочные продукты (брынза, сыр, масло и др.), объекты внешней среды.

Микроскопия. Мазки из материала окрашивают по Граму и одним из специальных методов (по Козловскому, Стампу и др.). Бруцеллы — грамтрицательные короткие палочковидные или кокковидные бактерии размером 0,5... 1,5 мкм, без жгутиков, спор не образуют, формируют микрокапсулу. В окрашенном препарате располагаются одиночно, реже парами, короткими цепочками. Окраска по методу Козловского: препарат окрашивают 2%-м водным раствором сафранина 2 мин, промывают водой, докрасивают 1%-м водным раствором малахитовой зелени 1 мин, промывают водой. Микроскопическая картина: бруцеллы красные, остальные бактерии зеленые. Окраска по методу Стампа: фиксированный на пламени мазок окрашивают фуксином Пфейффера 10 мин, промывают водой, обрабатывают 0,5%-м водным раствором уксусной кислоты 30 с, затем препарат промывают водой и докрасивают 1%-м водным раствором метиленового синего 20...30 с. Микроскопическая картина: бруцеллы красные, другие бактерии синие.

Культивирование. Бруцеллы — аэробы, микроаэрофилы, температурный оптимум 37...38 °С, pH 6,8...7,2. Материал засевают на специальные питательные среды: мясо-пептонный агар и бульон, печеночно-глюкозо-глицериновый агар и бульон, картофельный агар, эритрит-агар, сывороточно-декстрозный агар и др. Печеночные среды включают в себя отвар печени. Картофельный агар готовят на отваре картофеля, глюкозу и глицерин добавляют в среды соответственно в количестве 1 % и 2...3 %. Эритрит-агар содержит вещество (эритрит), стимулирующее рост бруцелл. В состав сывороточно-декстрозного агара помимо обычной питательной основы входит 10 % сыворотки крови и 1 % декстрозы. Некоторые виды бруцелл растут при повышенном содержании в атмосфере оксида углерода (*B. abortus*, *B. ovis*). Так как неизвестно, каким видом бруцелл заражен исследуемый материал, половину посевов инкубируют в обычной атмосфере, другую — в атмосфере, содержащей 10...15% оксида углерода. Посевы культивируют в течение 30 сут,

периодически просматривая. Рост бруцелл чаще появляется на 7... 10-е сутки, иногда позже.

На плотных средах возбудитель формирует мелкие, прозрачные, круглые, с ровными краями, гладкой поверхностью, с голубоватым оттенком колонии (S-форма), возможно появление шероховатых колоний (R-форма). По мере старения колонии мутнеют и за счет пигментообразования могут темнеть. На жидких питательных средах рост бруцелл проявляется равномерным помутнением среды, образованием голубоватого пристеночного кольца, позднее формируется небольшой осадок. У выросших культур изучают морфологию и тинкториальные свойства клеток в мазках, окрашенных по методам Грама, Козловского.

Серотипизация. Культуру идентифицируют серологически в РА на стекле с позитивной бруцеллезной сывороткой, разведенной в соотношении 1:50. Виды *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* антигенно родственны, поэтому их клетки агглютинируют в стандартной бруцеллезной сыворотке. Для идентификации *B. ovis* кроликов иммунизируют выделенной культурой и затем кроличью сыворотку исследуют в РДСК со стандартным овисным антигеном (*B. ovis*) — должна быть четкая положительная реакция, если это культура *B. ovis*.

Для определения видовой принадлежности у выделенных культур бруцелл изучают потребность в оксиде углерода (IV), образование сероводорода, способность к росту на питательных средах с тионином и фуксином, чувствительность к бруцеллезным бактериофагам, ферментацию аминокислот, углеводов, а также агглютинабельность с моноспецифическими сыворотками против отдельных клеточных антигенов бруцелл (A, M, R).

Биопроба. Это эффективный метод обнаружения бруцелл в исследуемом материале, особенно загрязненном. Морских свинок перед заражением исследуют в РА, в опыт берут животных, в сыворотке которых не обнаружены антитела к возбудителю. Тканевый материал в виде суспензии (1 : 10) в объеме 1 мл вводят подкожно. О результате биопробы судят по данным исследования сыворотки крови на 15, 25 и 40-й день после заражения (животные не погибают). Появление антител в титре 1 : 10 и более оценивают как положительный результат. Реагирующих животных убивают и подвергают бактериологическому исследованию.

Серологическая диагностика: при массовых диагностических исследованиях ставят пробирочную РА, роз-бенгал пробу (РА на стекле), РСК, РДСК, кольцевую реакцию с молоком (КР), ИФА.

Чума верблюдов и человека — это природно-очаговая болезнь. В естественных условиях резервуаром возбудителя служат грызуны. Здоровых животных заражают переносчики, в первую очередь блохи. Из сельскохозяйственных животных наиболее чувствительны верблюды. Болезнь характеризуется тяжелой интоксикацией, поражением лимфатической системы, легких, тенденцией к септицемии.

Возбудитель чумы верблюдов и человека — бактерия *Y. pestis*, род *Yersinia*, семейство Enterobacteriaceae.

Лабораторная диагностика чумы верблюдов и человека основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии (разработаны и другие методы), выделение чистой культуры посевом на питательные среды и методом биопробы, идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, ферментативным и серологическим свойствам.

Материал для исследования. В лабораторию направляют органы, трупы грызунов, гной из бубонов, мокроту, кровь. Работа с чумным материалом разрешена только в специализированных лабораториях.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Мазки окрашивают по Граму. В препаратах возбудитель обнаруживают в форме овоидной или палочковидной клетки размером (0,3...0,5) x (1...3) мкм; располагается одиночно, парами, иногда короткими цепочками. Клетки грамотрицательные, часто с биполярной окраской, без жгутиков, спор не образуют, образует капсулу.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Возбудитель — факультативный анаэроб, температурный оптимум 28...29 °С (диапазон 14...42 °С), pH 7,2...7,4, хорошо растет на обычных питательных средах. Через 24 ч инкубирования при 37 °С на плотных средах образует шероховатые, с фестончатым краем и желтовато-коричневым выпуклым центром колонии, напоминающие из-за прозрачного фестончатого края «кружевной платок». В МПБ возбудитель образует пленку на поверхности среды, от которой спускаются нити, напоминающие сталактиты, на дне пробирки хлопьевидный осадок.

Биохимические свойства. Возбудитель расщепляет глюкозу, мальтозу, маннит, галактозу, арабинозу, ксилозу до кислоты, желатину не разжижает, индол не образует, выделяет каталазу.

При исследовании материала от грызунов необходимо дифференцировать от *Y. pseudotuberculosis*, который в отличие от *Y. pestis* образует уреазу и ферментирует рамнозу.

Помимо традиционного хода исследования применяют ускоренные методы обнаружения возбудителя и его антигенов в исследуемом материале: иммунофлуоресценцию, реакцию торможения пассивной гемагглютинации (РТГА), реакцию нарастания титра фага, РДП и др.

Биопроба. Метод применяют для выделения чистой культуры из материала, контаминированного посторонней микрофлорой. Для этого используют морских свинок, которым материал вводят подкожно. Не загрязненный другими бактериями материал вводят внутрибрюшинно. Загнивший нативный материал втирают морским свинкам в предварительно выбритый участок кожи на животе. После гибели животных (на третий-седьмой день) проводят вскрытие с последующим бактериологическим исследованием внутренних органов.

Холера — особо опасная инфекция, вызываемая энтеропатогенной бактерией *Vibrio cholerae*, протекающая с развитием тяжелого гастроэнтерита и выраженным обезвоживанием вплоть до развития дегидратационного шока. Холера имеет тенденцию к эпидемическому распространению и высокую летальность, поэтому отнесена ВОЗ к высокопатогенным карантинным инфекциям. Основным методом лабораторной диагностики холеры является бактериологический. Материалами для исследования могут быть: 1) испражнения больных; 2) рвотные массы; 3) желчь (дуоденальное зондирование в период реконвалесценции); 4) инфицированные продукты; 5) объекты окружающей среды; 6) исследование содержания отрезка тонкой кишки и желчного пузыря (у умерших). Исследуемый материал сразу засевают на обогащенную среду (1% пептонная вода и 1% пептонная вода с теллуридом калия). Существуют специальные очень подробные инструкции и приказы о порядке забора и доставки материала для исследования на холеру, которыми и следует руководствоваться. Желательно, чтобы фекалии и рвотные массы брали на исследование к назначению антибактериальной терапии. При наличии холерных вибрионов в исследованном материале на пептонной воде уже через 3-6 часов появляется нежная голубоватая пленка. При исследовании пленки и характерных колоний обращают внимание на подвижность, биохимическую активность выделенных возбудителей, ставят реакцию агглютинации с противохолерной сывороткой, реакцию со специфическим фагом. Все это позволяет идентифицировать настоящие холерные вибрионы. Положительный ответ можно получить уже через 18-24 часов либо не позднее 36 часов.

К ускоренным методам лабораторной диагностики холеры относятся:

1. Метод иммобилизации и микроагглютинации холерных вибрионов под влиянием специфической противохолерной сыворотки. Для этого нативные мазки кала на стекле обрабатывают сывороткой и просматривают затем в фазово-контрастном микроскопе. Ответ можно получить уже через несколько минут.

2. Метод макроагглютинации вибрионов под действием специфической противохолерной сыворотки, которая добавляется в бульон с холерными вибрионами. Материал подращивают течение 3-4 часов, затем исследуют (в бульоне с сывороткой появляются беловатые комочки).

3. Люминесцентно-серологический метод. Нативные мазки кала обрабатывают специфической люминесцирующей сывороткой и рассматривают под люминесцентным микроскопом. Ответ можно получить через 1,5-2 ч после начала исследования.

4. Иммобилизация вибрионов под влиянием типичных холерных бактериофагов. Ответ можно получить уже через 15-20 мин.

Серологические методы используют преимущественно для ретроспективной диагностики, а также для выявления напряжения иммунитета у переболевших лиц. Определяют титры агглютинирующих антител в РА и РПГА, положительными они считаются в титре 1:40 и выше, однако их можно обнаружить не ранее чем на 6-7-й день болезни. Еще более специфическими являются методы, основанные на определении титра вибриоцидных антител или антитоксических антител (антитоксинов к холерогену).

1.8 Лабораторная работа № 8 (2 часа)

Тема: «Микроорганизмы, используемые в молочной промышленности, в производстве напитков. Изучение морфологии микроорганизмов заквасок»

1.8.1 Цель работы: познакомить студентов с микроорганизмами, используемых в молочной промышленности для получения молочно-кислых продуктов.

1.8.2 Задачи работы:

1. Познакомиться с микрофлорой, вызывающей молочно-кислое брожение.
2. Приготовить мазки из продуктов, полученных путем молочно-кислого брожения для изучения морфологии молочно-кислых бактерий.

1.8.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Молочнокислые продукты (простокваша, кефир), огуречный и капустный рассолы.
2. Микробиологические петли, спиртовки, раствор метиленового синего, пинцеты, микроскопы, пробирки, спиртовки, смесь Никифорова.
3. Световые микроскопы бинокулярные XSP-103P.

1.8.4 Описание работы

Микроорганизмы, используемые в молочной промышленности. Человеку давно известно, что молоко после получения быстро сквашивается. Но он узнал также, что в кислом молоке не так быстро происходит разложение белка и другие нежелательные изменения, поэтому при обработке молока он создавал условия для его сквашивания, что позволяло сохранять его в течение нескольких дней. Методы обработки молока у разных народов были различны, в связи с чем получаемые продукты также отличались один от другого. Таким образом, возникало большое число кисломолочных продуктов, известных под различными названиями: у осетин - кефир, у русских - простокваша, у татар – катык, у армян - мацун, у украинцев – ряженка, у народностей, занимающихся коневодством, - кумыс. Все они сквашиваются молочнокислыми бактериями, а в некоторых, кроме того, одновременно идет и спиртовое брожение.

Интерес к кисломолочным продуктам возник под влиянием идей и трудов И.И. Мечникова (1907 г). Он обратил внимание на то, что жители стран Балканского

полуострова отличаются особым долголетием. Причину этого он связывал с тем, что жители этих стран регулярно употребляют в пищу большое количество кисломолочных продуктов. По мнению И.И. Мечникова, молочнокислые бактерии, содержащиеся в этих продуктах, способны приживаться в кишечнике человека и благотворно влиять на организм. В толстом отделе кишечника обычную микрофлору составляют гнилостные бактерии, выделяющие индол, скатол, которые, всасываясь через стенки кишечника в кровь, постепенно отравляют организм человека. Ученый пришел к выводу, что гнилостный процесс в кишечнике можно ослабить или совсем заглушить, употребляя постоянно кисломолочные продукты. В результате жизнедеятельности молочнокислых бактерий образуется молочная кислота, и реакция среды кишечника из щелочной становится кислой. В кислой среде гнилостные бактерии не могут развиваться, поэтому устраняется источник отравления организма. Кроме того, продукты метаболизма молочнокислых бактерий содержат антибиотические вещества (низин), губительные для гнилостных и патогенных микроорганизмов.

Все кисломолочные продукты делят на две группы: продукты молочнокислого брожения - простокваша, ацидофильное молоко, сметана и продукты смешанного молочнокислого и спиртового брожения – кефир, кумыс, катык. Продукты первой группы характеризуются плотным сгустком, а второй - более острым вкусом, нежным сгустком, пронизанным пузырьками углекислого газа, исчезающими при встряхивании.

Продукты молочнокислого брожения. Простокваша – как показывает само название «молоко просто сквасилось» в результате жизнедеятельности бактерий, попавших в молоко из соскового канала и молочной посуды, а по сути дела, это молоко в фазе молочнокислых бактерий. Такую простоквашу готовят в домашних условиях только из сырого молока.

На молочном заводе все поступившее молоко подвергают обязательной пастеризации, при этом основная масса молочнокислых бактерии погибает, а главное, не могут специалисты молочного дела доверить приготовление кисломолочных продуктов «диким штаммам» молочнокислых бактерий. Для этой цели бактериологи молочного завода покупают закваски из чистых культур молочнокислых бактерий из производственных лабораторий.

Продукты молочнокислого брожения. Мечниковская (болгарская) простокваша – в пастеризованное при 850 С и охлажденное до 400С молоко, вносят 5% закваски, состоящей из термофильного молочнокислого стрептококка и болгарской палочки (*Str.thermophilus* и *Lactobact.bulgaricum*). Через 4 часа молоко свертывается, кислотность продукта достигает 700Т. Простокваша имеет плотный сгусток, сметанообразную консистенцию и кислый вкус. Чем выше температура заквашивания, тем больше кислотность продукта. *Ацидофильная простокваша.* Ее готовят так же, как мечниковскую простоквашу, только закваска состоит из чистой культуры ацидофильной палочки (*Lactobact. acidophilum*). Ацидофильная палочка, в отличие от болгарской, хорошо приживается в желудочно-кишечном тракте, т.е. в той среде, которая является естественным местом обитания для нее, поэтому лечебная эффективность такого кисломолочного продукта выше, а его действие более продолжительное. Сметана. В 20-30%-ные пастеризованные при 850С без выдержки и охлажденные до 220С сливки вносят 5% закваски, в состав которой входят молочнокислый и сливочный стрептококки и ароматообразующие бактерии (*Str.lactis*, *Str.cremoris*, *Str.diacetylactis*). В первые три часа сливки нужно перемешивать 2-3 раза, а затем оставить в покое до конца сквашивания, определяемого по кислотности. Сквашенные сливки созревают в помещении с температурой 5-80С, консистенция созревшей сметаны становится густой вследствие набухания белков и агрегирования жировых шариков. Готовая сметана должна иметь кислотность 850Т, ее рекомендуют хранить при 40С.

Продукты смешанного брожения - кефир – отличительной особенностью этого продукта является использование кефирных грибков, представляющих собой белые белковые

гроздевидные образования диаметром от 2 мм до 3 см. При гистологическом исследовании срезов тела грибов обнаруживали тесные переплетения нитей, которые составляли строму грибка, удерживающую остальные группы микроорганизмов: молочнокислые стрептококки, палочки и молочные дрожжи. По С. Королеву кефирные грибки представляют собой прочное симбиотическое образование, ведущее себя как единый, живой организм, который растет, размножается и передает свои свойства последующим поколениям. Многокомпонентность микробного симбиоза обуславливает трудности получения стабильного и оптимального состава закваски, что является обязательным для выработки стандартного кефира. Любое отклонение от принятого режима культивирования ведет за собой изменение микробного состава закваски, что свидетельствует об исключительной способности кефирных грибов к саморегулированию микрофлоры. Регулируя температуру заквашивания, можно изменить течение вызываемых ими процессов. Культивирование грибов при температуре ниже 150С способствует активизации спиртового брожения; при более высокой температуре интенсивнее развиваются молочнокислые микроорганизмы, что повышает содержание в продукте молочной кислоты.

Кумыс является самым древним молочным напитком в нашей стране. Еще в пятом веке до нашей эры греческий историк Геродот, описывая быт далеких предков-скифов, сообщал, что они умеют делать из молока кобылиц вкусный напиток.

Благодаря своим лечебным свойствам кумыс получил широкую известность. Напитком бодрости, веселья и долголетия называли кумыс в народе. Издавна считалось, что кумыс укрепляет здоровье и особенно полезен для ослабленных людей. Готовят кумыс из парного непастеризованного кобыльего молока. В качестве закваски раньше использовали кумыс прежней выработки. В настоящее время на молочных заводах для приготовления кумыса применяют чистые культуры *Lactobacterium bulgaricum* и дрожжи рода *Torula*. В кобылье молоко вносят 1% закваски, оставляют при 300С на 6-8 часов, разливают по бутылкам, плотно закупоривают и ставят в холодильник для созревания на 2-3 дня. Различают кумыс слабый, содержащий 1,0% спирта; средний – до 1,75% и крепкий – до 2,5% спирта.

Бифидобактерин - новый кисломолочный напиток, готовят с использованием *Bifidobacterium bifidum*. Бифидобактерии относятся к нормальной микрофлоре кишечника молодняка, находящегося на молочном вскармливании. Они хорошо приживаются в естественной среде обитания, поэтому их используют в составе микрофлоры пробиотиков, нормализующих микрофлору желудочно-кишечного тракта. Из чистых культур бифидобактерий готовят закваски в сочетании с известными молочнокислыми бактериями, которые используют для приготовления лечебных кисломолочных продуктов, таких как бифидок, бифилукс, бифидумпростокваша, бифидокефир.

Микробиология масла. Сырьем для получения масла являются 25-35%-е сливки, которые должны быть свежими. В сладко-сливочном масле содержатся микробы, которые остаются после пастеризации сливок, а также попадают во время их созревания и сбивания. На количество микробов влияет температура, чем она выше, тем больше микробов. В 1 г сладко-сливочного масла допускается до 10000 бактерий, при коли-титре – 0,1 г. Кисло-сливочное масло готовят внесением в пастеризованные сливки закваски из *Str.lactis*, *Str.cremoris*, *Str.diacetilactis*, поэтому в 1 г такого масла содержатся десятки и сотни миллионов молочнокислых микробов, коли-титр такой же - 0,1 г. Обычно микробов больше при длительном (12-16 ч) сквашивании сливок и меньше при кратковременном (20-30 мин). В сладкосливочном масле нежелательных микробов больше, чем в кислосливочном.

Микроорганизмы, используемые в производстве напитков. Получение напитков путем спиртового брожения — одно из древнейших бродильных производств. Первыми из таких напитков были, видимо, вино и пиво. До появления работ Пастера в конце XIX в. о сути протекающих при брожении процессов и их механизмах было известно очень мало.

Пастер показал, что брожение без доступа воздуха осуществляется живыми клетками дрожжей, при этом сахар превращается в спирт и углекислый газ. Тогда же было показано, что брожение осуществляется под действием каких-то веществ, находящихся внутри дрожжевых клеток. Одно из главных нововведений в области микробиологии брожения было предложено Хансеном, работавшим в исследовательском центре Карлсберг в Копенгагене с дрожжами дикого типа. При производстве пива эти дрожжи доставляли массу неудобств. Хансен выделил чистые культуры дрожжей и использовал их в пивоварении; тем самым он стал пионером применения таких культур при производстве пива. Алкогольные напитки получают путем сбраживания сахар-содержащего сырья, в результате которого образуются спирт и углекислый газ. Сбраживание осуществляется дрожжами рода *Saccharomyces*. В одних случаях используется природный сахар (например, содержащийся в винограде, из которого делают вино), в других сахара получают из крахмала (например, при переработке зерновых культур в пивоварении). Наличие свободных сахаров обязательно для спиртового брожения при участии *Saccharomyces*, так как эти виды дрожжей не могут гидролизовать полисахариды. В производстве спиртных напитков применяют штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* или *S. carlsbergensis*. Различие между ними заключается в том, что *S. carlsbergensis* могут полностью сбраживать раффинозу, а *S. cerevisiae* к этому не способны. Для осуществления спиртового брожения при пивоварении прежде всего необходимо, чтобы в пивоваренном сырье образовался сахар. Традиционным источником нужных для этого полисахаридов всегда был ячмень, но в качестве дополнительных используются и другие виды углевод-содержащего сырья. И сегодня ячменный солод составляет основу пива.

Изучение морфологии молочнокислых бактерий.

1. Приготовить и просмотреть прижизненный препарат молочнокислых бактерий из сметаны. Для этого на предметное стекло поместить каплю сметаны, распределить ее тонким слоем, добавить смесь Никифорова (1–2 капли). Когда смесь испарится, окрасить препарат метиленовым синим и промикроскопировать.

2. Приготовить и просмотреть прижизненный препарат микрофлоры молочнокислых продуктов (кефир, йогурт) и огуречного рассола.

Streptococcus lactis – овальные кокки, диаметром 0,5-1 мкм, располагаются в культуре парно (диплококки), цепочками (стрептококки), реже одиночными клетками.

Streptococcus cremoris – клетки расположены более длинными цепочками.

Lactobacterium bulgaricum – болгарская палочка, крупная бактерия, длиной 4-5 мкм, неподвижная, грамположительная, располагается в виде отдельных клеток и коротких цепочек (стрептобактерия). Температура развития 40-45°C.

Lactobacterium acidophilum – ацидофильная палочка, по морфологии близка к болгарской, но имеет другой температурный оптимум развития – 37°C.

Lactobacterium casei – огуречная палочка, короткая грамположительная неподвижная бактерия. Располагается парами или цепочкой

1.9 Лабораторная работа № 9 (2 часа)

Тема: «Пищевые продукты, получаемые микробным путем»

1.9.1 Цель работы: познакомить студентов с продуктами, получаемыми микробным способом и технологией их получения.

1.9.2 Задачи работы:

1. Дать представления о продуктах, получаемых путём микробного синтеза.
2. Познакомить студентов с этапами получения таких продуктов.
3. Изучить морфологию микроорганизмов, используемых в промышленном производстве.

1.9.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Готовые микропрепараты.
2. Презентация о получении продуктов путём микробного синтеза.
3. Световые микроскопы бинокулярные XSP-103P.

1.9.4 Описание работы

Пищевые продукты, получаемые микробным путем. Микроорганизмы начали использовать в производстве белковых продуктов задолго до возникновения микробиологии. Достаточно упомянуть всевозможные разновидности сыра, а также продукты, получаемые путем ферментации соевых бобов. И в первом, и во втором случае питательной основой является белок. При выработке их при участии микробов происходит глубокое изменение свойств белоксодержащего сырья. В результате получают пищевые продукты, которые можно дольше хранить (сыр) или удобнее потреблять (соевый творог). Микробы играют роль и в производстве некоторых мясных продуктов, предназначенных для хранения. Так, при изготовлении некоторых сортов колбасы (bologna, salami) используется кислотное брожение, обычно при участии комплекса молочнокислых бактерий. Образовавшаяся кислота способствует сохранности продукта и вносит вклад в формирование его особого вкуса. Кислотообразующие бактерии используются и при засоле мяса — еще одном способе консервации. Ряд блюд восточной кухни получают путем ферментации рыбы: для этого применяют плесневые грибы и дрожжи. Этим, пожалуй, и ограничивается использование микроорганизмов в переработке белков. Возможности современной биотехнологии в этих производствах невелики, за исключением сыроделия. Другое дело — выращивание и сбор микробной массы, перерабатываемой в пищевые продукты: здесь биотехнология может проявить себя во всей полноте.

Микроорганизмы, используемые в производстве кормового белка. Производство микробной биомассы - самое крупное микробиологическое производство. Микробная биомасса может быть хорошей белковой добавкой для домашних животных, птиц и рыб. Производство микробной биомассы особенно важно для стран, не культивирующих в больших масштабах сою (соевую муку используют как традиционную белковую добавку к кормам). При выборе микроорганизма учитывают удельную скорость роста и выход биомассы на данном субстрате, стабильность при поточном культивировании, величину клеток. Клетки дрожжей крупнее, чем бактерий, и легче отделяются от жидкости при центрифугировании. Можно выращивать полиплоидные мутанты дрожжей с крупными клетками. В настоящее время известны только две группы микроорганизмов, которым присущи свойства, необходимые для крупномасштабного промышленного производства: это дрожжи рода *Candida* на *n*-алканах (нормальных углеводородах) и бактерии *Methylophilus methylotrophus* на метаноле. Микроорганизмы можно выращивать и на других питательных средах: на газах, нефти, отходах угольной, химической, пищевой, вино-водочной, деревообрабатывающей промышленности. Экономические преимущества их использования очевидны. Так, килограмм переработанной микроорганизмами нефти дает килограмм белка, а, скажем, килограмм сахара - всего 500 граммов белка. Аминокислотный состав белка дрожжей практически не отличается от такового, полученного из микроорганизмов, выращенных на обычных углеводных средах. Биологические испытания препаратов из дрожжей, выращенных на углеводородах, которые проведены и у нас в стране и за рубежом, выявили полное отсутствие у них какого-либо вредного влияния на организм испытуемых животных. Опыты были проведены на многих поколениях десятков тысяч лабораторных и сельскохозяйственных животных. В непереработанном виде дрожжи содержат неспецифические липиды и аминокислоты, биогенные амины, полисахариды и нуклеиновые кислоты, а их влияние на организм пока еще плохо изучено. Поэтому и предлагается выделять из дрожжей белок в химически чистом виде. Освобождение его от нуклеиновых кислот также уже стало несложным. В современных биотехнологических процессах, основанных на

использовании микроорганизмов, продуцентами белка служат дрожжи, другие грибы, бактерии и микроскопические водоросли. С технологической точки зрения наилучшими из них являются дрожжи. Их преимущество заключается прежде всего в "технологичности": дрожжи легко выращивать в условиях производства. Они характеризуются высокой скоростью роста, устойчивостью к посторонней микрофлоре, способны усваивать любые источники питания, легко отделяются, не загрязняют воздух спорами. Клетки дрожжей содержат до 25% сухих веществ. Наиболее ценный компонент дрожжевой биомассы - белок, который по составу аминокислот превосходит белок зерна злаковых культур и лишь немного уступает белкам молока и рыбной муки. Биологическая ценность дрожжевого белка определяется наличием значительного количества незаменимых аминокислот. По содержанию витаминов дрожжи превосходят все белковые корма, в том числе и рыбную муку. Кроме того, дрожжевые клетки содержат микроэлементы и значительное количество жира, в котором преобладают ненасыщенные жирные кислоты. При скармливании кормовых дрожжей коровам повышаются удои и содержание жира в молоке, а у пушных зверей улучшается качество меха.

Микроорганизмы, используемые в производстве пищевого белка. Уже давно микроорганизмы используют как источник белка для питания человека и животных. Еще в годы первой мировой войны в Германии один из основоположников молекулярной биологии М. Дельбрюк (в 1937 г. переехал в США) с коллегами разработали первый технологический процесс промышленного культивирования пивных дрожжей для их добавления в супы и колбасы. Белки, продуцируемые бактериями или дрожжами и используемые в пищевых целях, получили название белки одноклеточных организмов (БОО). На первом этапе в качестве сырья для микроорганизмов использовали в основном углеводороды нефти. Затем интерес был проявлен к другим субстратам, прежде всего к природным газам (метан). Как субстраты для получения БОО из дрожжей используют некоторые промышленные отходы (например, отработанный сульфитный щелок с бумажных комбинатов, молочную сыворотку – побочный продукт сыроварения, мелассу (патока), отходы спиртоводочных заводов). Промышленный продукт получают в виде суммарной биомассы. Разработаны промышленные линии для производства и переработки микроводорослей с целью получения БОО. Производство БОО имеет многие преимущества перед производством белка в животноводстве и растениеводстве: 500 кг дрожжей дают за сутки 80 кг белков, а у быка того же веса суточный привес составляет в лучшем случае 500 г белка. Однако БОО используют в основном как корм для скота, и лишь в будущем можно ожидать создания технологий получения БОО, пригодных для питания человека. Перспективно в этом отношении культивирование некоторых грибов (*Fusarium*), зеленых водорослей (*Chlorella*), цианобактерий (*Spirulina*), имеющих адекватные для человека органолептические свойства. В настоящее время уже налажено производство на базе крахмала волокнистой массы *Fusarium* как источника пищи для человека. Изменения в генах, осуществленные с помощью генной инженерии, могут модифицировать структуру и улучшать свойства пищевых белков. Наибольший интерес в плане таких манипуляций привлекают к себе 3 белка животных и растений: овальбумин курицы, составляющий большую часть (54 %) белка яйца, казеин (главная фракция в молоке) и белки сои (42 % в бобах). Например, манипуляции с кодирующей частью гена k-казеина, в результате которых из белка элиминировался фрагмент, расположенный между 9-й и 17-й аминокислотами, а также цистеин, участвующий в образовании дисульфидной связи, привели к тому, что новый белок как пищевой продукт стал более качественным. По имеющимся в литературе оценкам, к 2010 г. белки с измененными свойствами, полученные целенаправленной модификацией структуры кодирующих их генов, будут составлять примерно 4 % всех потребляемых белков на общую сумму 15 млрд. долл. На использовании микроорганизмов основано производство ими аминокислот, в первую очередь так называемых незаменимых, которые могут быть полезными добавками в пищу животных и человека. Среди незаменимых аминокислот,

промышленное производство которых уже давно налажено, первое место занимает лизин, затем треонин и глутаминовая кислота. Получены штаммы *Brevibacterium flavum*, которые превращают в лизин более одной трети сахаров, содержащихся в питательной среде. Интерес к микробиологическим способам промышленного производства аминокислот вызван также и тем, что они позволяют получать L-аминокислоты в чистом виде, тогда как при химическом синтезе получают рацемические смеси, содержащие L- и D-аминокислоты. Последние не входят в состав природных белков (они содержатся в незначительных количествах лишь в некоторых пептидах микроорганизмов, в частности, пептидах, являющихся антибиотиками).

1.10 Лабораторная работа № 10 (2 часа)

Тема: «Антибиотики микробного происхождения, их использование для лечения инфекционных заболеваний»

1.10.1 Цель работы: познакомить студентов с антибиотиками микробного происхождения и их действием на микроорганизмы.

1.10.2 Задачи работы:

1. Дать представления об антибиотиках микробного происхождения.
2. Определить чувствительность микробов к антибиотикам методом диффузии в агар.

2.10.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Стерильные чашки Петри с МПА, пробирки с чистой культурой стафилококка и кишечной палочки.
2. Стерильные градуированные «концевые» пипетки на 2 мл, резиновые груши, набор стандартных дисков с разными антибиотиками, стерильные пинцеты, линейки, термостат.

1.10.4 Описание работы

Микроорганизмы – продуценты антибиотиков. Антибиотики, вырабатываемые микроорганизмами химические вещества, которые способны тормозить рост и вызывать гибель бактерий и других микробов. Противомикробное действие антибиотиков имеет избирательный характер: на одни организмы они действуют сильнее, на другие – слабее или вообще не действуют. Избирательно и воздействие антибиотиков и на животные клетки, вследствие чего они различаются по степени токсичности и влиянию на кровь и другие биологические жидкости. Некоторые антибиотики представляют значительный интерес для химиотерапии и могут применяться для лечения различных микробных инфекций у человека и животных. Способностью вырабатывать антибиотики обладают не все микроорганизмы, а лишь некоторые штаммы отдельных видов. Так, пенициллин образуют некоторые штаммы *Penicillium notatum* и *P. chrysogenum*, а стрептомицин – определенный штамм *Streptomyces griseus*, тогда как другие штаммы тех же видов либо вообще не вырабатывают антибиотики, либо вырабатывают, но другие. Существуют также различия между штаммами-продуцентами антибиотиков, причем эти различия могут быть количественными или качественными. Один штамм, например, дает максимальный выход данного антибиотика, когда культура растет на поверхности среды и находится в стационарных условиях, а другой – лишь когда его культура погружена в среду и постоянно встряхивается. Некоторые микроорганизмы выделяют не один, а несколько антибиотиков. Так, *Pseudomonas aeruginosa* образует пиоцианазу, пиоцианин, пиолипоевую кислоту и другие пио-соединения; *Bacillus brevis* производит грамицидин и тироцидин (смесь, известную под названием тиротрицин); *P. notatum* – пенициллин и пенатин; *Aspergillus flavus* – пенициллин и аспергилловую кислоту; *Aspergillus fumigatus* – фумигатин, спинулозин, фумигацин (гельволевую кислоту) и глиотоксин; *Streptomyces griseus* – стрептомицин, маннозидострептомицин, циклогексимид и стрептоцин; *Streptomyces rimosus* – окситетрациклин и римоцидин; *Streptomyces aureofaciens* – хлортетрациклин и тетрациклин. Один и тот же антибиотик может продуцироваться

микроорганизмами разного рода. Так, глиотоксин образуют виды *Gliocladium* и *Trichoderma*, а также *Aspergillus fumigatus* и др. Разные микроорганизмы или их штаммы могут вырабатывать разные химические формы одного и того же антибиотика, например разные пенициллины или различные формы стрептомицина. В последние годы выделено и описано огромное число антибиотиков, продуцируемых различными организмами. Способностью вырабатывать антибиотики обладают как спорообразующие, так и не образующие спор бактерии, а кроме того, более половины изученных на этот предмет родов грибов.

Неспорообразующие бактерии. Из группы бактерий, ранее называемых *Bacillus puyaneus*, а позднее известных как *Pseudomonas aeruginosa*, выделены пиоцианин и пиоцианаза. Другие не образующие спор бактерии тоже вырабатывают антибиотики, сильно различающиеся по химической структуре и антибактериальным свойствам. Примером могут служить колицины, производимые различными штаммами кишечной палочки (*Escherichia coli*).

Спорообразующие бактерии. Многие виды спорообразующих бактерий вырабатывают различные антибиотики. Так, штаммы *Bacillus subtilis* производят бацитрацин, субтилин и др.; *B. brevis* – тиротрицин, *B. polymixa* (*B. aerosporus*) – полимиксин (аэроспорин). Из *B. mycoides*, *B. mesentericus* и *B. simplex* выделены разнообразные, еще недостаточно изученные соединения: бациллин, колистатин и др. Многие из них препятствуют росту грибов.

Актиномицеты. Кроме пенициллина, наиболее важные антибиотики, используемые в качестве химиотерапевтических средств, были получены из актиномицетов (грибковоподобных бактерий). К настоящему времени выделено или описано более 200 таких соединений. Некоторые из них широко применяются в лечении инфекционных заболеваний человека и животных. К таким антибиотикам относятся стрептомицин, тетрациклины, эритромицин, новобиоцин, неомицин и др. Одни из них обладают в основном антибактериальным действием, другие – антигрибковым, а третьи активны против некоторых крупных вирусов.

Грибки. Грибками в медицине называют микроорганизмы, относящиеся к царству грибов. Это одни из наиболее важных производителей антибиотиков. Они вырабатывают цефалоспорин, гризеофульвин, микофеноловую кислоту, пенициллиновую кислоту, глиотоксин, клавацин, аспергилловую кислоту и многие другие соединения.

Метод диффузии в агар (метод бумажных дисков).

Это наиболее простой в исполнении метод. В качестве питательной среды применяют МПА, агар на переваре Хоттингера. Диски с антибиотиками (диаметр 5...6 мм) готовят из специальных сортов фильтровальной бумаги. Каждый диск содержит определенное количество антибиотика, которое указано на этикетке флакона. Во флакон насыпают силикагель, который впитывает влагу и служит индикатором: при переувлажнении меняет окраску с синей на розовую. При изменении окраски силикагеля во флаконе диски для использования непригодны. Флаконы с дисками хранят при температуре 4...20 °С. Расплавленную питательную среду разливают в чашки Петри по 20 мл (толщина слоя 4...5 мм). Перед посевом чашки со средой досушивают в термостате. Для посева используют суточную бульонную культуру или смывы суточной агаровой культуры. 1 мл микробной суспензии в физиологическом растворе (концентрация клеток 10⁹/мл) наносят на агар и покачиванием чашки распределяют по поверхности питательной среды. Избыток жидкости удаляют стерильной пастеровской пипеткой. Засеянные чашки Петри подсушивают при комнатной температуре 30...40 мин, а затем на поверхность среды стерильным пинцетом накладывают, плотно прижимая, диски с разными антибиотиками на расстоянии 2 см друг от друга и от края чашки. Чашки с дисками выдерживают в термостате при 37 °С 18 ч в положении вверх дном. Антибиотик из диска диффундирует в агар, вызывая гибель чувствительных бактерий, формируя таким образом вокруг диска зону отсутствия роста. Ближе к диску концентрация антибиотика в агаре выше, по мере

удаления от диска концентрация снижается. Следовательно, чем больше диаметр зоны задержки роста вокруг антибиотика, тем более чувствительна к нему исследуемая культура. Диаметр зоны задержки (отсутствия) роста микроорганизмов измеряют с помощью линейки или миллиметровой бумаги с точностью до 1 мм. Отсутствие зоны задержки роста микроорганизмов вокруг диска указывает на устойчивость исследуемой культуры к данному антибиотику. При зоне задержки роста до 14 мм говорят о малой чувствительности к антибиотику, от 15 до 25 мм - о достаточной чувствительности, свыше 25 мм — о высокой чувствительности.

1.11 Лабораторная работа № 11 (2 часа)

Тема: «Микроорганизмы, используемые в очистке и переработке промышленных и бытовых отходов. Изучение морфологии и культуральных свойств некоторых из них»

1.11.1 Цель работы: познакомить студентов с технологией очистки и переработке промышленных и бытовых отходов с помощью микроорганизмов.

1.11.2 Задачи работы:

1. Ознакомить студентов с использованием микроорганизмов при очистке переработке промышленных отходов.
2. Изучить морфологию микроорганизмов, используемых при очистке и переработке промышленных отходов.

1.11.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Готовые микропрепараты.
2. Световые микроскопы бинокулярные XSP-103P.
3. Презентация по теме

1.11.4 Описание работы

Биологическая очистка стоков. Существуют микроорганизмы, для которых загрязнения, содержащиеся в сточных водах, являются питательными веществами. В начале 20 века произошла революция в очистке сточных вод с помощью активного ила - сложной смеси микроорганизмов. Хотя при этом требуется перемешивать жидкость и непрерывно аэрировать её воздухом, такой способ позволяет перерабатывать большие объёмы стоков с самыми разнообразными загрязнениями - от хозяйственно-бытовых до промышленных.

Биологическая очистка газовых выбросов. Многие выбросы в атмосферу содержат вредные или дурно пахнущие примеси. Для их очистки применяют биофильтры, заполненные насадкой, на которой закреплены специальные микроорганизмы. Вредные примеси сорбируются на насадке и затем потребляются и обезвреживаются микроорганизмами.

Биокомпостирование твёрдых отходов. Аналогом аэробной очистки стоков является аэробное биокомпостирование твёрдых отходов. Твёрдые отходы смешиваются с микроорганизмами, разлагающими вредные загрязнения, и балластным материалом типа торфа, который обеспечивает доступ кислорода к микроорганизмам. Это позволяет превратить отходы в удобрение или просто использовать их в качестве подсыпки для дорог, в строительстве и в других случаях.

Метановое сбраживание твёрдых отходов. Ещё в 1776 году Вольта обнаружил, что в болотном газе содержится метан. С 1901 года успешно применяют анаэробное сбраживание осадка избыточного активного ила, образующегося при работе установок биологической очистки сточных вод. Сброженный осадок, если только он не содержит повышенных концентраций тяжёлых металлов, успешно используют как удобрение. Он лучше исходного осадка по составу, и в нём почти полностью отсутствуют болезнетворные микроорганизмы.

Ликвидации загрязнений продуктами нефтепереработки только механическими и физико-химическими способами не всегда достигается должный эффект, так как зачастую

возникает проблема утилизации отходов, образующихся после очистки. Использование биопрепаратов гарантирует максимальное извлечение нефтепродуктов; при этом ни в качестве промежуточных, ни в качестве конечных продуктов токсичные вещества не образуются. Применение технологий, основанных на использовании биопрепаратов, является перспективным способом ликвидации загрязнений. Предлагаемый способ отличается высокой степенью очистки, экономичностью, простотой, надежностью и экологичностью; кроме того, он удачно комбинируется с механическими и физическими способами. Наиболее эффективными биопрепаратами, широко применяемыми для ликвидации нефтяных загрязнений, являются бактериальные препараты серии "Биодеструктор" ("Валентис", "Лидер", "Аллегро", "Торнадо", "Гера", "Маг" и др.), созданные на основе бактерий, выделенных из нефтезагрязненных природных сред. Для таких микроорганизмов нефтепродукты являются источником питания, и они естественным путем адаптированы к их потреблению, разлагая входящие в состав нефтепродуктов высокомолекулярные углеводородные соединения, в том числе ароматического ряда, до углекислого газа и воды. Процесс деструкции нефтепродуктов протекает в период от нескольких дней или недель до нескольких месяцев в зависимости от степени загрязнения объекта, химического состава загрязнителя, климатических и физико-химических параметров среды. Интенсивность деструкции нефтепродуктов составляет от 30 до 85 % при однократной обработке почв данными биопрепаратами и до 99 % при очистке загрязненной воды.

Практическое задание: изучить морфологию представителей родов: *Pseudomonas*; *Azotobacter*; *Acinetobacter*; *Candida*.

1.12 Лабораторная работа № 12 (2 часа)

Тема: «Вещества микробного происхождения, используемые для лечения и профилактики и диагностики инфекционных заболеваний человека и животных. Рассмотрение различных аллергенов, антигенов, вакцинных препаратов»

1.12.1 Цель работы: познакомить студентов с препаратами микробного происхождения, которые используются для диагностики, лечения и профилактики инфекционных заболеваний.

1.12.2 Задачи работы:

1. Ознакомить студентов с различными видами биопрепаратов.

1.12.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Вакцины, сыворотки, аллергены, антигены.

1.12.4 Описание работы

Аллергены для выявления инфекционной аллергии, которая развивается: 1) при хронической форме дизентерии, гонорее, туберкулезе, в третичном периоде сифилиса; при этом образуются гуммы – опухолеподобные разрастания лимфоидной ткани; 2) при особо опасных инфекциях: чуме, сибирской язве, туляремии, бруцеллезе; 3) при глубоких микозах; 4) в период реконвалесценции при тифопаратифозных заболеваниях. Часто используют: 1) при туберкулезе – проба Манту с туберкулином; 2) при хронической форме дизентерии – проба Цуверкалова; 3) при гонорее – проба с гоновакциной; 4) при бруцеллезе – проба Бюрне с бруцеллином; 5) при туляремии – проба с туляремином; 6) при сибирской язве – проба с антраксином. Положительные аллергические пробы дают больные, бактерионосители и вакцинированные живой вакциной.

Для диагностики многих инфекционных заболеваний используются диагностические сыворотки. В большинстве случаев для получения полноценных сывороток используют в качестве антигенов культуры микробов в S-форме. Реже требуются O- или R-варианты. Для получения сывороток лучше использовать в качестве антигенов живые культуры бактерий или вирусов, в ряде случаев для иммунизации животных использовать вновь посеянные (суточные) культуры микробов.

Исследования сывороток больных животных на наличие в них антител, а также определение титров антител в специфических сыворотках при их промышленном изготовлении осуществляются с помощью антигенов-диагностикумов. По происхождению такие антигены подразделяются на бактериальные, риккетсиальные, вирусные. При изготовлении бактериальных антигенов используют или живые культуры или гомогенные стандартизированные взвеси убитых микробов. Антигены из живых культур, применяются редко, так как это связано с определенными технологическими трудностями, а также возможностью заражения лабораторного персонала. Диагностикумы из убитых культур являются предпочтительными. Приготовление диагностикумов связано, прежде всего, с тщательной подготовкой и селекцией штаммов микроорганизмов из которых они готовятся. Производственные штаммы должны находиться в S-форме. Это обеспечивает им хорошую агглютинабельность; специфичность и образование устойчивой гомогенной взвеси. Чаще всего для получения диагностикумов определенные штаммы микроорганизмов выращивают на агаровых средах. Культуры микробов смывают с поверхности агара, а затем их инактивируют 0,5%-м раствором формалина (бруцеллезный, туляреминый антиген), 1%-ми растворами борной кислоты (листериозный, сальмонеллезные, коли-антигены), нагреванием (бруцеллезный антиген) и другими методами.

В качестве диагностических препаратов для установления рода и вида бактерий, выделенных в ходе бактериологических исследований, могут применяться бактериофаги

Вакцинация – это способ создания протективного иммунитета (иммунитета к определенным патогенным микроорганизмам) с помощью препаратов (вакцин) с целью формирования к антигенам возбудителя заболевания иммунологической памяти, минуя стадию развития данного заболевания. Вакцины содержат биоматериал - антигены возбудителя или анатоксины. Создание вакцин стало возможно, когда ученые научились культивировать возбудителей различных опасных заболеваний в условиях лаборатории. А разнообразие способов создания вакцин обеспечивает их разновидности и позволяет объединить в группы по методам изготовления.

Живые ослабленные (аттенуированные) – где вирулентность патогена понижена различными способами. Такие патогены культивируются в неблагоприятных для их существования условиях окружающей среды и посредством множественных мутаций утрачивают первоначальную степень вирулентности. Вакцины на такой основе считаются наиболее эффективными. Аттенуированные вакцины дают длительный иммунный эффект. В эту группу входят вакцины против кори, оспы, краснухи, герпеса, БЦЖ, полиомиелита (вакцина Сэбина).

Убитые – содержат патогены убитых разными способами микроорганизмов. Их эффективность ниже, чем у аттенуированных. Полученные данным способом вакцины не вызывают инфекционных осложнений, но могут сохранять свойства токсина или аллергена. Убитые вакцины дают кратковременный эффект и требуют повторной иммунизации. Сюда относят вакцины против холеры, тифа, коклюша, бешенства, полиомиелита (вакцина Солка). Также такие вакцины применяют для профилактики сальмонеллеза, брюшного тифа и т.д.

Антитоксические - содержат анатоксины или токсиды (инактивированные токсины) в комплексе с адъювантом (веществом, которое позволяет усиливать действие отдельных компонентов вакцины). Одна инъекция такой вакцины способствует защите от нескольких патогенов. Такого вида вакцины используют против дифтерии, столбняка.

Синтетические – искусственно созданный эпитоп (часть молекулы антигена, которая распознается агентами иммунной системы), соединенный с иммуногенным носителем или адъювантом. К таким относят вакцины против сальмонеллеза, йерсиниоза, ящура, гриппа.

Рекомбинантные – у патогена выделяют гены вирулентности и гены протективного антигена (совокупность эпитопов, которые вызывают наиболее сильный иммунный ответ), гены вирулентности удаляют, а ген протективного антигена вводят в безопасный

вирус (чаще всего вирус осповакцины). Так изготавливают вакцины против гриппа, герпеса, везикулярного стоматита.