

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

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Б1.В.ДВ.12.01 Большой практикум по микробиологии

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 Изучение методов культивирования микроорганизмов.....	3
1.2 Лабораторная работа № ЛР-2 Изучение методов световой микроскопии.....	7
1.3 Лабораторная работа № ЛР-3 Микропрепараты. Приготовление, микроскопия. Итоговое занятие за 1 модуль.....	10
1.4 Лабораторная работа № ЛР-4 Изучение ростовых характеристик микроорганизмов.....	13
1.5 Лабораторная работа № ЛР-5 Определение антибиотикочувствительности микроорганизмов.....	15
1.6 Лабораторная работа № ЛР-6 Определение чувствительности микроорганизмов к фагам.	16
1.7 Лабораторная работа № ЛР-7 Методы идентификации микроорганизмов.....	19
1.8 Лабораторная работа № ЛР-8 Определение факторов патогенности микроорганизмов.....	23
1.9 Лабораторная работа № ЛР-9 Бактериологический метод.....	26
1.10 Лабораторная работа № ЛР-10 Изучение действия биологических факторов на микроорганизмы.....	27
1.11 Лабораторная работа № ЛР-11 Изучение действия физических факторов на микроорганизмы.....	29
1.12 Лабораторная работа № ЛР-12 ПЦР и ее применение в микробиологии.	33

1. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

1.1 Лабораторная работа №1 (2 часа).

Тема: «Изучение методов культивирования микроорганизмов»

1.1.1 Цель работы: Ознакомиться с методами культивирования микроорганизмов

1.1.2 Задачи работы:

1. Изучить методы культивирования аэробных микроорганизмов
2. Изучить методы культивирования анаэробных микроорганизмов

1.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Культуры аэробных микроорганизмов, культуры анаэробных микроорганизмов, чашки Петри, питательные среды, пробирки, спиртовки, бактериологические петли, анаэроустат, термостат.

1.1.4 Описание (ход) работы:

Культивирование, то есть выращивание микроорганизмов в лаборатории, применяется для изучения их свойств и для получения биомассы. Бактерии, грибы, актиномицеты, спирохеты и некоторые простейшие культивируются на питательных средах. Хламидии, риккетсии, вирусы и некоторые простейшие способны размножаться только в организме животного или в живых клетках.

Культуральные свойства данного вида микроорганизмов - это: 1) условия, необходимые для размножения, и 2) характер роста на питательных средах. Культуральные свойства - это одна из характеристик, которые учитываются при идентификации микроорганизмов.

Питательные среды

Питательные среды должны соответствовать определенным требованиям. Они должны содержать все питательные вещества, необходимые для размножения данного вида микробов. Одни патогенные микроорганизмы растут на простых питательных средах, другие для своего размножения нуждаются в добавлении крови, сыворотки крови, витаминов.

В питательных средах должны быть созданы определенные условия путем добавления хлорида натрия или буферных растворов. Для большинства бактерий благоприятной является питательная среда, содержащая 0,5% хлорида натрия. Реакция питательной среды, благоприятная для большей части патогенных бактерий - слабощелочная, что соответствует $pH=7,2-7,4$. Холерный вибрион растет при $pH=7,8-8,5$, грибы - при $pH=5-5,5$. Питательные среды должны быть влажными, то есть содержать достаточное количество воды, быть по возможности прозрачными и стерильными, то есть до посева не содержать микробов.

По составу и происхождению питательные среды бывают естественные, искусственные и синтетические. Естественные питательные среды - это натуральный продукт, например, картофель, другие овощи. Искусственные питательные среды готовят по определенной прописи из продуктов с добавлением органических и неорганических со-

единений. Синтетические среды содержат определенные химические соединения в известных концентрациях.

По консистенции питательные среды бывают жидкие, полужидкие, плотные. В качестве уплотнителя обычно применяют агар-агар -полисахарид, выделенный из морских водорослей. Агар-агар не используется микроорганизмами в качестве питательного вещества, образует в воде гель, плавящийся при 100°C и застывающий при 45°C.

Для получения плотной питательной среды агар-агар добавляют в концентрации 1,5-2%, для полужидкой - 0,5%.

По целевому назначению питательные среды могут быть разделены на обычные, специальные, элективные, дифференциально-диагностические.

Обычные питательные среды применяют для культивирования большинства микроорганизмов, это мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА).

Специальные питательные среды применяют для культивирования микроорганизмов, которые не растут на простых средах. Например, кровяной агар и сахарный бульон для стрептококка, сывороточный агар для менингококка и гонококка.

Элективные питательные среды используют для выделения одного какого-либо вида из смеси различных бактерий. Данный вид бактерий растет на этой среде быстрее и лучше других, опережая их в своем росте; рост других бактерий задерживается на этой среде. Например, свернутая сыворотка для палочки дифтерии, щелочная пептонная вода для холерного вибриона, желчный бульон для палочки брюшного тифа, солевые среды для стафилококка.

Дифференциально-диагностические питательные среды применяются для отличия одних видов бактерий от других по их ферментативной активности.

Культивирование и выделение чистых культур аэробных бактерий

Для культивирования микроорганизмов необходимы определенные условия: температура, аэробные или анаэробные условия.

Температура должна быть оптимальной для данного вида. Большинство патогенных бактерий размножаются при 37°C. Однако для некоторых видов оптимальной является более низкая температура, что связано с особенностями их экологии. Так, для палочки чумы, естественным местом обитания которой являются грызуны в период зимней спячки, оптимум температуры составляет 28°C, как и для лептоспир, для палочки ботулизма - 28°C-35°C.

Кроме оптимальной температуры, для культивирования микроорганизмов, в зависимости от вида, необходима аэробность или анаэробность среды.

Для того, чтобы изучить морфологию, Культуральные, биохимические и другие свойства микробов, необходимо получить чистую культуру. Обычно культурой микробов называют скопление их на питательной среде в виде помутнения, придонного роста или пленки на поверхности жидкой среды или колоний на плотной среде. Отдельная колония образуется из одной микробной клетки. Чистая культура - это культура микробов одного вида, полученная из одной колонии. В лабораториях для различных исследований применяют определенные известные штаммы микробов. Штамм - это чистая культура микробов, полученная из определенного источника, в определенное время, обладающая известными свойствами. Как правило, штаммы микробов обозначают определенным номером. Например, штамм *Staphylococcus aureus* 209P применяется для определения активности пенициллина.

Выделение чистых культур аэробов занимает, как правило, три дня и производится по следующей схеме:

1-й день - микроскопия мазка из исследуемого материала, окрашенного - для предварительного ознакомления с микрофлорой, что может быть полезным в выборе питательной среды для посева. Затем посев материала на поверхность застывшего питательного агара для получения изолированных колоний. Рассев можно произвести по методу Дригальского на три чашки Петри с питательной средой. Каплю материала наносят на первую чашку и распределяют шпателем по всей чашке. Затем этим же шпателем распределяют оставшуюся на нем культуру на второй чашке и таким же образом - на третьей. Наибольшее количество колоний вырастет на первой чашке, наименьшее - на третьей. В зависимости от того, сколько было микробных клеток в исследуемом материале, на одной из чашек вырастут изолированные колонии.

Такого же результата можно достигнуть, произведя рассев на одной чашке. Для этого делят чашку на четыре сектора. Исследуемый материал засевают бактериологической петлей штрихами на первом секторе, затем, прокалив и остудив петлю, распределяют посев из первого сектора во второй и таким же образом последовательно в третий и четвертый сектор. Из отдельных микробных клеток после суточного инкубирования в термостате образуются изолированные колонии.

2-й день - изучение колоний, выросших на чашках, описание их. Колонии могут быть прозрачными, полупрозрачными или непрозрачными, они имеют различные размеры, округлые правильные или неправильные очертания, выпуклую или плоскую форму, гладкую или шероховатую поверхность, ровные или волнистые, изрезанные края. Они могут быть бесцветными или иметь белый, золотистый, красный, желтый цвет. На основании изучения этих характеристик выросшие колонии разделяются на группы. Затем из исследуемой группы отбирают изолированную колонию, готовят мазок для микроскопического исследования с целью проверки однородности микробов в колонии. Из этой же колонии производят посев в пробирку со скошенным питательным агаром.

3-й день - проверка чистоты культуры, выросшей на скошенном агаре путем микроскопии мазка. При однородности исследуемых бактерий выделение чистой культуры можно считать законченным.

Для идентификации выделенных бактерий изучаются культуральные признаки, то есть характер роста на жидких и плотных питательных средах. Например, стрептококки на сахарном бульоне образуют придонный и пристеночный осадок, на кровяном агаре - мелкие, точечные колонии; холерный вибрион образует пленку на поверхности щелочной пептонной воды, а на щелочном агаре - прозрачные колонии; палочка чумы на питательном агаре образует колонии в виде «кружевных платочков» с плотным центром и тонкими волнистыми краями, а в жидкой питательной среде - пленку на поверхности, а затем - нити, отходящие от нее в виде «сталактитов».

Культивирование и выделение чистых культур анаэробных бактерий

Для культивирования анаэробов необходимо понизить окислительно-восстановительный потенциал среды, создать анаэробноз путем удаления кислорода физическими, химическими или биологическими методами.

К физическим методам можно отнести:

1) механическое удаление воздуха с помощью насоса из анаэростата, в котором помещают чашки с посевами. Одновременно можно заменить воздух индифферентным газом: азотом, водородом, углекислым газом.

2) выращивание в среде, содержащей редуцирующие вещества. Среда Китта-Тароцци - это сахарный бульон с кусочками печени или мяса. Глюкоза и кусочки органов обладают редуцирующей способностью. Среду заливают сверху слоем вазелинового масла, чтобы преградить доступ кислорода воздуха.

3) Наиболее простой, но менее надежный способ - выращивание в глубине высокого столбика сахарного агара.

Химические методы заключаются в том, что чашки с посевами анаэробов ставят в герметически закрытый эксикатор, куда помещают химические вещества, например, пирогаллол и щелочь, реакция между которыми идет с поглощением кислорода.

Биологический метод основан на одновременном выращивании анаэробов и аэробов на плотных питательных средах в чашках Петри, герметически закрытых после посева. Вначале кислород поглощается растущими аэробами, а затем начинается рост анаэробов.

Выделение чистой культуры анаэробов начинают с накопления анаэробных бактерий путем посева на среду Китта-Тароцци. В дальнейшем получают изолированные колонии одним из двух способов:

1) посев материала производят путем смешивания с расплавленным теплым сахарным агаром в стеклянных трубках. После застывания агара в глубине его вырастают изолированные колонии, которые извлекают путем распила трубки и пересевают на среду Китта-Тароцци;

2) посев материала производят на чашки с питательной средой и инкубируют в анаэростате. Выросшие на чашке изолированные колонии пересевают на среду Китта-Тароцци.

Культивирование других микроорганизмов

Культивирование микоплазм

Микоплазмы культивируются на питательных средах с добавлением сыворотки и углеводов. Поскольку микоплазмы лишены клеточной стенки, они растут только в изотонических или гипертонических средах. На плотных питательных средах в течение нескольких суток образуются очень мелкие колонии, напоминающие яичницу-глазунью - с выпуклым центром и плоской полупрозрачной периферией. Микоплазмы можно выращивать также на курином эмбрионе или культуре клеток.

Культивирование риккетсий и хламидий

Риккетсии и хламидий - облигатные внутриклеточные паразиты. Для их культивирования используют культуры клеток, куриный эмбрион и заражение животных.

Культивирование грибов

Для культивирования грибов применяют плотные и жидкие питательные среды: чаще всего среду Сабуро, а также среды, содержащие пивное сусло. Грибы растут медленнее, чем бактерии, они образуют видимый рост в течение нескольких суток. Температура культивирования ниже, чем у бактерий - 22-30°C.

Культивирование спирохет и простейших

Среди спирохет наиболее легко выращивать лептоспиры, питательной средой для которых может служить вода с примесью сыворотки крови кролика. Боррелии и

трепонемы культивируют в анаэробных условиях на более сложных питательных средах, содержащих сыворотку, кусочки тканей животных.

Среди простейших культивируются на питательных средах дизентерийная амeba, лямблии, трихомонады, лейшмании, трипаномы, балантидии. Токсоплазмы культивируют в куриных эмбрионах и культурах тканей. Методы культивирования малярийных плазмодиев разрабатываются.

Работа 1.

Задание: Посеять культуру аэробных микроорганизмов на плотную питательную (МПА) среду и культивировать в условиях термостата.

Работа 2.

Задание: Посеять культуру анаэробных микроорганизмов на плотную питательную среду (агар Шедлер) и культивировать в анаэробных условиях (анаэроостат) при 37 °С.

Контрольные вопросы: 1. Методы культивирования аэробных микроорганизмов. 2. Методы культивирования анаэробных микроорганизмов. 3. Методы создания анаэробных условий.

1.2 Лабораторная работа №2 (2 часа).

Тема: «Изучение методов световой микроскопии»

1.2.1 Цель работы: Ознакомиться с методами световой микроскопии

1.2.2 Задачи работы:

1. Изучить методы светового поля
2. Изучить методы темного поля
3. Изучить фазово-контрастную микроскопию
4. Изучить люминесцентную микроскопию

1.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Культуры микроорганизмов, предметные стекла, наборы окраски по Граму, иммерсионное масло, микроскоп.

1.2.4 Описание (ход) работы:

Методы световой микроскопии. Методы микроскопии выбираются в зависимости от характера и свойств изучаемых объектов, так как последние, как отмечалось выше, влияют на контрастность изображения.

Метод светлого поля и его разновидности

Метод светлого поля в проходящем свете применяется при изучении прозрачных препаратов с включенными в них поглощающими частицами и деталями. Это могут быть, например, тонкие окрашенные срезы животных и растительных тканей, тонкие

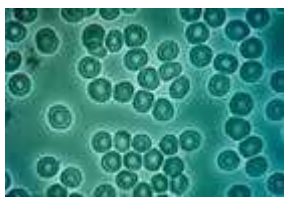


шлифы минералов и т. д. В отсутствие препарата пучок света из конденсора, проходя через объектив, даёт вблизи фокальной плоскости окуляра равномерно освещенное поле. При наличии в препарате абсорбирующего элемента происходит частичное поглощение и частичное рассеивание падающего на него света, что и обуславливает появление изображения. Возможно применение метода и при наблюдении неабсорбирующих объектов, но лишь в том случае, если они рассеивают освещающий пучок настолько сильно, что значительная часть его не попадает в объектив.

Метод косого освещения - разновидность предыдущего метода. Отличие между ними состоит в том, что свет на объект направляют под большим углом к направлению наблюдения. Иногда это помогает выявить «рельефность» объекта за счёт образования теней.

Метод светлого поля в отражённом свете применяется при исследовании непрозрачных отражающих свет объектов, например шлифов металлов или руд. Освещение препарата производится сверху, через объектив, который одновременно играет и роль конденсора. В изображении, создаваемом в плоскости объективом совместно с тубусной линзой, структура препарата видна из-за различия в отражающей способности её элементов; на светлом поле выделяются также неоднородности, рассеивающие падающий на них свет.

Метод темного поля и его разновидности



Метод тёмного поля в проходящем свете используется для получения изображений прозрачных неабсорбирующих объектов, которые не могут быть видны, если применить метод светлого поля. Зачастую это биологические объекты. Свет от осветителя и зеркала направляется на препарат конденсором специальной конструкции — т. н. конденсором тёмного поля. По выходе из конденсора основная часть лучей света, не изменившая своего направления при прохождении через прозрачный препарат, образует пучок в виде полого конуса и не попадает в объектив. Изображение в микроскопе формируется при помощи лишь небольшой части лучей, рассеянных микрочастицами находящегося на предметном стекле препарата внутри конуса и прошедшими через объектив. Темнопольная микроскопия основана на эффекте **Тиндаля**, известным примером которого служит обнаружение пылинок в воздухе при освещении их узким лучом солнечного света. В поле зрения на тёмном фоне видны светлые изображения элементов структуры препарата, отличающихся от окружающей среды показателем преломления. У крупных частиц видны только светлые края, рассеивающие лучи света. Используя этот метод, нельзя определить по виду изображения, прозрачны частицы или непрозрачны, больший или меньший показатель преломления они имеют по сравнению с окружающей средой.

Проведение темнопольного исследования

Предметные стекла должны быть не толще 1,1-1,2 мм, покровные 0,17 мм, без царапин и загрязнений. При приготовлении препарата следует избегать наличия пузырьков и крупных частиц. Для темнопольной применяют более мощные осветители и максимальный накал лампы.

Настройка темнопольного освещения в основном заключается в следующем:

1. Устанавливают свет по Келеру;
2. Заменяют светопольный конденсор темнопольным;

3. На верхнюю линзу конденсора наносят иммерсионное масло или дистиллированную воду;
4. Поднимают конденсор до соприкосновения с нижней поверхностью предметного стекла;
5. Объектив малого увеличения фокусируют на препарат;
6. С помощью центрировочных винтов переводят в центр поля зрения светлое пятно (иногда имеющее затемненный центральный участок);
7. Поднимая и опуская конденсор, добиваются исчезновения затемненного центрального участка и получения равномерно освещенного светлого пятна.

Если этого сделать не удастся, то надо проверить толщину предметного стекла.

После правильной настройки света устанавливают объектив нужного увеличения и исследуют препарат.

В основе метода ультрамикроскопии лежит тот же принцип – препараты в ультрамикроскопах освещаются перпендикулярно направлению наблюдения. При этом методе можно обнаружить чрезвычайно мелкие частицы, размеры которых лежат далеко за пределами разрешающей способности наиболее сильных микроскопов. При помощи иммерсионных ультрамикроскопов удаётся зарегистрировать присутствие в препарате частиц с частотой размером до 2×10^{-9} степени м. Но форму и точные размеры таких частиц с помощью этого метода определить невозможно. Их изображения представляются наблюдателю в виде дифракционных пятен, размеры которых зависят не от размеров и формы самих частиц, а от апертуры объектива и увеличения микроскопа. Так как подобные частицы рассеивают очень мало света, то для их освещения требуются чрезвычайно сильные источники света, например угольная электрическая дуга. Ультрамикроскопы применяются в основном в коллоидной химии.

Метод фазового контраста



Метод фазового контраста и его разновидности — т. н. метод «аноптального» контраста предназначены для получения изображений прозрачных и бесцветных объектов, невидимых при наблюдении по методу светлого поля. К таковым относятся, например, живые неокрашенные животные ткани. Суть метода в том, что даже при очень малых различиях в показателях преломления разных элементов препарата световая волна, проходящая через них, претерпевает разные изменения по фазе. Не воспринимаемые непосредственно ни глазом, ни фотопластинкой, эти фазовые изменения с помощью специального оптического устройства преобразуются в изменения амплитуды световой волны, т. е. в изменения яркости, которые уже различимы глазом или фиксируются на фоточувствительном слое. Иными словами, в получаемом видимом изображении распределение яркостей воспроизводит фазовый рельеф. Получаемое таким образом изображение называется фазово-контрастным.

Фазово-контрастная микроскопия применяется также для изучения клеток культуры ткани, наблюдения действия различных вирусов на клетки и т. п. В этих случаях часто применяют биологические микроскопы с обратным расположением оптики - инвертированные микроскопы. У таких микроскопов объективы расположены снизу, а конденсор - сверху.

Метод исследования в свете люминесценции



Метод исследования в свете люминесценции состоит в наблюдении под микроскопом зелено-оранжевого свечения микрообъектов, которое возникает при их освещении сине-фиолетовым светом или не видимыми глазом ультрафиолетовыми лучами. В оптическую схему микроскопа вводятся два светофильтра. Один из них помещают перед конденсором. Он пропускает от источника-осветителя излучение только тех длин волн, которые возбуждают люминесценцию либо самого объекта, либо специальных красителей, введенных в препарат и поглощенных его частицами. Второй светофильтр, который установлен после объектива, пропускает к глазу наблюдателя только свет люминесценции. В люминесцентной микроскопии используют освещение препаратов как сверху, так и снизу, через обычный конденсор. Наблюдение при освещении сверху иногда называют «люминесцентной микроскопией в отраженном свете». Его часто используют совместно с наблюдением по фазово-контрастному методу в проходящем свете. Метод нашел широкое применение в микробиологии, вирусологии, гистологии, цитологии, в пищевой промышленности, при исследовании почв, в микрохимическом анализе, в дефектоскопии. Такое многообразие применений объясняется очень высокой цветовой чувствительностью глаза и высокой контрастностью изображения самосветящегося объекта на темном нелюминесцирующем фоне. Кроме того, информация о составе и свойствах исследуемых веществ, которую можно получить, зная интенсивность и спектральный состав их люминесцентного излучения, имеет огромную ценность.

Работа 1.

Задание. Приготовить микропрепарат (смесь *S. aureus* и *E. coli*) и окрасить по методу Грама. Провести микроскопию микропрепарата и зарисовать.

Работа 2.

Задание. Провести микроскопию готового микропрепарата с помощью люминесцентного микроскопа. Зарисовать.

Контрольные вопросы: 1. Назвать известные методы световой микроскопии. 2. Принцип микроскопии светлого поля. 3. Принцип темнопольной микроскопии. 4. Принцип фазово-контрастной микроскопии. 5. Принцип люминесцентной микроскопии.

1.3 Лабораторная работа №3 (2 часа).

Тема: «Микропрепараты. Приготовление, микроскопия. Итоговое занятие за 1 модуль»

1.3.1 Цель работы: Ознакомиться с методами приготовления и микроскопии микропрепаратов.

1.3.2 Задачи работы:

1. Изучить типы микропрепаратов
2. Изучить этапы приготовления живых препаратов

3. Изучить этапы приготовления фиксированных микропрепаратов
4. Изучить методы окраски микропрепаратов

1.3.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Культуры микроорганизмов, предметные стекла, наборы для окраски, иммерсионное масло, микроскоп, бактериологические петли, спиртовки.

1.3.4 Описание (ход) работы:

Типы микроскопических препаратов. Этапы приготовления фиксированного мазка. Простые методы окраски.

В лабораторной практике используют следующие типы микроскопических препаратов: а) бактериологический мазок; б) "висячая капля"; в) "придавленная капля"; г) тонкий мазок; д) "толстая капля"; ж) препарат-отпечаток.

Этапы приготовления фиксированного мазка.

Приготовление препаратов для микроскопического исследования.

Взятие материала для исследования. Для приготовления препарата исследуемый материал берут из пробирки, колбы или чашки Петри бактериологической петлей или стерильной пипеткой. В некоторых случаях используют для этой цели препаровальные иглы.

Пробирку с бактериальной культурой берут в левую руку, а петлю за петледержатель — в правую. Петлю прожигают в пламени горелки до покраснения. Вращательным движением вынимают из пробирки ватную пробку, прижимая ее V и IV пальцами правой руки к ладони, и обжигают край пробирки. Осторожно вводят петлю в пробирку, охлаждая ее о внутреннюю поверхность, после чего легким скользящим движением берут материал. Затем вынимают петлю из пробирки, снова обжигают ее край и затыкают пробкой. После приготовления препарата петлю обязательно прожигают в пламени. Жидкий материал из пробирки или колбы можно набирать пипеткой, удерживая ее в правой руке и закрывая отверстие II пальцем.

Приготовление фиксированных препаратов-мазков. Для приготовления препарата на обезжиренное предметное стекло наносят каплю воды или изотонического раствора хлорида натрия, в которую петлей вносят исследуемый материал и распределяют его таким образом, чтобы получить тонкий и равномерный мазок диаметром около 1—1,5 см, только при таком распределении материала в мазке можно увидеть изолированные бактериальные клетки. Если исследуемый материал содержится в жидкой среде, то петлей его непосредственно наносят на предметное стекло и готовят мазок. Мазки высушивают на воздухе или в струе теплого воздуха над пламенем горелки.

Для фиксации мазка предметное стекло медленно проводят 3 раза через пламя горелки. Микроорганизмы при фиксации погибают, плотно прикрепляясь к поверхности стекла, и не смываются при дальнейшей обработке. Более длительное нагревание может вызвать деформацию клеточных структур. Мазки крови, мазки-отпечатки органов и тканей и в некоторых случаях мазки из культур, м/озмов фиксируют погружением на 5-20 мин в метиловый синий или этиловый спирт, смесь Никифорова, сулемовый спирт или другие фиксирующие жидкости.

Простые методы окраски мазков

Фиксированный мазок окрашивают каким-либо одним красителем, например фуксином водным (1—2 мин) или метиленовым синим (3—5 мин), промывают водой, высушивают и микроскопируют.

4. Дифференциально-диагностические методы окраски микробов. Окраска по Граму, механизм и техника окраски.

Сложные методы. Включают последовательное нанесение на препарат красителей, различающихся по химическому

составу и цвету, протрав и дифференцирующих веществ. Это позволяет выявить определенные структуры клеток и дифференцировать одни виды микроорганизмов от других.

1. **По Леффлеру**- гранулы валютина окрашиваются в темно- синий, а палочка дифтерийной каринобактерии в голубой.

2. **По Нейсеру**- валютин в сине-черный, а бактерия в желтый.

3. **По Гинсу-Бурри**- обнаружение капсул

4. **По Шефферу**- Фультону- окрашивание спор.

5. **Окраска по Цилю-Нельсену**. Применяется для выявления кислото- и спиртоустойчивых микобактерий туберкулеза, лепры и некоторых актиномицетов, которые из-за большого количества в клеточных оболочках липидов, воска и оксикислот непроницаемы для разведенных растворов красителей. Окрашивание их достигается, при помощи фенолового фуксина Циля с подогреванием над пламенем горелки до закипания и отхождения паров. Окрашенные с применением термокислотной обработки кислотоустойчивые бактерии не обесцвечиваются слабыми растворами минеральных кислот и спирта. Кислоустойчивые бактерии окрашиваются в интенсивно красный цвет, остальные виды микробов, обесцвечивающиеся в процессе обработки препарата кислотой, - в светло-синий цвет.

6. **Окраска по Романовскому-Гимзе**. Осуществляется сложным красителем, в результате он окрашивает бактерии, простейшие и форменные -элементы крови в различные цвета и оттенки. Так, под его воздействием цитоплазма простейших приобретает голубой цвет, а ядра - красный: боррелии окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, а трепонемы и лептоспиры - в слабо-розовый; эритроциты - в розовый цвет, ядра лейкоцитов - в фиолетовый, а их цитоплазма - в голубой.

7. Окраска по Граму.

Из-за неодинакового содержания пептидогликана (ПГ) в оболочках разных прокариот метод дает возможность подразделять их на грамположительные и грамотрицательные. В соответствии с этим, во-первых, в царстве прокариот выделяют четыре раздела: 1. тонкостенные, грамотрицательные. 2. толстостенные, грамположительные. 3. лишенные стенок. 4. дефектные стенки, отсутствие пептидогликана. Во-вторых, окраска по Граму позволяет также установить родовую и видовую принадлежность многих возбудителей инфекционных болезней.

Техника окраски по Граму:

1. Наносим на фиксированный мазок через фильтровальную бумажку раствор генцианвиолетта на 2-3 минуты. У грам+ м/о генцианвиолет проникает вглубь клеточной стенки и образует прочный комплекс с трихоевыми кислотами и Мгниевыми солями РНК, у грам- краситель проникает в клеточную стенку.

2. Промываем водой – для удаления излишков красителя

3. Наносим раствор Люголя на 1 минуту – для удаления остатков влаги и укрепления образовавшейся связи у грам+.
4. Сливаем, не промывая водой.
5. Наносим раствор этилового 96% спирта на 30 секунд, равномерно покачиваем для отхождения фиолетовых пятен. Из грам- вымывается краситель.
6. Промыть под водой
7. Наносим раствор фуксина на 2-3 минуты для окраски обесцвечившихся грам- м/о
8. Промыть водой

Работа 1.

Задание: Приготовить препарат (*B. subtilis*) и окрасить по методу Циль-Нельсена и провести микроскопию. Зарисовать.

Работа 2.

Задание: Приготовить препарат (Дрожжи) и окрасить простым методом и провести микроскопию. Зарисовать.

Контрольные вопросы:

1. Типы микроскопических препаратов.
2. Этапы приготовления фиксированных препаратов.
3. Простые методы окраски препаратов.
4. Сложные методы окраски.
5. Методы культивирования аэробных микроорганизмов.
6. Методы культивирования анаэробных микроорганизмов.
7. Методы создания анаэробных условий.
8. Назвать известные методы световой микроскопии.
9. Принцип микроскопии светлого поля.
10. Принцип темнопольной микроскопии.
11. Принцип фазово-контрастной микроскопии.
12. Принцип люминесцентной микроскопии.

1.4 Лабораторная работа №4 (2 часа).

Тема: «Изучение ростовых характеристик микроорганизмов»

1.4.1 Цель работы: Ознакомиться с методами изучения ростовых характеристик микроорганизмов

1.4.2 Задачи работы: Освоить методы изучения ростовых характеристик микроорганизмов

1.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Культуры микроорганизмов, чашки с плотной питательной средой, пробирки с жидкой питательной средой, бактериологические петли, спиртовки.

1.4.4 Описание (ход) работы:

Каждому виду микробов свойственен определенный характер колоний. Так, кишечная палочка образует колонии средней величины, полупрозрачные с голубоватым оттенком, а стафилококки — мелкие, плотные, желтоватого или белого цвета. Нередко характер колонии имеет диагностическое значение для определения вида микробов. Рост микробов на скошенном агаре. На скошенном агаре рост изучают невооруженным глазом и отмечают те же характерные особенности, что и при исследовании колоний. Следует различать рост пышный, скудный и умеренный; непрозрачный, прозрачный и полупрозрачный; влажный, матовый и сухой; бесцветный, сероватобелый или с наличием пигмента.

Рост при посеве уколом в столбик среды. При росте по ходу укола в столбике агара обычно наблюдается форма роста по Линии укола. Она может быть нитевидная с боковыми разветвлениями или без них и четкообразная. При росте на желатине отмечают еще наличие или отсутствие разжижения. Если наблюдаются разжижение, то характер его может быть различным: кратерообразное разжижение, воронкообразное и послойное, т. е. идущее сверху, горизонтально, по направлению вниз. Методом посева уколом в столбик питательной среды можно определить подвижность бактерий. Для этого исследуемую культуру засевают в столбик полужидкой питательной среды (0,25% агар, полужидкие углеводные среды). Посев ставят в термостат на 24 часа. Если бактерии не имеют жгутиков, то рост будет только вдоль линии укола или в виде пальцеобразных выростов. У подвижных бактерий рост — диффузный, по всей толщине питательной среды. Рост на жидких средах. По интенсивности роста на бульоне различают: рост обильный, умеренный и скудный; по характеру — равномерная муть, осадок или пленка на поверхности. Осадок бывает зернистый, порошковидный, хлопьевидный, пленчатый и вязкий. Пленка на бульоне может быть очень нежной, как облачко, плотной, сухой и морщинистой.

Рост на молоке. При росте на молоке может не произойти никаких видимых изменений, и тогда рост микробов определяют путем бактериоскопического исследования молока. Большая группа микробов вызывает свертывание молока или пептонизацию.

Работа

Задание: Провести посев культуры микроорганизмов на плотную и жидкую питательную среду. Охарактеризовать ростовые характеристики микроорганизмов. Составить протокол.

Контрольные вопросы: 1. Ростовые характеристики микроорганизмов на плотной питательной среде. 2. Ростовые характеристики микроорганизмов в жидкой питательной среде.

1.5 Лабораторная работа №5 (2 часа).

Тема: «Определение антибиотикочувствительности микроорганизмов»

1.5.1 Цель работы: Ознакомиться с методами определения антибиотикочувствительности микроорганизмов

1.5.2 Задачи работы:

1. Освоить метод индикаторных дисков
2. Освоить метод серийных разведений

1.5.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Культуры микроорганизмов, чашки Петри с плотной питательной средой, бактериологические петли, физиологический раствор, пробирки, пипетки, пинцет, спиртовки, диски с антибиотиками.

1.5.4 Описание (ход) работы:

Методы изучения антибиотикочувствительности

Критерием чувствительности микроорганизмов к антибиотикам является минимальная концентрация антибиотика, ингибирующая рост возбудителя при стандартных условиях постановки опыта. При определении лекарственной устойчивости используют чистую культуру возбудителя, выделенную до начала лечения антибиотиками, т. к. под их воздействием рост микроорганизмов полностью угнетен. Изучение чувствительности проводят методом диффузии в агар с применением стандартных дисков или методом серийных разведений в жидких и плотных питательных средах.

Диско-диффузионный метод. Исследуемую бактериальную культуру засевают газоном на питательный агар в чашке Петри.

На засеянную поверхность пинцетом помещают на одинаковом расстоянии друг от друга бумажные диски, содержащие определенные дозы разных антибиотиков. Посев инкубируют при 37° С до следующего дня. По диаметру зон задержки роста исследуемой культуры бактерий судят о ее чувствительности к антибиотикам.

Для получения достоверных результатов необходимо применять стандартные диски и питательные среды, для контроля которых используются эталонные штаммы соответствующих микроорганизмов.

Метод дисков не дает надежных данных при определении чувствительности микроорганизмов к плохо диффундирующим в агар полипептидным антибиотикам. Если эти антибиотики предполагается использовать для лечения, рекомендуется определять чувствительность методом серийных разведений.

Метод серийных разведений. Данным методом определяют минимальную концентрацию (МИК) антибиотика, ингибирующую рост исследуемой культуры бактерий. Вначале готовят основной раствор, содержащий определенную концентрацию антибиотика (мкг/мл или ЕД/мл) в специальном растворителе или буферном растворе. Из него готовят все последующие разведения в бульоне (в объеме 1 мл), после чего к каждому разведению добавляют 0,1 мл исследуемой бактериальной суспензии, содержащие 10^6 - 10^7 бактериальных клеток в 1 мл. В последнюю пробирку вносят 1 мл бульона и 0,1 мл суспензии бактерий (контроль культуры). Посевы инкубируют при 37° С

до следующего дня, после чего отмечают результаты опыта по помутнению питательной среды, сравнивая с контролем культуры. Последняя пробирка с прозрачной питательной средой указывает на задержку роста исследуемой культуры бактерий под влиянием содержащейся в ней минимальной ингибирующей концентрации антибиотика.

Номер пробирки	Разведение антибиотика	концентрация антибиотика, мкг/мл	Исследуемая культура, мл	рост бактерий (помутнение среды)
1	1:100	100	0,1	-
2	1:200	50	0,1	-
3	1:400	25	0,1	-
4	1:800	12,5	0,1	-
5	1:1600	6,25	0,1	+
6	1:3200	3,12	0,1	+
7	1 мл бульона без антибиотика		0,1	+(контроль)

Оценку результатов определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам проводят по таблице, которая содержит пограничные значения диаметров зон задержки роста для устойчивых, умеренно устойчивых и чувствительных штаммов, а также значения МИК антибиотиков для устойчивых и чувствительных штаммов.

К чувствительным относятся штаммы микроорганизмов, рост которых подавляется при концентрациях препарата, обнаруживаемых в сыворотке крови больного при использовании обычных доз антибиотиков. К умеренно устойчивым относятся штаммы, для подавления роста которых требуются концентрации создающиеся в сыворотке крови при введении максимальных доз препарата Устойчивыми являются микроорганизмы, рост которых не подавляется препаратом в концентрациях, создаваемых в организме при использовании максимально допустимых доз.

Работа

Задание: Определить чувствительность *S. aureus* к антибиотикам методом индикаторных дисков. Учесть результат. Оформить протокол.

Контрольные вопросы. 1. Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. 2. Принцип диско-диффузионного метода. 3. Принцип метода серийных разведений.

1.6 Лабораторная работа №6 (2 часа).

Тема: «Определение чувствительности микроорганизмов к фагам»

1.6.1 Цель работы: Ознакомиться с методами определения чувствительности микроорганизмов к бактериофагам

1.6.2 Задачи работы: Освоить методы определения чувствительности микроорганизмов к бактериофагам

1.6.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Культуры микроорганизмов, чашки Петри с плотной питательной средой, пробирки, физиологический раствор, бактериофаг, бактериологические петли, спиртовки.

2.6.4 Описание (ход) работы:

Методика определения чувствительности бактерий к бактериофагам

Основные этапы проведения тестирования

Оценка чувствительности микроорганизмов к бактериофагам включает последовательное выполнение нескольких этапов лабораторной работы:

- Приготовление питательных сред;
- Приготовление суспензий исследуемых микроорганизмов;
- Посев микроорганизма на питательные среды и последующее нанесение бактериофагов;
- Инкубация;
- Учет и интерпретация результатов, формулировка заключения по чувствительности конкретного микроорганизма к действию конкретного бактериофага.

Питательные среды. Используются стандартные питательные среды. В зависимости от вида типизируемого микроорганизма, выбирают питательные среды, на которых исследуемый микроорганизм через минимальное для данного вида время инкубации при оптимальной температуре дает хороший, видимый глазом рост. Питательная среда готовится из сухой среды промышленного производства в соответствии с инструкцией изготовителя. После автоклавирования питательную среду разливают в стерильные чашки Петри любого диаметра, в зависимости от объема исследования. Среда разливается в чашки слоем не более 4 мм. Чашки оставляют при комнатной температуре для застывания и подсушивания для того, чтобы хорошо впитывался фаголизат и испарился конденсат. Неиспользованные чашки с агаром хранят в условиях холодильника при $+4 - +8^{\circ}\text{C}$. Допускается использование чашек с готовой питательной средой, расфасованных в чашки производителем.

Приготовление суспензии исследуемых микроорганизмов. Необходимым условием для любых методов тестирования микроорганизмов является стандартизация суспензии исследуемого микроорганизма. Для определения чувствительности бактерий к бактериофагам, желательно, чтобы концентрация микроорганизмов в инокуляте составляла $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл, как и при определении чувствительности к АБП. Приготовление инокулята осуществляется в соответствии с МУК 4.12.1890-04. Бактериальную суспензию можно готовить как из бульонной, так и из агаровой культуры.

Посев бактериальной культуры на агаризованную питательную среду. На сухую поверхность питательной среды наносят бактериологической петлей или пипеткой бактериальную культуру. Культура может быть засеяна газоном на всю чашку или на сектор или в виде капли. В зависимости от объема исследования, на одну чашку Петри секторально могут быть засеяны несколько бактериальных культур.

Через несколько минут после подсыхания культуры на поверхность каждого сектора с засеянными бактериальными культурами наносят капли исследуемого бактериофага.

При необходимости определения чувствительности к нескольким фагам капли фагов должны располагаться на расстоянии, исключающем слияние капель.

Для нанесения фагов удобно использовать пастеровские пипетки, шприцы с иглами, капельницы. Не следует закрывать и переворачивать чашки, пока капли фага не впитаются в агар.

При определении чувствительности энтеробактерий одновременно к нескольким фагам, во избежание слияния зон лизиса, рекомендуется осуществлять посев тестируемой культуры в виде отдельных, не смыкающихся между собой штрихов по числу тестируемых фагов. Капля каждого фага наносится в середину отдельного штриха.

Инкубация. После высыхания капель нанесенных бактериофагов чашки переворачивают агаром вверх и инкубируют в термостате при 37°C или другой температуре, оптимальной для роста микроорганизма.

Учет и интерпретация результатов, формулировка заключения по чувствительности микроорганизма к действию конкретного бактериофага

Первый учет результатов можно произвести уже после 6-7 часов инкубации. В экстренных случаях это позволяет сообщать о результатах чувствительности в день постановки опыта. Вторую и окончательную оценку полученных результатов проводят через 18-24 часа. Посевы просматривают и отмечают в случае высокой чувствительности микроорганизма к бактериофагу, появление на месте капли фага «стерильного пятна». Как только бактериальные клетки достигают стационарной фазы, бляшки перестают увеличиваться. «Негативные колонии» могут иметь характерную для определенного фага форму, по которой можно дифференцировать различные фаги.

Реакции лизиса учитывают невооруженным глазом при прямом освещении или под углом в 45°. Результаты лучше оценивать при дневном свете. Сомнительные или отрицательные проявления взаимодействия бактерии и фага контролируют, пользуясь ручной лупой.

При низкой активности бактериофагов или наличия феномена лизогенности изучаемого микроорганизма могут наблюдаться и другие результаты взаимодействия бактериофага с изучаемым микроорганизмом: полусливной лизис, отдельные негативные колонии и полное отсутствие лизиса.

В зависимости от полученных результатов в заключении указывается степень чувствительности конкретного микроорганизма к действию конкретного бактериофага:

1. Исследуемый микроорганизм чувствителен к бактериофагу – в месте нанесения фага наблюдается сплошная негативная колония;
2. Исследуемый микроорганизм слабо чувствителен к бактериофагу - в месте нанесения фага наблюдаются отдельные негативные колонии фагов или рост отдельных колоний бактерий на фоне негативной колонии фага;
3. Исследуемый микроорганизм не чувствителен к бактериофагу – полное отсутствие следов лизиса.

Распространенной практикой является оценка литической активности фага по пятибалльной шкале:

- «-» отсутствие литической активности;
- «+» низкая активность;
- «++» образование зоны лизиса с большим количеством колоний вторичного роста бактерий;

«+++» зона лизиса с единичными колониями вторичного роста;

«++++» прозрачная зона лизиса без колоний вторичного роста.

При назначении бактериофага допускается использование только препарата, обладающего литической активностью не менее «+++».

Контроль качества определения чувствительности

При определении чувствительности микроорганизмов к бактериофагам необходимо включать в исследование процедуры внутреннего контроля качества.

Достоверность результатов исследования подтверждается следующими контролями:

- Контроль активности. На поверхности роста микроорганизма и капли фага отмечается «сливной лизис» в виде капли, хорошо видимый глазом.
- Контроль чистоты роста тестируемого штамма микроорганизма. При подозрении на смешанный рост микроорганизмов результаты оценки чувствительности к бактериофагам не учитываются. Исследование следует повторить после получения чистой культуры микроорганизма.
- Контроль на лизогенность штаммов микроорганизмов – иногда требуется контроль наличия в штаммах микроорганизма умеренных бактериофагов.

Работа

Задание: Провести учет чувствительности микроорганизмов к бактериофагам (готовая чашка), зарисовать. Оформить протокол.

Контрольные вопросы:

1. Ростовые характеристики микроорганизмов на плотной питательной среде.
2. Ростовые характеристики микроорганизмов в жидкой питательной среде.
3. Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.
4. Принцип диско-диффузионного метода.
5. Принцип метода серийных разведений.
6. Метод определения чувствительности микроорганизмов к бактериофагам.
7. Учет чувствительности микроорганизмов к бактериофагам и контроль учета.

1.7 Лабораторная работа №7 (2 часа).

Тема: «Методы идентификации микроорганизмов»

1.7.1 Цель работы: Ознакомиться с существующими методами идентификации микроорганизмов

1.7.2 Задачи работы:

1. Изучить биохимические методы идентификации микроорганизмов
2. Изучить молекулярно-генетические методы идентификации микроорганизмов

1.7.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Культуры микроорганизмов, пробирки, физиологический раствор, тест-системы для идентификации микроорганизмов, предметные стекла, набор окраски по Граму, иммерсионное масло, микроскоп.

2.7.4 Описание (ход) работы:

Идентификация — определение видовой принадлежности микроба. В настоящее время общепринятый метод идентификации основан на изучении определенного набора наиболее важных фенотипических признаков исследуемого микроорганизма. Критерием для идентификации является наличие у микроба совокупности основных признаков, характерных для данного вида. Установление вида производится согласно международной таксономии бактерий.

К основным видовым признакам бактерий относятся:

- морфология микробной клетки;
- тинкториальные свойства — особенности окрашивания с помощью простых и сложных методов окраски;
- культуральные признаки — особенности роста микроба на питательных средах;
- биохимические признаки — наличие у бактерий ферментов, необходимых для синтеза или расщепления различных химических соединений.

В бактериологической практике чаще всего изучают сахаролитические и протеолитические ферменты.

К дополнительным признакам, используемым при идентификации, относятся:

- наличие видоспецифических антигенов ;
- чувствительность к видоспецифическим бактериофагам
- видовая резистентность к определенным антимикробным препаратам.
- для патогенных бактерий — продукция определенных факторов вирулентности

Тонкая внутривидовая идентификация до биовара — титрование — основана на выявлении соответствующего маркера: антигена, чувствительности к типовому бактериофагу и др.

В последние годы разработаны и начали применяться современные биохимические и молекулярно-биологические методы идентификации: хемоидентификация, анализ нуклеиновых кислот: рестрикционный анализ, гибридизация, полимеразная цепная реакция (ПЦР), риботипирование и др.

Биохимическая идентификация. Для оценки биохимической активности бактерий используют следующие реакции:

- 1) ферментацию — неполное расщепление субстрата до промежуточных продуктов, например ферментацию углеводов с образованием органических кислот;
2. окисление — полное расщепление органического субстрата до CO_2 и H_2O ;
3. ассимиляцию — использование субстрата для роста в качестве источника углерода или азота;
4. диссимиляцию субстрата;
5. гидролиз субстрата.

Классический метод идентификации микробов по биохимическим признакам заключается в посеве чистой культуры на дифференциально-диагностические

среды, содержащие определенные субстраты, с целью оценки способности микроорганизма ассимилировать данный субстрат или определения конечных продуктов его метаболизма. Исследование занимает не менее 1 сут. Примером является оценка сахаролитической активности бактерий с помощью посева на среды Гисса— **короткий и длинный "пестрый ряд"**.

Идентификация бактерий по биохимическим признакам с помощью сред "пестрого ряда". **Короткий "пестрый ряд"** включает жидкие среды Гисса с моно- и дисахаридами: глюкозой, лактозой, сахарозой, мальтозой и с 6-атомным спиртом — маннитом. **В длинный "пестрый ряд"** наряду с перечисленными углеводами вводят среды с разнообразными моносахаридами и спиртами. Для оценки способности бактерий ферментировать углевод в среды добавляют индикатор, позволяющий выявить образование кислых продуктов расщепления, и "поплавок" для обнаружения выделения

Чистую культуру исследуемого микроорганизма засевают петлей в среды "пестрого ряда". Посевы инкубируют при 37 °С в течение 18—24 ч или больше. В том случае, если бактерии ферментируют углевод до образования кислых продуктов, наблюдается изменение цвета среды; при разложении углевода до кислоты и газообразных продуктов наряду с изменением цвета появляется пузырек газа в поплавке. Если используют среды с полужидким агаром, то образование газа регистрируется по разрыву столбика. При отсутствии ферментации цвет среды не меняется. Поскольку бактерии ферментируют не все, а только определенные для каждого вида углеводы, входящие в состав сред Гисса, наблюдается довольно пестрая картина, поэтому набор сред с углеводами и цветным индикатором называют "пестрым рядом".

Для определения протеолитических ферментов производят посев культуры бактерий уколом в столбик 10—20 % **желатина, пептонную воду**. Посевы в желатине инкубируют при 20—22 °С в течение нескольких дней. При наличии протеолитических ферментов бактерии разжижают желатин, образуя фигуру, напоминающую воронку или елочку.

В посевах в пептонную воду определяют продукты расщепления аминокислот после инкубирования в течение 2—3 сут при 37 °С путем *постановки реакций на аммиак, индол, сероводород и др.*

Реакция на аммиак. Узкую полоску лакмусовой бумаги укрепляют под пробкой так, чтобы она не соприкасалась с питательной средой. Посинение бумаги свидетельствует об образовании аммиака.

Реакция на индол. Способ Эрлиха: в пробирку с культурой бактерий прибавляют 2—3 мл эфира, содержимое энергично перемешивают и добавляют несколько капель реактива Эрлиха. В присутствии индола наблюдается розовое окрашивание, при осторожном наклонивании образуется розовое кольцо .

Реакция на сероводород. В пробирку с пептонной водой помещают узкую полоску фильтровальной бумаги, смоченную сульфатом железа, и закрепляют ее под пробкой так, чтобы она не соприкасалась с питательной средой. При выделении сероводорода образуется нерастворимый сульфид железа (FeS), окрашивающий бумагу в черный цвет. Продукцию *H₂S* можно определять также путем посева культуры бактерий уколом в столбик с питательной средой, содержащей реактивы для выявления *fyS*. Положительный результат — среда приобретает черный цвет за счет образования FeS.

Обнаружение каталазы. На предметное стекло наносят каплю 1—3 % раствора пероксида водорода и вносят в нее петлю с бактериальной культурой. Каталаза разлагает пероксид водорода на кислород и воду. Выделение пузырьков газа свидетельствует о наличии у данного вида бактерий каталазы.

В бактериологической практике иногда ограничиваются изучением сахаролитических и протеолитических признаков исследуемых бактерий, если этого достаточно для их идентификации. При необходимости исследуют **другие признаки**, например способность к восстановлению нитратов, карбоксилированию аминокислот, образованию оксидазы, плазмокоагулазы, фибринолизина и других ферментов.

Результаты работ по идентификации выделенной культуры протоколируют.

Биохимические тесты 2-го поколения, основанные на применении концентрированных субстратов и более чувствительных методов обнаружения конечных продуктов реакции, позволяют выявлять ферменты, уже существующие в микробной клетке, и, таким образом, не требуют дополнительного выращивания бактерий в процессе исследования. Это позволяет существенно сократить сроки исследования.

Биохимические тесты 3-го поколения основаны на применении субстратов, меченных хромогеном или флюорохромом. Такой комплекс не окрашен или не флюоресцирует. При разрушении меченого субстрата ферментом микроба освобождается метка, что проявляется окрашиванием или флюоресценцией. Такие тесты позволяют использовать единичную бактериальную колонию, полученную при первичном посеве исследуемого материала на плотную питательную среду, для полной биохимической идентификации, т.е. сокращает процесс выделения чистой культуры до двух этапов.

В лабораторной практике применяются готовые **микротест-системы** для идентификации основных групп микроорганизмов — возбудителей заболеваний человека. В современных МТС учет результатов и их интерпретация осуществляются автоматически с помощью компьютерных систем анализа.

Биохимические и молекулярно-генетические методы идентификации. Хемоидентификация — идентификация по химическому составу микробной клетки. В состав любого организма входят 4 основных класса биомолекул: нуклеиновые кислоты, белки, углеводы и липиды.

Хемоидентификация основана в первую очередь на анализе состава микробных липидов, поскольку среди биополимеров они характеризуются наибольшим разнообразием мономеров. Это позволяет различать микробы, принадлежащие к разным видам, по количественному и качественному составу липидов. ***Анализ химического состава микробных клеток осуществляется с помощью метода хроматографии.*** Наиболее широко используют метод газожидкостной хроматографии. Ведущей областью применения метода являются идентификация анаэробных бактерий по составу жирных кислот с короткой углеродной цепью, относящихся к основным продуктам метаболизма этих микроорганизмов, а также идентификация медленно растущих бактерий и бактерий с низкой ферментативной активностью.

Молекулярно-генетические методы идентификации. Они основаны на анализе бактериальных ДНК.

1. **Рестрикционный анализ.** ДНК обрабатывают рестрикционными ферментами — специфическими эндонуклеазами, которые разрезают молекулу ДНК по определенным последовательностям нуклеотидов. Далее проводят анализ полученных фрагментов, уникальных для каждого вида микроорганизма. Метод также позволяет осуществлять внутривидовое типирование бактерий.

2. **Гибридизация ДНК.** Любой микроорганизм имеет в своем геноме определенные уникальные последовательности, которые могут быть использованы для его идентификации.

Метод обнаружения таких участков ДНК основан на способности комплементарных последовательностей нуклеиновых кислот к гибридизации. Исследование проводят с помощью нуклеиновых зондов — одностебельных фрагментов ДНК, комплементарных уникальным участкам микробного генома и несущих метку. Включение метки обеспечивает высокую чувствительность метода.

В зависимости от выбранного генетического фрагмента зонды могут быть родо-, видо- или типоспецифическими. Быстрота и высокая чувствительность метода гибридизации позволяют существенно сократить время исследования. Основной областью применения является идентификация трудно культивируемых или медленно растущих микробов. Особо следует выделить метод *риботипирования* — идентификации, основанной на анализе генов, кодирующих рибосомальные РНК.

3. **Полимеразная цепная реакция (ПЦР).** Метод ПЦР позволяет обнаруживать уникальные последовательности ДНК, присутствующие в образце в очень малых количествах. Теоретически достаточно одной копии искомой последовательности. Метод ПЦР основан на амплификации искомого участка генома микроорганизма.

Работа 1.

Задание. Провести идентификацию микроорганизмов (*E. coli*) биохимическим методом (ЕНТЕРОтест) с помощью тест-систем для идентификации микроорганизмов. Учесть результат. Оформить протокол.

Работа 2.

Задание. Учесть результат (готовый протокол) идентификации микроорганизмов молекулярно-генетическим способом (ПЦР). Оформить протокол.

Контрольные вопросы: 1. Биохимические методы идентификации микроорганизмов. 2. Молекулярно-генетические методы идентификации микроорганизмов

1.8 Лабораторная работа №8 (2 часа).

Тема: «Определение факторов патогенности микроорганизмов»

1.8.1 Цель работы: Ознакомиться с факторами патогенности микроорганизмов и методами их определения.

1.8.2 Задачи работы:. Освоить методы определения факторов патогенности микроорганизмов.

1.8.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1.8.4 Описание (ход) работы:

Патогенность — видовой признак, передающийся по наследству, закрепленный в геноме микроорганизма, в процессе эволюции паразита, т. е. это генотипический признак, отражающий потенциальную возможность микроорганизма проникать в макроорганизм и размножаться в нем, вызывать комплекс патологических процессов, возникающих при заболевании.

Фенотипическим признаком патогенного микроорганизма является его вирулентность, т.е. свойство штамма, которое проявляется в определенных условиях. Вирулентность можно повышать, понижать, измерять, т.е. она является мерой патогенности. Количественные показатели вирулентности могут быть выражены в DLM, DL. При этом учитывают вид животных, пол, массу тела, способ заражения, срок гибели.

К факторам патогенности относят способность микроорганизмов прикрепляться к клеткам (адгезия), размещаться на их поверхности (колонизация), проникать в клетки (инвазия) и противостоять факторам защиты организма (агрессия).

Адгезия является пусковым механизмом инфекционного процесса. Под адгезией понимают способность микроорганизма адсорбироваться на чувствительных клетках с последующей колонизацией. Структуры, ответственные за связывание микроорганизма с клеткой называются адгезинами и располагаются они на его поверхности. Адгезины очень разнообразны по строению и обуславливают высокую специфичность - способность одних микроорганизмов прикрепляться к клеткам эпителия дыхательных путей, других - кишечного тракта или мочеполовой системы и т.д. На процесс адгезии могут влиять физико-химические механизмы, связанные с гидрофобностью микробных клеток, суммой энергии притяжения и отталкивания. У грамотрицательных бактерий адгезия происходит за счет пилей I и общего типов. У грамположительных бактерий адгезины представляют собой белки и тейхоевые кислоты клеточной стенки. У других микроорганизмов эту функцию выполняют различные структуры клеточной системы: поверхностные белки, липополисахариды, и др.

Инвазия. Под инвазивностью понимают способность микробов проникать через слизистые, кожу, соединительно-тканые барьеры во внутреннюю среду организма и распространяться по его тканям и органам. Проникновение микроорганизма в клетку связывается с продукцией ферментов, а также с факторами подавляющими клеточную защиту. Так фермент гиалуронидаза расщепляет гиалуроновую кислоту, входящую в состав межклеточного вещества, и, таким образом, повышает проницаемость слизистых оболочек и соединительной ткани. Нейраминидаза расщепляет нейраминную кислоту, которая входит в состав поверхностных рецепторов клеток слизистых оболочек, что способствует проникновению возбудителя в ткани.

Агрессия. Под агрессивностью понимают способность возбудителя противостоять защитным факторам макроорганизма. К факторам агрессии относятся: протеазы - ферменты, разрушающие иммуноглобулины; коагулаза - фермент, свертывающий плазму

крови; фибринолизин - растворяющий сгусток фибрина; лецитиназа - фермент, действующий на фосфолипиды мембран мышечных волокон, эритроцитов и других клеток. Патогенность может быть связана и с другими ферментами микроорганизмов, при этом они действуют как местно, так и генерализовано.

Важную роль в развитии инфекционного процесса играют токсины. По биологическим свойствам бактериальные токсины делятся на экзотоксины и эндотоксины. **Экзотоксины** продуцируют как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии. По своей химической структуре это белки. По механизму действия экзотоксина на клетку различают несколько типов: цитотоксины, мембранотоксины, функциональные блокаторы, эксфолианты и эритрогемины. Механизм действия белковых токсинов сводится к повреждению жизненно важных процессов в клетке: повышение проницаемости мембран, блокады синтеза белка и других биохимических процессов в клетке или нарушении взаимодействия и взаимосоординации между клетками. Экзотоксины являются сильными антигенами, которые и продуцируют образование в организме антитоксинов.

Экзотоксины обладают высокой токсичностью. Под воздействием формалина и температуры экзотоксины утрачивают свою токсичность, но сохраняют иммуногенное свойство. Такие токсины получили название **анатоксины** и применяются для профилактики заболевания столбняка, гангрены, ботулизма, дифтерии, а также используются в виде антигенов для иммунизации животных с целью получения анатоксических сывороток.

Эндотоксины по своей химической структуре являются липополисахаридами, которые содержатся в клеточной стенке грамотрицательных бактерий и выделяются в окружающую среду при лизисе бактерий. Эндотоксины не обладают специфичностью, термостабильны, менее токсичны, обладают слабой иммуногенностью. При поступлении в организм больших доз эндотоксины угнетают фагоцитоз, гранулоцитоз, моноцитоз, увеличивают проницаемость капилляров, оказывают разрушающее действие на клетки. Микробные липополисахариды разрушают лейкоциты крови, вызывают дегрануляцию тучных клеток с выделением вазодилаторов, активируют фактор Хагемана, что приводит к лейкопении, гипертермии, гипотонии, ацидозу, дессиминированной внутрисосудистой коагуляции.

Эндотоксины стимулируют синтез интерферонов, активируют систему комплемента по классическому пути, обладают аллергическими свойствами. При введении небольших доз эндотоксина повышается резистентность организма, усиливается фагоцитоз, стимулируются В-лимфоциты. Сыворотка животного иммунизированного эндотоксином обладает слабой антитоксической активностью и не нейтрализует эндотоксин.

Патогенность бактерий контролируется тремя типами генов: гены - собственной хромосомы, гены привнесенные плазмидами умеренными фагами.

Работа

Задание: Провести микроскопию готового микропрепарата адгезии стафилококков к эритроцитам, зарисовать.

Контрольные вопросы: 1. Что относится к факторам патогенности микроорганизмов. 2. Методы определения адгезии микроорганизмов.

1.9 Лабораторная работа №9 (2 часа).

Тема: «Бактериологический метод»

1.9.1 Цель работы: Ознакомиться с бактериологическим методом диагностики

1.9.2 Задачи работы: Изучить бактериологический метод диагностики

1.9.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Чистые чашки с плотной питательной средой, чашки с плотной питательной средой и ростом микроорганизмов, пробирки со скошенным агаром, бактериологические петли, предметные стекла, физиологический раствор, набор окраски по Граму, иммерсионное масло, микроскоп, тест-системы для идентификации микроорганизмов.

1.9.4 Описание (ход) работы:

Схема проведения бактериологического метода

Принцип метода: Выделение чистой культуры возбудителя и ее идентификация.

Этапы метода: 1-й день. Взятие и посев исследуемого материала на плотные питательные среды с целью получения изолированных колоний. (Посев крови делается на жидкие питательные среды в соотношении 1:10.)

2-й день. Изучение и описание культуральных признаков (характера роста бактерий) и другие необходимые мероприятия (например, реакция агглютинации на стекле с поливалентными сыворотками) для определения колонии возбудителя и пересев этой колонии на среду накопления (скошенный агар среды Ресселя, Мюллера и др.).

3-й день. Проводится идентификация по морфологическим, культуральным, тинкториальным (окраска по Граму), по антигенному строению, факторам патогенности, фаготипированию. Ставится опыт по определению биохимических свойств и чувствительности микробов к антибиотикам.

4-й день. Учёт биохимических свойств чувствительности к антибиотикам. Дается заключение о виде выделенного возбудителя.

Большинство патогенных бактерий являются быстрорастущими: видимый рост на питательных средах наблюдается через 18-24 часа.

Продолжительность метода для бактериальных инфекций приблизительно 72 часа. Имеются отклонения в зависимости от скорости роста микроба: холерный вибрион растёт быстро - 36-48 часов, туберкулёзная палочка медленно – 2-6 недель.

Работа

Задание: Провести бактериологический метод диагностики. Оформить протокол.

Контрольные вопросы: 1. Этапы бактериологического метода исследования. 2. Схема бактериологического метода исследования. 3. Ценность бактериологического метода исследования.

1.10 Лабораторная работа №10 (2 часа).

Тема: «Изучение действия биологических факторов на микроорганизмы»

1.10.1 Цель работы: Ознакомиться с методами изучения действия биологических факторов на микроорганизмы.

1.10.2 Задачи работы: Освоить методы изучения действия биологических факторов на микроорганизмы.

1.10.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Культуры микроорганизмов, чашки Петри, пробирки, плотная питательная среда, жидкая питательная среда.

2.10.4 Описание (ход) работы:

Микроорганизмы, как и все другие существующие в природе живые существа, представлены не обособленно, а в виде многообразных ассоциаций, сообществ или популяций, которые населяют почву, воздух и воду, а так же организмы животных, человека и растения. В состав микробных ассоциаций входит большое количество разнообразных по видовому составу и различных по численности бактерий и грибов. Между ними постоянно осуществляются сложные взаимоотношения, которые выработались в процессе эволюции, направлены на выживание вида и основаны на взаимной или односторонней зависимости организмов.

Совместное существование двух или большего количества организмов называется симбиозом, а сами организмы принимающие участие в таких взаимоотношениях - симбионтами.

Симбиоз может выражаться по-разному и, поэтому, принято выделять несколько форм или вариантов взаимодействия между биологическими особями.

Мутуализм – взаимовыгодные отношения разных организмов. Классический пример таких взаимоотношений – сосуществование макроорганизма и его нормальной микрофлоры. Когда эти отношения нарушается и микрофлора гибнет, например, под влиянием антибиотиков широкого спектра действия, макроорганизм страдает в результате развития дисбактериоза. Примером мутуализма могут служить взаимоотношения одного из видов грибов рода Мукор и дрожжей из рода Родоторула. Оба этих представителя для своего развития нуждаются в витамине В₁, однако, ни один из этих видов не способен по отдельности синтезировать тиамин, так как гриб может синтезировать только один из предшественников тиамина - пиримидин, а дрожжи – другой – тиазол. В совместной культуре этих видов синтезируется тиамин и удовлетворяются потребности того и другого микроорганизма.

Метабиоз – тип взаимодействия организмов, при котором один из участников ассоциации использует для своих потребностей продукты жизнедеятельности другого. Метабиоз характерен для почвенных нитрофицирующих бактерий, которые используют для своего метаболизма аммиак – продукт жизнедеятельности аммонифицирующих бактерий.

Саттеллизм – усиление роста одного микроорганизма под влиянием другого. При совместном росте нескольких видов бактерий и грибов их физиологические функции могут активизироваться, что приводит к более быстрому воздействию на субстрат. Например, сарцины и дрожжи выделяют в питательную среду метаболиты, стимулирующие вокруг их колоний рост других микроорганизмов.

Комменсализм – это такая форма сосуществования, при которой питание микроорганизмов происходит за счет макроорганизма, который при этом, как правило, не испытывает вреда. Комменсалами являются бактерии – представители нормальной микрофлоры человека и животных. Они обильно заселяют верхние дыхательные пути, кожные покровы, кишечник. Среди бактерий комменсалов много сапрофитов, но встречаются и условно-патогенные микроорганизмы, которые могут стать возбудителями различных, чаще всего, гнойно-воспалительных заболеваний.

Синергизм – такая форма взаимоотношений микроорганизмов в биоценозе, при котором усиливаются биологические функции микробов, входящих в ассоциацию. Например, уксуснокислые бактерии в процессе метаболизма вырабатывают органические кислоты, стимулирующие размножение дрожжей.

Крайней формой проявления симбиоза является паразитизм. При этой форме взаимоотношений один из организмов использует другой в качестве источника питания и метаболирует за счет этого источника. Пример паразитизма – взаимоотношения бактерий и бактериофагов, клеток макроорганизма и внутриклеточных паразитов – вирусов, хламидий и риккетсий, которые могут существовать и репродуцироваться только за счет клетки-хозяина. Частный случай паразитизма – хищничество, например, амеба, обитающая в толстом кишечнике человека в качестве симбионта, захватывает и переваривает бактерии-сапрофиты, представители нормальной микрофлоры кишечника, которые также являются участниками данного биоценоза или ассоциации.

Одной из форм симбиоза является антагонистический симбиоз или антагонистические взаимоотношения между микроорганизмами. При этом один из партнеров в биоценозе наносит вред другому, приводит к его гибели или повреждению. Микробы-антагонисты широко распространены в окружающей среде. Антагонизм проявляется за счет большей скорости размножения, продукции органических кислот и других веществ, приводящих к изменению величины pH, выработке токсических продуктов. Среди представителей нормальной микрофлоры человека множество микроорганизмов – антагонистов. Бифидобактерии, кишечная палочка, лактобактерии – антагонисты многих патогенных микроорганизмов, в частности клостридий, энтеропатогенных бактерий, а также грибов рода *Candida*. Антимикробный потенциал бактерий-антагонистов формируется за счет их способности выделять кислоты, спирты, лизоцим, колицины и другие бактериоцины.

К распространенной форме антагонизма относится способность живых организмов к выделению антибиотиков – специфических конечных продуктов направленного синтеза клетки. Продукцию антибиотиков могут осуществлять клетки животных и растений,

бактерии, грибы, актиномицеты, лишайники. Антибиотики ингибируют жизнедеятельность многих бактерий и грибов или уничтожают их.

Работа

Задание: Провести учет антагонистической активности микроорганизмов (готовая чашка), зарисовать. Оформить протокол.

Контрольные вопросы: 1. Характеристика биологических факторов, действующих на микроорганизмы. 2. Методы изучения влияния биологических факторов на микроорганизмы.

1.11 Лабораторная работа №11 (2 часа).

Тема: «Изучение действия физических факторов на микроорганизмы»

1.11.1 Цель работы: Ознакомиться с методами изучения действия физических факторов на микроорганизмы.

1.11.2 Задачи работы: Освоить методы изучения действия физических факторов на микроорганизмы.

1.11.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1.11.4 Описание (ход) работы:

Температура является наиболее значимым фактором, оказывающим влияние на жизнедеятельность микробов. Температура, необходимая для роста и размножения бактерий одного и того же вида варьирует в широких пределах. Различают температурный оптимум, минимум и максимум.

Температурный оптимум соответствует физиологической норме данного вида микробов, при которой размножение происходит быстро и интенсивно. Для большинства **патогенных и условно-патогенных микробов** температурный оптимум соответствует 37°C .

Температурный минимум соответствует температуре, при которой данный вид микроба **не проявляет жизнедеятельность**.

Температурный максимум – температура, при которой рост и размножение прекращается, **все процессы метаболизма снижаются** и может наступить гибель.

В зависимости от температуры, оптимальной для жизнедеятельности, различают 3 группы микроорганизмов:

1) *психрофильные*, холодолюбивые, размножающиеся при температуре ниже 20°C (иерсинии, психрофильные варианты клебсиелл, псевдомонады, вызывающие заболевания человека. Размножаясь в пищевых продуктах, они более вирулентны при низких температурах);

2) *термофильные*, оптимум развития которых лежит в пределах 55°C (в организме теплокровных не размножаются и медицинского значения не имеют);

3) *мезофильные*, активно размножаются при температуре 20-40⁰С, оптимум температуры развития для них 37⁰С (патогенные для человека бактерии).

Микроорганизмы хорошо выдерживают низкие температуры. На этом основано длительное сохранение бактерий в замороженном состоянии. Однако ниже температурного минимума проявляется повреждающее действие низких температур, обусловленное разрывом клеточной мембраны кристаллами льда и приостановкой метаболических процессов.

Низкая температура приостанавливает гнилостные и бродильные процессы. Это лежит в основе консервации субстратов (в частности, пищевых продуктов) холодом.

Губительное действие высокой температуры (выше температурного максимума для каждой группы) используется при стерилизации. **Стерилизация** – обеспложивание – это процесс умерщвления на изделиях или в изделиях или удаление из объекта микроорганизмов всех видов, находящихся на всех стадиях развития, включая споры (термические и химические методы и средства). Для гибели вегетативных форм бактерий достаточно действия температуры 60⁰С в течение 20-30 мин; споры погибают при 170⁰С или при температуре 120⁰С пара под давлением (в автоклаве).

Асептика – комплекс мероприятий, направленных против возможности попадания микроорганизмов в рану, ткани, органы, полости тела больного при хирургических операциях, перевязках, инструментальных исследованиях, а также на предотвращение микробного и другого загрязнения при получении стерильной продукции на всех этапах технологического процесса.

Антисептика – комплекс лечебно-профилактических мероприятий, направленных на уничтожение микроорганизмов, способных вызвать инфекционный процесс на поврежденных или интактных участках кожи или слизистых оболочек.

Дезинфекция – обеззараживание объектов окружающей среды: уничтожение патогенных для человека и животных микроорганизмов с помощью химических веществ, обладающих антимикробным действием.

Рост и размножение микробов происходит при наличии воды, необходимой для пассивной и активного транспорта питательных веществ в цитоплазму клетки. Снижение влажности (высушивание) приводит к переходу клетки в стадию покоя, а затем к гибели. Наименее устойчивыми к высушиванию являются патогенные микроорганизмы – менингококки, гонококки, трепонемы, бактерии коклюша, ортомиксо-, парамиксо- и герпес-вирусы. Микобактерии туберкулеза, вирус натуральной оспы, сальмонеллы, актиномицеты, грибы устойчивы к высушиванию. Особой устойчивостью к высушиванию обладают споры бактерий. Устойчивость к высушиванию повышается, если микробы предварительно замораживают. Для сохранения жизнеспособности и стабильности свойств микроорганизмов в производственных целях используется метод **лиофильной сушки** - высушивание из замороженного состояния под глубоким вакуумом.

В процессе лиофилизации производят: 1) предварительное замораживание материала при t-40⁰- -45⁰С в спиртовых ваннах в течение 30-40 мин; 2) осуществляют сушку из замороженного состояния в вакууме в сублимационных аппаратах в течение 24-28 часов.

Процесс высушивания имеет 2 фазы: сублимация льда при tниже 0⁰С и десорбцию - удаление части свободной и связанной воды при tвыше 0⁰С.

Лиофилизацию используют для получения сухих препаратов, когда не происходит денатурации белков и не изменяется структура материала (антисыворотки, вакцины, сухая бактериальная масса). В лабораторных условиях лиофилизированные культуры микробов сохраняются в течение 10-20 лет, причем культура остается чистой и не подвергается мутациям.

Прокаливание производят в пламени спиртовки или газовой горелки. Этим способом стерилизуют бактериологические петли, препаровальные иглы, пинцеты и некоторые другие инструменты.

Кипячение применяют для стерилизации шприцев, мелкого хирургического инструментария, предметных, покровных стекол и т.д. Стерилизацию проводят в стерилизаторах, в которые наливают воду и доводят ее до кипения. Для устранения жесткости и повышения температуры кипения к воде добавляют 1-2% бикарбонат натрия. Инструменты обычно кипятят в течение 30 мин. Данный метод не обеспечивает полной стерилизации, так как споры бактерий при этом не погибают.

Пастеризация - стерилизация при 65-70°C в течение 1 часа для уничтожения бесспоровых микроорганизмов (молоко освобождается от бруцелл, микобактерий туберкулеза, шигелл, сальмонелл, стафилококков) Хранят на холоде

Тиндализация - дробная стерилизация материалов при 56-58°C в течение 1 часа 5-6 дней подряд. Применяется для стерилизации легко разрушающихся при высокой температуре веществ (сыворотка крови, витамины и др.).

Действие **лучистой энергии** на микроорганизмы. Солнечный свет, особенно его ультрафиолетовый и инфракрасный спектры, губительно действуют на вегетативные формы микробов в течение нескольких минут.

Инфракрасное излучение используется для стерилизации объектов, которая достигается за счет теплового воздействия температурой 300°C в течение 30 мин. Инфракрасные лучи оказывают воздействие на свободнорадикальные процессы, в результате чего нарушаются химические связи в молекулах микробной клетки.

Для дезинфекции воздуха помещений лечебно-профилактических учреждений и аптек широко используются ртутно-кварцевые и ртутно-увиолевые лампы, являющиеся источником ультрафиолетовых лучей. При действии УФЛ с длиной волны 254 нм в дозе 1,5-5 мкВт/с на 1 см² при 30-ти минутной экспозиции погибают все вегетативные формы бактерий. Повреждающее действие УФ излучения вызвано повреждением ДНК микробных клеток, приводящим к мутациям и гибели.

Ионизирующая радиация обладает мощным проникающим и повреждающим действием на клеточный геном микробов. Для стерилизации инструментов одноразового использования (игл, шприцев) используют гамма-излучение, источником которого являются радиоактивные изотопы ⁶⁰Со и ¹³⁷Ссв дозе 1,5-2 МН.рад. Этим методом стерилизуют также системы переливания крови и шовный материал. Действие ультразвука в определенных частотах на микроорганизмы вызывает деполимеризацию органелл клетки, денатурацию входящих в их состав молекул в результате локального нагревания или повышения давления. Стерилизация объектов ультразвуком осуществляется на промышленных предприятиях, так как источником УЗ являются мощные генераторы. Стерилизации подвергаются жидкие среды, в которых убиваются не только вегетативные формы, но и споры.

Стерилизация фильтрованием - освобождение от микробов материала, который не может быть подвергнут нагреванию (сыворотка крови, ряд лекарств). Используются фильтры с очень мелкими порами, не пропускающими микробы: из фарфора (фильтр Шамберлена), каолина, асбестовых пластинок (фильтр Зейтца). Фильтрование происходит под повышенным давлением, жидкость нагнетается через поры фильтра в приемник или создается разрежение воздуха в приемнике и жидкость всасывается в него через фильтр. К фильтрующему прибору присоединяется нагнетающий или разрежающий насос. Прибор стерилизуют в автоклаве.

Работа № 1. Методы и режим стерилизации различных материалов

Цель: изучить методы стерилизации различных материалов.

Разработать и занести в тетрадь таблицу «Методы и режим стерилизации различных материалов».

Дано: таблица.

МЕТОДЫ И РЕЖИМ СТЕРИЛИЗАЦИИ РАЗЛИЧНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Метод стерилизации	Аппаратура	Температура	Время (мин)	Ма териал
Кипячение				
Прокаливание				
Автоклавирование				
Сухим жаром				
Пастеризация				
Тиндализация				
Фильтрование				
Лиофильная сушка				
Лучистая энергия				
Ионизирующая радиация				

Вывод:

Работа № 2. Контроль эффективности стерилизации

Цель: оценить качество работы автоклава. Объяснить механизм стерилизации.

Дано: методические рекомендации, опыт № 1.



Результат:

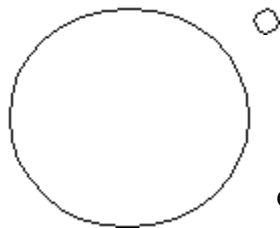
«К» «О»

Вывод:

Работа № 3. Определение чувствительности микроорганизмов к антисептикам

Цель: оценить чувствительность микробных клеток к антисептикам. Объяснить механизм действия антисептика в каждом конкретном случае. Зарисовать. Сделать вывод.

Дано: опыт № 2 (посев кишечной палочки с внесенными антисептиками - йод, метиленовый синий, карболовая кислота, хлорамин); таблица «Классификация антисептиков по механизму действия».



Результат:

Вывод:

Контрольные вопросы: 1. Характеристика физических факторов, действующих на микроорганизмы. 2. Методы изучения влияния физических факторов на микроорганизмы.

1.12 Лабораторная работа №12 (2 часа).

Тема: «ПЦР и ее применение в микробиологии»

1.12.1 Цель работы: Ознакомиться с ПЦР и ее применением в микробиологии.

1.12.2 Задачи работы: Изучить ПЦР и ее применение в микробиологии

1.12.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Культуры микроорганизмов, ПЦР-лаборатория, готовый протокол ПЦР, ноутбук, мультимедиа аппаратура.

1.12.4 Описание (ход) работы:

Полимеразная цепная реакция (ПЦР, PCR) – это метод ферментативного получения амплификаций (большого количества копий) исследуемых фрагментов ДНК путем повторных циклов репликации и денатурации (разделения цепи ДНК на отдельные нити), при этом происходит копирование только исследуемого участка ДНК, поскольку только этот участок соответствует заданным условиям и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце.

Первоначально сам принцип метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) был разработан Кэри Мюллісом в 1983г. Открытие ПЦР стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии за последние 20 лет, и за разработку ПЦР-анализа Кэрри Мюлліс уже в 1993 г. был удостоен Нобелевской премии в области химии.

Для осуществления, указанных в определении процессов, необходимы три ключевых компонента: (1) служащая матрицей молекула ДНК, содержащая исследуемый фрагмент; (2) ДНК-полимераза*, то есть фермент для производства копий ДНК и нуклеотиды, используемые ДНК-полимеразой для синтеза ДНК; (3) два праймера ПЦР** – два коротких сегмента однонитевой нуклеиновой кислоты, комплементарных началу исследуемого фрагмента ДНК (обычно это последовательности из 15-20 оснований, присоединяясь к этому фрагменту, праймеры позволяют запустить синтез ДНК, поскольку ДНК-полимераза способна только добавлять звенья).

процедура ПЦР включает несколько высокотемпературных этапов, поэтому используются термостабильные ДНК-полимеразы; они выделяются из термостойких бактерий, живущих в горячих источниках при температурах до 90°C; чаще всего это Taq-полимераза бактерий *Thermus aquanticus*, Tth-полимераза (*Thermus thermophilus*), Pwo-полимераза (*Puycossus woesei*); в настоящее время в ПЦР часто используются смеси полимераз с различными свойствами, включая искусственно полученные модификации природных ферментов

праймеры можно заказать в биохимической компании или синтезировать с помощью автоматизированного аппарата, задав программу требуемой последовательности нуклеотидов

Так как процесс ПЦР требует постоянной смены циклов с несколькими разными температурами, современные аппараты для ПЦР – термоциркуляторы - работают в режиме быстрого изменения температуры реакционной смеси по заданной программе и способны амплифицировать фрагмент ДНК длиной от 100 до 3000 пар оснований в течение нескольких часов, начиная с микрограмма ДНК (что оптимально), но могут начать процесс и с миллионной доли микрограмма. В крайнем случае, можно использовать в качестве исходного материала ДНК из одной клетки, такой как клетка спермы, и получить более 100 млрд. копий исследуемого фрагмента.

Помимо простого увеличения числа копий ДНК ПЦР позволяет производить множество других манипуляций с генетическим материалом: изменение оснований, сращивание фрагментов ДНК и т.д.

Проведение ПЦР-анализа (PCR diagnostics) начинается с забора материала для исследования. Забранный материал со щеточки помещают в контейнер с физраствором. После забора пробы как можно скорее должны быть доставлены в ПЦР - лабораторию.

Проведение в лаборатории ПЦР-анализа происходит в три этапа: (1) выделение ДНК; (2) амплификация ДНК-фрагментов; (3) детекция ДНК-продуктов амплификации.

Выделение ДНК - это первоначальный этап проведения ПЦР-диагностики, суть которого заключается в следующем: врач забирает у пациента материал для исследования и подвергает его специальной обработке. В процессе обработки происходит расщепление двойной спирали ДНК на отдельные нити. В материал пациента добавляется специальная жидкость, растворяющая органические вещества, мешающие «чистоте» проведения реакции. Таким образом удаляются липиды, аминокислоты, пептиды, углеводы, белки и полисахариды. В результате образуется ДНК или РНК. Принцип метода ПЦР заключается в «строительстве» новых ДНК или РНК инфекций. Без удаления клеточного материала осуществить это невозможно. Количество времени, затраченного на выделение ДНК, зависит от возбудителя инфекции и от вида используемого для исследования методом ПЦР материала. Например, для подготовки крови к следующему этапу требуется 1,5-2 часа.

Амплификация ДНК. Для осуществления следующего этапа ДНК-диагностики - амплификации ДНК — врачи используют так называемые ДНК-матрицы — молекулы ДНК инфекций, на которые впоследствии будет происходить «клонирование» ДНК. Уже упоминалось, что наличие полной ДНК инфекции необязательно, для проведения этого этапа достаточно небольшого кусочка молекулы ДНК, который присущ только данному микробу (инфекции). В основе амплификации ДНК и соответственно в основе всего принципа ПЦР-реакции лежит естественный для всего живого процесс достраивания ДНК

- репликации ДНК, который осуществляется путем удвоения единичной цепочки ДНК. Начав с одного-единственного фрагмента ДНК, врач-лаборант копирует его и увеличивает количество копий в режиме цепной реакции: после первого цикла у вас уже есть 2 фрагмента, после второго цикла - 4, после третьего - 8, после четвертого - 16, затем 32, 64, 128, 256... С каждым циклом происходит удвоение числа копий, и после двадцати циклов счет уже идет на миллионы, а после тридцати - на миллиарды. Цикл длится считанные минуты и сводится к определенному изменению температурного режима в очень небольшом химическом реакторе. Здесь в растворе в достаточном количестве находятся все нужные компоненты синтеза, прежде всего, нуклеотиды А, Г, Т и Ц, а также проведены тонкие подготовительные химические операции для того, чтобы с каждого готового отрезка ДНК тут же снималась точная копия, затем с этой копии - снова копия, в этом и состоит разветвленная цепная реакция. Путем присоединения к цепи ДНК праймеров - искусственно синтезированных «кусочков» ДНК (нуклеотидных пар), аналогичных ДНК микробов (инфекции) - образуются две короткие, состоящие из двух цепей участки ДНК, спирали, необходимые для синтеза будущей ДНК. Синтез новой цепи происходит путем достраивания каждой из двух нитей ДНК. Процесс амплификации происходит с помощью специфического участка - ДНК-полимеразы, давшего название лабораторному методу. Полимераза выступает в роли катализатора реакции и следит за последовательным прикреплением нуклеотидных оснований к растущей новой цепи ДНК. Таким образом, амплификация ДНК представляет собой многократное увеличение числа копий ДНК, которые специфичны, т. е. присущи только определенному организму. Нет необходимости достраивать всю цепь ДНК, чтобы увидеть возбудителя инфекции. Нужен только тот участок, который характерен для данной бактерии как для индивидуальности. Все многочисленно повторяющиеся этапы амплификации происходят при различных температурах. Для проведения ПЦР-анализа используется специально программируемое оборудование - ПЦР - термостат или амплификатор, которое автоматически осуществляет смену температур. Амплификация проводится по заданной программе, соответствующей виду определяемой инфекции. В зависимости от программы и вида определяемой инфекции процесс автоматизированной ПЦР занимает от 2 до 3 часов.

В процессе детекции продуктов амплификации проходит разделение полученной смеси продуктов амплификации. К смеси добавляются специальные растворы, которые наделяют фрагменты ДНК способностью флуоресцировать - отражаться оранжево-красными светящимися полосами. Образующееся свечение выдает присутствие ДНК вирусов, микробов или бактерий в забранном у пациента на ПЦР-анализ материале.

Метод ПЦР (в диагностике инфекционных заболеваний) обладает следующими преимуществами:

1 Прямое определение возбудителей инфекционных заболеваний. Многие традиционные методы лабораторной диагностики подразумевают выявление возбудителей заболевания по различным косвенным признакам. Например, ИФА-диагностика основана на обнаружении в крови пациента белков, являющихся продуктами распада инфекционных возбудителей, на основании чего врач может поставить тот или иной диагноз. Метод ПЦР-анализа дает прямое указание на присутствие в забранном у пациента материале специфического участка ДНК возбудителя болезни.

2 Высокая специфичность ПЦР-диагностики. В процессе проведения анализа в исследуемом материале выделяется фрагмент ДНК, специфичный, т. е. присущий только

конкретному возбудителю - только определенной бактерии или вирусу. Данный участок ДНК уникален и не характерен ни для одной инфекции на земле.

3 Высокая чувствительность ПЦР. Обнаружение инфекции возможно даже в том случае, если в забранном у пациента материале содержится лишь одна клетка бактерии или вируса. По сравнению с другими иммунологическими и микробиологическими методами диагностики: чувствительность ПЦР-анализа — 10—100 клеток в пробе, другие методы - 10³—10⁵ клеток.

4 Универсальность ПЦР-анализа. Для ПЦР-исследования может применяться практически любые материалы, в том числе недоступные для исследования другими методами: слезь, моча, кровь, сыворотка, мокрота, эякулят, соскоб эпителиальных клеток - поскольку инфекция может содержаться в любых биологических выделениях и тканях.

5 Высокая скорость получения результата ПЦР-анализа. Единый для всех метод обработки забранного на анализ у пациента материала, детекции продуктов реакции, автоматизированная ПЦР-амплификация позволяют провести полную ПЦР-диагностику за 4—5 часов. В тоже время, на культуральные методы исследования затрачивается гораздо больше времени — от нескольких дней до нескольких недель, поскольку необходимо выделение, а затем и выращивание возбудителя на культуре клеток.

6 Возможность диагностики любого вида инфекции. Высокая чувствительность метода ПЦР позволяет диагностировать инфекцию не только на острой стадии заболевания, но и хронические инфекции и даже наличие единичных бактерий или вирусов.

Говоря о несомненном прогрессивном значении метода ПЦР и его неоспоримых преимуществах, вместе с тем, следует знать и об определенных недостатках этого метода и проблемах его проведения.

1 Ключевым фактором успешности процесса, является, пожалуй, правильный выбор последовательности праймеров. Можно использовать программы, значительно упрощающие поиск подходящих регионов ДНК или даже выбирающие пару праймеров автоматически. Однако ни один из существующих алгоритмов не обеспечивает полной гарантии хорошей работы праймеров. К тому же на самом деле они представляют собой смесь молекул различной длины и состава, что приводит к появлению "минусовых" фракций – молекул с последовательностью, укороченной на одно или несколько оснований, при этом положение пропущенного нуклеотида может быть любым. Поэтому для получения наилучших результатов следует проводить очистку от этих фракций.

2 Следует также обратить внимание на приготовление смеси четырех типов нуклеотидов. Неравная их концентрация ведет к существенному увеличению ошибок ДНК-полимеразы в ходе амплификации. Необходимо также поддерживать соответствующую концентрацию ионов магния, поскольку снижение концентрации свободных катионов влияет на температуру и специфичность гибридизации праймеров.

3 Чрезвычайная чувствительность метода требует строгого соблюдения специального технологического режима, тщательного выполнения всех этапов анализа в отдельных изолированных зонах лаборатории, поскольку существует риск амплификации очень небольших количеств неспецифической ДНК, что приведет к неправильному диагнозу. К тому же ПЦР идеально подходит для получения ответов типа "да-нет", например, присутствует в образце *Bacillus anthracis* (сибирская язва) или нет. Гораздо меньше этот метод пригоден для определения, какой организм из множества других

присутствует в образце. Причина в том, что ПЦР лучше всего работает, когда в тестовой реакции находится только одна или несколько пар праймеров. Если в одной реакции используется большое число пар праймеров, соответствующих всем возможным возбудителям инфекции, возникает серьезная проблема возможных артефактов.

4 Для правильной интерпретации результатов необходимо также знать, что выявление ДНК возбудителя не всегда говорит о состоянии его жизнеспособности, а также о непосредственной связи выявленного инфекционного агента с конкретным патологическим процессом.

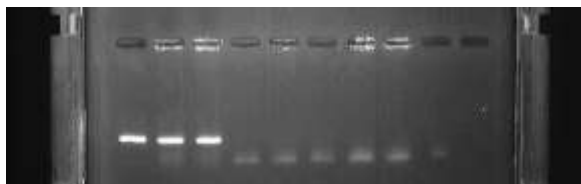
5 Для успешного проведения анализа важно правильно собрать биоматериал у пациента и правильно провести его подготовку. Известно, что в лабораторной диагностике большинство ошибок (до 70%) совершается именно на этапе пробоподготовки. В настоящее время для забора крови существуют вакуумные системы, которые с одной стороны минимально травмируют пациента, а с другой - позволяют произвести забор материала таким образом, что он не контактирует ни с персоналом, ни с окружающей средой. Это позволяет избежать контаминации (загрязнения) материала и обеспечивает объективность анализа ПЦР.

6 Методики, используемые при экстракции нуклеиновых кислот, должны максимально удалять антикоагулянты (например, гепарин) и остатки гема во избежание снижения эффективности амплификации. Системы с протеинкиназами являются более эффективными в сравнении с системами, основанными только на применении химических агентов. Некоторые системы позволяют выделять одновременно вирусные ДНК и РНК, что позволяет унифицировать этапы выделения нуклеиновых кислот при определении в одном образце как ДНК-, так и РНК-содержащих вирусов-мишеней.

7 Следует также иметь в виду, что ДНК-полимеразы, используемые в ПЦР, имеют склонность к ошибкам. Однако основной проблемой применения ПЦР в медицине является существенное ограничение информации о функции генов, участвующих в развитии большинства болезней человека. Сегодня чаще всего известны лишь симптомы этих заболеваний.

Работа

Задание:



Агарозный электрофорез продуктов ПЦР.

Нанести необходимые обозначения и учесть результат. Оформить протокол.

Контрольные вопросы:

1. Биохимические методы идентификации микроорганизмов.
2. Молекулярно-генетические методы идентификации микроорганизмов
3. Что относится к факторам патогенности микроорганизмов.
4. Методы определения адгезии микроорганизмов.
5. Этапы бактериологического метода исследования.

6. Схема бактериологического метода исследования.
7. Ценность бактериологического метода исследования.
8. Характеристика биологических факторов, действующих на микроорганизмы.
9. Методы изучения влияния биологических факторов на микроорганизмы.
10. Характеристика физических факторов, действующих на микроорганизмы.
11. Методы изучения влияния физических факторов на микроорганизмы.
12. Принцип ПЦР.
13. Использование ПЦР в микробиологии.