

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

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ  
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

**Б1.Б.17 МИКРОБИОЛОГИЯ**

**Направление подготовки (специальность) 06.03.01 Биология**

**Профиль образовательной программы Биоэкология**

**Форма обучения очная**

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>Конспект лекций .....</b>	4
<b>1.1 Лекция № 1 « Вводная лекция».....</b>	4
<b>1.2 Лекция № 2 «Систематика и номенклатура прокариотов. Форма и строение бактерий».....</b>	7
<b>1.3 Лекция № 3 «Характеристика актиномицетов, риккетсий, хламидий, микоплазм, бактериофагов».....</b>	10
<b>1.4. Лекция № 4 «Физиология микроорганизмов».....</b>	13
<b>1.5 Лекция № 5 «Генетика микроорганизмов».....</b>	16
<b>1.6 Лекция № 6 «Влияние различных факторов внешней среды на микроорганизмы».....</b>	18
<b>1.7 Лекция № 8 «Экология микроорганизмов».....</b>	22
<b>1.8 Лекция № 9 «Роль микроорганизмов в круговороте элементов в природе».....</b>	27
<b>1.9 Лекция № 7 «Инфекция».....</b>	29
<b>2. Методические указания по выполнению лабораторных работ .....</b>	33
<b>2.1 Лабораторная работа № ЛР-1 «Правила работы в микробиологической лаборатории и техника безопасности. Устройство светового микроскопа».....</b>	33
<b>2.2 Лабораторная работа № ЛР-2 «Основные формы бактерий. Техника приготовления мазков. Анилиновые красители. Простые методы окрашивания».....</b>	36
<b>2.3 Лабораторная работа № ЛР-3 «Сложные методы окраски. Окраска по Граму и Цилю-Нильсену».....</b>	37
<b>2.4 Лабораторная работа № ЛР-4 «Окраска капсул, спор. Определение подвижности микроорганизмов».....</b>	39
<b>2.5 Лабораторная работа № ЛР 5 «Морфология, способы размножения и классификация грибов».....</b>	41
<b>2.6 Лабораторная работа № ЛР-6 «Методы стерилизации».....</b>	43
<b>2.7 Лабораторная работа № ЛР-7 «Питательные среды в микробиологической практике».....</b>	46
<b>2.8 Лабораторная работа № ЛР-8 «Техника посева и методы культивирования микроорганизмов ».....</b>	50
<b>2.9 Лабораторная работа № ЛР-9 «Методы выделения чистых культур».....</b>	52
<b>2.10 Лабораторная работа № ЛР-10 «Культуральные свойства микроорганизмов».....</b>	54
<b>2.11 Лабораторная работа № ЛР-11«Биохимические свойства микроорганизмов».....</b>	57
<b>2.12 Лабораторная работа № ЛР-12 «Антибиотики, классификация, принципы рациональной антибиотикотерапии. Определение антибиотикочувствительности у микроорганизмов».....</b>	61
<b>2.13-15 Лабораторная работа № ЛР-13-15 «Санитарно-микробиологическая оценка воды, почвы, воздуха».....</b>	63
<b>2.16 Лабораторная работа № ЛР 16 «Исследование патогенности и вирулентности микроорганизмов.....</b>	68
<b>2.17-18 Лабораторная работа № 17-18 «Возбудители бактериальных инфекций, краткая характеристика. Методы лабораторной диагностики инфекционных бактериальных заболеваний животных.».....</b>	71

<b>3. Методические материалы по проведению практических занятий (не предусмотрено РУП).....</b>	<b>75</b>
<b>4. Методические материалы по проведению семинарских занятий (не предусмотрено РУП).....</b>	<b>75</b>

## 1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

### 1. 1 Лекция №1 (2 часа).

**Тема: « Вводная лекция»**

#### **1.1.1 Вопросы лекции:**

1. Введение. Предмет, роль микроорганизмов в жизни планеты.
2. Цели и задачи, связь с другими дисциплинами.
3. Краткая история развития микробиологии

#### **1.1.2 Краткое содержание вопросов:**

##### **1. Наименование вопроса № 1. *Введение. Предмет, роль микроорганизмов в жизни планеты***

Микробиология (от греч. *micros* - малый, *bios* - жизнь, *logos* - учение) – это наука о мельчайших, невидимых невооруженным глазом организмах, называемых микроорганизмами или микробами.

До открытия микроорганизмов полагали, что все живые существа делятся на животных и растения, считалось, что переходные формы не существуют, однако Антоний Ван Левенгук сконструировав первый микроскоп в 18 веке, описал микроскопические организмы, которые были позднее названы микробами. Микроорганизмы широко распространены в природе. Они находятся в воздухе, почве, воде, пище, на окружающих нас предметах, на поверхности и внутри нашего тела и других организмов. Их обнаруживают в жарких песках пустынь и в холодной Антарктиде, на дне морей и океанов, в глубине шахт, в космосе.

Широкое распространение микробов свидетельствует об их значительной роли в природе и жизни человека. Без преувеличения можно сказать, что не будь микробов – жизнь на Земле была бы невозможной или существовала в какой-то иной форме. Достаточно сказать, что они участвуют в круговороте всех важнейших биогенных элементов в природе (C, N, P, S, Fe), осуществляют расщепление органических соединений и синтез белка. С помощью микроорганизмов происходят важнейшие производственные процессы: хлебопечение, виноделие, производство органических кислот, ферментов, пищевых белков, гормонов, антибиотиков и других лекарственных веществ. Они играют важную роль в повышении плодородия почвы, образовании каменного угля, нефти и ряде других процессов, протекающих в природе. По ориентировочным подсчетам в биосфере обитает 1045 видов бактерий, а число вирусов и простейших не поддается учету.

Подавляющее большинство микробов безвредно для животных и человека, а многие из них являются даже полезными. В частности, микробы, населяющие кожу, слизистые оболочки, желудочно-кишечный тракт животных составляют экологическое единство. Те из них, которые не оказывают отрицательного воздействия на макроорганизмы, называют сапрофитами (от греч. *sapros* - гнилой, *phyton* - растение), т.е. питающиеся органическими веществами от мертвых организмов. Однако существует

большая группа микроорганизмов, которая способна вызывать различные болезни, некоторые из которых могут принимать характер эпидемий и даже пандемий, унося тысячи жизней (бубонная чума, сибирская язва, туберкулез и др.)

## **2. Наименование вопроса № 2. Цели и задачи, связь с другими дисциплинами.**

В зависимости от запросов практики микробиология дифференцируется на ряд самостоятельных дисциплин:

- микробиология общая;
- техническая;
- санитарная;
- сельскохозяйственная;
- морская;
- медицинская;
- ветеринарная;
- космическая и др.

Задачи, стоящие перед микробиологией:

- 1) получение продуктов микробного биосинтеза (белков, аминокислот, витаминов и др.);
- 2) получение специфических средств для лечения и профилактики животных и человека (вакцины и гипериммунные сыворотки);
- 3) разработка новых методов диагностики;
- 4) изыскание и селекция микробных штаммов для производства антибиотиков, ферментов, витаминов и других веществ.

Общая микробиология изучает морфологические свойства микробов, физиологию и биохимию, а также генетику микроорганизмов. Их роль в круговороте веществ, распространение в природе, взаимодействие с факторами внешней среды.

Техническая микробиология изучает микроорганизмы, используемые в производстве антибиотиков, спиртов, витаминов, ферментов, пищевых продуктов. Разрабатывает методы защиты различных материалов, применяемых в промышленности, от разрушающего действия микроорганизмов.

Санитарная микробиология изучает микрофлору воды, воздуха, почвы, кормов, продуктов питания, дает оценку санитарного качества различных объектов.

Сельскохозяйственная - изучает роль и значение микробов в формировании структуры почвы, ее плодородия, в размножении и минерализации органических веществ. Разрабатывает методы применения бактерий для удобрения почвы и питания растений, методы борьбы с фитопатогенными микробами.

Медицинская микробиология изучает свойства патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, их роль в развитии инфекционного процесса и иммунного ответа макроорганизма. Разрабатывает методы лабораторной диагностики и специфической профилактики и терапии инфекционных болезней.

Ветеринарная микробиология - изучает микроорганизмы, вызывающие инфекционные болезни сельскохозяйственных животных, промысловых и диких животных, рыб, пчел. Разрабатывает методы специфической профилактики и терапии инфекционных заболеваний. Ветеринарная микробиология тесно связана с медицинской, т.к. многие микроорганизмы патогенные для животных, вызывают заболевания у человека (зоонозные инфекции).

Важнейшими задачами ветеринарной микробиологии являются:

- изучение роли отдельных видов патогенных микроорганизмов в этиологии и патогенезе различных заболеваний сельскохозяйственных животных;
- изучение механизма иммунного ответа на антигенное раздражение организма;
- разработка новых методов для обнаружения и идентификации патогенных микроорганизмов.

В последние годы бурно развивается новое направление - это биотехнология. Биотехнология, в сущности, не что иное, как использование культур клеток бактерий, дрожжей или растений для производства необходимых биологически активных веществ. Метаболизм и биосинтетические возможности рекомбинантных бактерий обеспечивают выработку ряда специфических веществ (например, интерферона, инсулина, соматотропина). Микробиология является колыбелью иммунологии.)

### 3. Наименование вопроса № 3. Краткая история развития микробиологии.

Уже в 5-6 веках до н.э. человек пользовался плодами деятельности микроорганизмов, не зная об их существовании - виноделие, хлебопечение, сыроделие, выделка кож. Микробиология зародилась задолго до н.э., в своем развитии она прошла несколько этапов, связанных между собой основными достижениями и открытиями.

Историю развития можно разделить на 5 этапов:

1. Эвристический период (3-4 тыс. лет до н.э.- 16 век) связан с логическими приемами нахождения истины мыслителями этого времени (Гиппократ, Аристотель, Фракасторо).

2. Морфологический период – начинается с открытия микроорганизмов голландским естествоиспытателем Антони Ван Левенгуком.

3. Физиологический период связан с учеными Р. Кохом, Л. Пастером.

4. Молекулярно-генетический период (начинается с 50-х годов 20 века).

Мысль о наличии в природе невидимых живых существ возникала у многих исследователей. Так, еще в 6-ом веке до н.э. Гиппократ, в 16-ом веке н.э. - Джираламо Фракасторо, а в 17-ом веке - Афанасий Кирхер, высказывали предположение, что причиной заразных болезней являются невидимые живые существа. Однако у них не было, да и не могло быть доказательств, подтверждающих эту мысль. Первый примитивный микроскоп был сконструирован голландским натуралистом Антони Ван Левенгуком (1632-1723), при помощи которого ему удалось обнаружить мельчайших и живых зверьков (анималькулюсов) в дождевой капле, воде, зубном налете и других материалах. Левенгук представил рисунки шаровидных, палочковидных и извитых форм бактерий, описал дрожжи и плесени, а также эритроциты и сперматозоиды. Наблюдения были обобщены им в книге «Тайны природы, открытые Антонием Левенгуком». Открытие А. Левенгуком привлекло к себе внимание других натуралистов и послужило началом морфологического периода в истории микробиологии. Этот период, продолжавшийся почти два столетия, оказался малоплодотворным, поскольку роль микроорганизмов в природе, жизни животных и человека осталась неизвестной.

Изучение биохимической деятельности микроорганизмов, их роль в природе, жизни человека и животных положило начало бурному развитию общей микробиологии, что неразрывно связано с работами выдающегося французского ученого Луи Пастера (1822-1895 гг.). Гениальные открытия Пастера составили целую эпоху в развитии естествознания и привели к коренным революционным изменениям в биологии и медицине. При изучении брожения Л. Пастер открыл явление анаэробиоза - способности некоторых микроорганизмов развиваться без доступа кислорода. Познание биологической сущности процессов брожения имело огромное значение, т.к. открывало путь к рациональному управлению и регулированию бродильных процессов. Эти исследования позволили выяснить роль микробов в круговороте веществ в природе, в частности, в процессах гниения. Пастер убедительно опроверг утверждение о самопроизвольном заражении. Разработанные им методы стерилизации оказали огромное влияние на развитие всей медицины и особенно хирургии. На основании исследований Пастера английский ученый хирург Дж. Листер предложил асептический метод стерилизации. При болезнях вин Пастер предложил мягкий способ стерилизации, названный позже пастеризацией.

Следующим этапом научной деятельности Пастера явилось изучение причин болезни шелковичных червей. Эта болезнь наносила огромный экономический ущерб

производству шелка во Франции. Оказалось, что и в этом случае повинны микробы (больных уничтожали и заменяли здоровыми бабочками). Л. Пастер доказал инфекционную природу сибирской язвы, стафиллококкозов. Научно обосновал вакцинацию, т.е. разработал стройную теорию ослабления (аттенуации) заразных свойств микробов и принципы применения ослабленных микробов для профилактики инфекционных болезней и создал первую вакцину против сибирской язвы.

Вершина деятельности Пастера - исследование по борьбе с бешенством. Благодарное человечество высоко чтит память Л. Пастера. На средства, собранные по международной подписке в 1988 г. в Париже был открыт пастеровский институт, являющийся до настоящего времени крупнейшим центром микробиологических исследований.

В конце 19 столетия бурный прогресс микробиологии связан с работами немецкого ученого Р. Коха (1843-1910). При решении вопросов о роли микробов в этиологии инфекционных болезней Кох исходил из положений, которым должен отвечать микроб, признаваемый возбудителем болезни. Суть этих требований, известных под названием «триада Гейль-Коха». Р. Кох изучал возбудителя сибирской язвы, впервые использовал анилиновые красители и применил при микроскопировании иммерсионную систему и микрофотографирование. В марте 1882 г. обнаружил и установил возбудителя туберкулеза, в честь этого выдающегося исследователя микроб назван палочкой Коха. Ученый открыл возбудителя холеры, ввел понятие о дезинфекции, изобрел туберкулин, ввел метод выделения чистой культуры.

Наш соотечественник И.И. Мечников (1845-1916) открыл явление антагонизма между молочнокислыми и гнилостными бактериями, что легло в основу учения о микробном антагонизме, является создателем фагоцитарной теории иммунитета.

Виноградский С.Н. (1856-1953 гг.) – основоположник почвенной микробиологии, впервые выделил и изучил азотофиксирующие и нитрифицирующие бактерии, установил роль микробов в круговороте азота, углерода, фосфора, железа и серы разработчик накопительных питательных сред.

Молекулярно-генетический период связан: с расшифровкой молекулярной структуры многих бактерий, изучением строения и состава их генома; с определением структуры антигенов и антител; с изучением факторов патогенности многих бактерий; с разработкой новых методов исследования (РИФ, ИФА, ПЦР и др.).

## 1. 2. Лекция № 2 (2 часа).

**Тема: «Систематика и номенклатура прокариотов. Форма и строение бактерий»**

### 1.2.1 Вопросы лекции:

1. Систематика и номенклатура прокариотов
  2. Формы и размеры бактерий.
  3. Строение бактериальной клетки.
1. Наименование вопроса № 1. Систематика и номенклатура прокариотов.

Систематика - распределение микроорганизмов в соответствии с их происхождением и биологическим сходством. Она занимается всесторонним описанием видов организмов, выяснением степени родственных отношений между ними и объединением их в различные единицы- таксоны. Основные вопросы, решаемые при систематике - классификация, идентификация и номенклатура. Классификация - это распределение (объединение) организмов в соответствии с их общими свойствами (сходными генотипическими и фентипическими признаками) по различным таксонам. Таксономия - наука о методах и принципах распределения (классификации) организмов в соответствии с их иерархией. Наиболее часто используют следующие таксономические единицы (таксоны)- штамм, вид, род. Последующие более крупные таксоны - семейства, порядки, классы, отделы (филумы), царства, домены (надцарства). Основной

таксономической единицей систематики бактерий является вид. Вид – это эволюционно сложившаяся совокупность особей, имеющая единый генотип, который в стандартных условиях проявляется сходными морфологическими, физиологическими, биохимическими и другими признаками. Внутри вида выделяют варианты микроорганизмов, отличающиеся отдельными признаками. Так, различают: серовары (по антигенной структуре); биовары (по чувствительности к химическим веществам); фаговары (по чувствительности к фагам) и др. Виды, связанные генетическим родством, объединяют в роды, роды – в семейства, семейства – в порядки, порядки в классы, классы в отделы, отделы в царства, царства в домены. В биологической систематике домён (или, иногда, надцарство) — самый верхний уровень (ранг) группировки организмов. Термин «Домён» был предложен в 1990 г. Карлом Вёзе, который разделил все живые организмы (на основании анализа рРНК) на три домена: археи (Archaea); бактерии (Bacteria), или эубактерии; эукариоты (Eukarya).

Номенклатура - название микроорганизмов в соответствии с международными правилами. Для обозначения видов бактерий используют бинарную латинскую номенклатуру род/вид, состоящую из названия рода (пишется с заглавной буквы) и вида (со строчной буквы). Примеры- *Bacillus anthracis*, *Escherichia coli*.

В микробиологии часто используется и ряд других терминов для характеристики микроорганизмов. Штамм - любой конкретный изолят данного вида. Штаммы одного вида, различающиеся по антигенным характеристикам, называют серотипами (серовариантами- сокращенно сероварами), по чувствительности к специфическим фагам - фаготипами, биохимическим свойствам - хемоварами, по биологическим свойствам - биоварами и т.д. Клон – это потомство одной микробной клетки.

Все объекты, изучаемые в курсе микробиологии относятся к надцарствам эукариотов, прокариотов и царству вирусов.

Прокариоты отличаются от эукариот по следующим признакам: отсутствию истинного дифференцированного ядра (ядерной мембранны); отсутствию развитой эндоплазма-тической сети, аппарата Гольджи; отсутствию митохондрий, хлоропластов, лизосом; неспособность к эндоцитозу (захвату частиц пищи); клеточное деление - бинарное.

## 2. Наименование вопроса № 2. Формы и размеры бактерий.

Бактерии (греч. Bakterion-палочка) - микроорганизмы с прокариотическим типом строения.. Термин «прокариоты» равнозначен термину бактерии. Средние размеры бактерий составляют от 0,5 до 3 мкм. Длина палочек варьирует от 0,3 до 10,0 мкм , длина извитых форм может быть от 5 до 500 мкм. Самыми стабильными являются кокки - 0,5- 2 мкм.

Формы бактерий: кокковидные, палочковидные, извивы. К сферическим бактериям относятся: микрококки, диплококки, стрептококки, стафилококки и сарцины. К извивым формам относятся: спирохеты, спириллы и вибрионы. К палочковидным формам относятся: бактерии; бациллы; клостридии.

Кокковидные бактерии:

- микрококки (лат. малый) - отдельно расположенные клетки;
- диплококки (лат. двойной) - располагаются парами;
- стрептококки (от греч. streptos - цепочка) - клетки окружной или продолговатой формы, образующие цепочку вследствие деления клеток в одной плоскости и сохранения связи между ними в месте деления?

- сарцины (от лат. sarcina - связка, тюк) - располагаются в виде пакетов из 8-и и более кокков, так как они образуются при делении клетки в трех взаимно перпендикулярных плоскостях;

- стафилококки (от. греч. staphyle - виноградная гроздь) - кокки расположенные в виде грозди винограда в результате деления в различных плоскостях.

Палочковидные бактерии:

- бактерии - палочковидные микроорганизмы, не образующие спор (кишечная палочка, сальмонеллы, возбудители туберкулеза и т.д.);
- бациллы - спорообразующие палочки, диаметр спор которых меньше диаметра клетки (бацилла сибирской язвы, сенная палочка);
- клостридии (лат. closter — веретено) - спорообразующие палочки, диаметр спор которых больше диаметра клеток.

По форме палочковидные бактерии бывают короткими, длинными или средних размеров: с закругленными (большинство палочек), заостренными (фузобактерии), обрубленными (сибириязвенная палочка) и булавовидными (коринебактерии) концами. Некоторые бактерии могут образовывать ветвления в виде боковых выростов (микобактерии туберкулеза).

По взаимному расположению палочковидные формы распределяются на три подгруппы: диплобациллы и диплобактерии располагаются попарно; стрептобактерии и стрептобациллы — цепочками.

Извитые формы:

- вибрионы (лат. vibrío — изгибаюсь) — изгиб клетки равен 1/3—1/4 завитка спирали, имеют вид запяты (холерный вибрион);
- спирillлы (лат. spira — изгиб) имеют изгибы с одним или несколькими оборотами спирали;
- спирохеты (лат. spirochaetae — извилина) имеют штопороподобную форму, размеры колеблются в больших пределах (ширина 0,3— 1,5 мкм и длина 7 — 500 мкм).

### 3. Наименование вопроса №3. Строение бактерий.

Все структуры бактерий подразделяются на постоянные и временные. К постоянным относят: клеточную стенку; ЦПМ; цитоплазму с рибосомами; нуклеоид. К временным структурам относят: капсулу; жгутики; пили; эндоспоры.

Клеточная стенка - это поверхностный слой, расположенный снаружи от цитоплазматической мембранны. Стенка выполняет: защитную и опорную функции; придает клетке постоянную, характерную для нее форму (например, форму палочки или кокка) и представляет собой наружный скелет клетки; участвует в обмене веществ; у многих она токсична и содержит поверхностный антиген; в стенке имеются поры, которые участвуют в транспорте экзотоксинов. Она составляет от 10 до 50% сухой массы бактерий. Основным структурным компонентом стенки является муреин или пептидогликан. Он состоит из параллельных полисахаридных цепей, состоящих из чередующихся N-ацетилглюказамина и N-ацетилмурамовой кислоты. С помощью способа окраски, впервые предложенного в 1884 г. Хансом Кристианом Грамом, бактерии могут быть разделены на две группы: грамположительные и грамотрицательные. Грамположительные организмы способны связывать некоторые анилиновые красители, такие, как кристаллический фиолетовый, и после обработки иодом, образовывать комплекс, а затем после обработки спиртом, сохранять этот комплекс (йод-краситель). Те же бактерии, у которых под влиянием этилового спирта этот комплекс разрушается (клетки обесцвечиваются), относятся к грамотрицательным. Химический состав клеточных стенок грамположительных и грамотрицательных бактерий различен.

У грамположительных бактерий клеточная стенка толстая (20-60 нм), ее основу составляет пептидогликан (до 90 %), в состав входят тейхоевые и липотеихоевые кислоты.

Толщина стенки грамотрицательных бактерий составляет 14-17 нм, более сложная по химическому составу. Муреина в ней меньше (слой 2 нм). Сверху он покрыт наружной мембраной, которая состоит из бислоя липидов (внутренний – фосфолипидами, наружный – липополисахаридами)

Клеточная стенка многих бактерий сверху окружена слоем слизистого материала — капсулой. Толщина капсулы может во много раз превосходить диаметр самой клетки, а иногда она настолько тонкая, что ее можно увидеть лишь через

электронный микроскоп, — микрокапсула. Капсула не является обязательной частью клетки, она образуется в зависимости от условий, в которые попадают бактерии. Она служит защитным покровом клетки и участвует в водном обмене, предохраняя клетку от высыхания. По химическому составу капсулы чаще всего представляют собой полисахариды. У патогенных микроорганизмов капсула — это структура с антифагоцитарным действием.

Все содержимое клетки, за исключением ядра и клеточной стенки, называется цитоплазмой. В жидкой, бесструктурной фазе цитоплазмы (матриксе) находятся рибосомы, мембранные системы, митохондрии, пластиды и другие структуры, а также запасные питательные вещества. Цитоплазма обладает чрезвычайно сложной, тонкой структурой (слоистая, гранулярная).

Цитоплазматическая мембрана выполняет очень важные функции: регулирует поступление веществ в клетку и выделение наружу продуктов обмена; служит осмотическим барьером; содержит ферменты — пермеазы, осуществляющие перенос веществ; участвует в регулировании роста и клеточном делении; с ней связаны жгутики и пили. Мембрана состоит из липопротеидов. Она достаточно прочна и может обеспечить временное существование клетки без оболочки. Цитоплазматическая мембрана составляет до 20% сухой массы клетки.

В центральной части клетки локализовано ядерное вещество — нуклеоид. У бактерий ДНК упакована менее плотно, в отличие от истинных ядер; нуклеоид не обладает мембраной, ядрышком и набором хромосом.

На поверхности некоторых бактерий имеются придаточные структуры; наиболее широко распространенными из них являются жгутики — органы движения бактерий. Жгутик закрепляется под цитоплазматической мембраной с помощью двух пар дисков. У бактерий может быть один, два или много жгутиков. Расположение их различно: на одном конце клетки, на двух, по всей поверхности и т. д. Жгутики бактерий имеют диаметр 0,01-0,03 мкм, длина их может во много раз превосходить длину клетки. Бактериальные жгутики состоят из белка — флагеллина — и представляют собой скрученные винтообразные нити. По расположению жгутиков различают: монотрихов (с 1 жгутиком); лофотрихов (с пучком жгутиков на полюсе); амфитрихов (с 1 или пучком жгутиков по полюсам); перитрихов (со жгутиками по всей поверхности).

На поверхности некоторых бактериальных клеток имеются тонкие ворсинки — фимбрии (пили). Они могут быть половыми пиялями (участвуют в коньюгации) или пиялями общего типа (главный фактор адгезии).

Эндоспоры могут образовывать два рода бактерий, изучаемых в курсе ветеринарной микробиологии: Clostridium, Bacillus. Эндоспоры образуются при наступлении неблагоприятных условий, характеризуются высокой устойчивостью. Отличие спор от вегетативной клетки: полное отсутствие обмена веществ; малое количество свободной воды; появление дипиколиновой кислоты и ионов кальция, которые образуют соединение дипиколинат кальция, придающее споре состояние покоя и термоустойчивости. Клетка образует только одну спору. При наступлении благоприятных условий в спору начинает поступать вода, активизируются обменные процессы, возникает ростовая трубка и спора прорастает.

### 1.3 Лекция № 3 ( 2 часа)

**Тема: «Характеристика актиномицетов, риккетсий, хламидий, микоплазм, бактериофагов»**

#### 1.3.1 Вопросы лекции:

1. Характеристика биологических свойств актиномицетов, болезни, вызываемые патогенными актиномицетами.

2. Характеристика биологических свойств риккетсий, болезни, вызываемые риккетсиями
3. Микоплазмы, характеристика биологических свойств, болезни, вызываемые микоплазмами.
4. Характеристика биологических свойств хламидий, болезни, вызываемые патогенными хламидиями..
5. Характеристика биологических свойств бактериофагов.

### 1.3.2 Краткое содержание вопросов

#### 1. Наименование вопроса №1. Характеристика биологических свойств актиномицетов, болезни, вызываемые патогенными актиномицетами

Актиномицеты (устаревшее название лучистые грибки) — бактерии, имеющие способность к формированию на некоторых стадиях развития ветвящегося мицелия диаметром 0,4—1,5 мкм, которая проявляется у них в оптимальных для существования условиях. Грамположительные, спор, капсул не образуют, неподвижные. Мицелий может быть субстратным и воздушным. Кроме мицелия встречаются палочковидные и кокковидные формы. Размножаются при помощи конидий, образующихся в результате фрагментации отдельных зрелых гиф, а также делением и почкованием. Наиболее распространены в почве: в ней обнаружаются представители почти всех родов актиномицетов. Актиномицеты обычно составляют четверть бактерий, вырастающих на традиционных средах при посевах их разведённых почвенных суспензий. Их экологическая роль заключается чаще всего в разложении сложных устойчивых субстратов; предположительно они участвуют в синтезе и разложении гумуса.

Актиномицеты, разрушая целлюлозу и другие биополимеры, являются симбионтами многих животных. Представители рода *Frankia* способны к азотфиксации и образованию клубеньков у небобовых растений (облепиха, ольха и др.). Есть патогенные формы, вызывающие актиномикоз (*A. bovis*, *A. israeli*). В организме человека обитают в ротовой полости, в кишечнике, в дыхательных путях, на коже, в зубном налете, в кариозных зубах, на миндалинах. Большинство актиномицетов — аэробы. Актиномицеты более устойчивы к высушиванию, чем немицелиальные бактерии, благодаря чему, они доминируют в пустынных почвах. Чаще всего актиномицеты нейтрофилы, однако некоторые роды ацидофильны или алкалофильны. Являются основными продуцентами антибиотиков.

#### 2. Наименование вопроса № 2. Характеристика биологических свойств риккетсий, болезни, вызываемые риккетсиями.

Риккетсии открыл в 1909 г. американский ученый Г. Риккетс при изучении пятнистой лихорадки Скалистых гор, а затем сыпного тифа. В 1913 г. С. Провачек также обнаружил риккетсии сыпного тифа в лейкоцитах человека. В честь погибших от сыпного тифа Г. Риккетса и С. Провачека бразильский ученый Э. Роха-Лима предложил именовать всю группу риккетсиями, а возбудителя сыпного тифа - риккетсией Провачека. В дальнейшем были выделены и изучены возбудители других риккетсиозов.

Морфология и биологические свойства. Риккетсии - обширная группа плеоморфных бактерий, грамотрицательные. Основное отличие от других бактерий – облигатный внутриклеточный паразитизм. Различают четыре основных морфологических типа: 1) кокковидные, монозернистые риккетсии, размер 0,3-1 мкм; 2) палочковидные, биполярные (гантелевидные, бизернистые), размер 1-1,5 мкм (выявлены при активном развитии риккетсиоза); 3) бациллярные, удлиненные, тетразернистые, обычно изогнутой формы, размер 3-4 мкм (выделяются в начальном периоде болезни, слабовирулентные); 4) нитевидные, полизернистые риккетсии, размер 10-40 мкм (их выделение - показатель

раннего, умеренного риккетсиоза). Кокковидные риккетсии окрашиваются по Романовскому-Гимзе и Цилю-Нильсену в красный цвет, палочковидные и нитевидные – в красно-голубой (зерна-гранулы красные, цитоплазма между ними голубая); по Здродовскому - в красный цвет. Отмечены также и очень мелкие, проходящие через бактериальные фильтры и невидимые в обычном световом микроскопе формы риккетсии, соответствующие, по-видимому, определенной фазе их развития: являются ранней стадией внутриклеточной репродукции возбудителя болезни. Риккетсии грамотрицательные, неподвижные, спор и капсул не образующие микроорганизмы, по структуре сходные с бактериями - имеют оболочку толщиной 7-8 нм, у них обнаружены ДНК и РНК, рибосомы, дыхательная система аналогична прокариотам. У риккетсиеподобных эрлихий ( neo-риккетсий) своеобразный цикл развития. Патогенность свойственна так называемым элементарным тельцам (кокковидные образования, 0,4 мкм), в результате размножения которых образуются инициальные (ретикулярные) тельца (гомогенные образования неопределенной формы, 1-2 мкм), за тем морула, напоминающая туровую ягоду (2-4 мкм), внутри которой формируются элементарные тельца. Риккетсии не растут на искусственных питательных средах, их культивируют в оболочке желточного мешка куриных эмбрионов, в культуре тканевых клеток или в организме лабораторных животных. Размножаются они путем бинарного деления.

В природе риккетсии циркулируют среди насекомых, грызунов, диких и сельскохозяйственных животных, от которых могут передаваться человеку. Распространение их среди людей и сельскохозяйственных животных происходит через кровососущих членистоногих (вши, блохи, клещи), которые выделяют риккетсии, или только с фекалиями (вши, блохи), или же и с секретом слюнных желез (клещи). У насекомых (членистоногих) патогенные риккетсии могут вызывать смертельную инфекцию (сыпнотифозный риккетсиоз у вшей), а также бессимптомную пожизненную инфекцию (пятнистая лихорадка и цуцугамуши у клещей). У грызунов риккетсиозы протекают, как правило, бессимптомно, но носительство возбудителя при этом может быть длительным (несколько месяцев). Во внешней среде устойчивость риккетсий (за исключением риккетсий Бернета) невысокая. Нагревание во влажной среде до 50°C обеспечивает гибель большинства риккетсий через 5-30 мин, при 70°C - через 1-3 мин. У животных риккетсии вызывают Ку-лихорадку, эрлихиоз собак и жвачных, коудриоз жвачных, неориккетсиоз собак.

### 3. Наименование вопроса №3. Микоплазмы, характеристика биологических свойств, болезни, вызываемые микоплазмами.

Микоплазмы - это бактерии без клеточной стенки. Первые патогенные микоплазмы обнаружены Нокаром, Ру, Борелем в 1893-1898 гг., выделившими возбудителя контагиозной перипневмонии крупного рогатого скота, полное морфологическое описание возбудителя проведено Борде (1910) и Бореллем с соавторами (1910), М.Г. Тарта-ковский и Е.П. Джунковский позднее разработали способы их культивирования.

Микоплазмы – это клетки ограниченные только трехслойной цитоплазматической мембраной и неспособные к синтезу пептидогликана. Они устойчивы к пенициллину и его аналогам, угнетающим синтез пептидогликана, но чувствительны к лизису, вызываемому осмотическим шоком, детергентами, спиртами. Большинство видов — факультативные анаэробы; представлены мелкими (0,1-0,45 мкм) клетками, характеризующимися выраженным плеоморфизмом; могут образовывать кокковидные, ветвящиеся и более крупные многоядерные формы, способные образовывать псевдомицелий. Обычно размножаются бинарным делением. Также способны к почкованию и сегментации. Включают подвижные и неподвижные виды, грамотрицательные (лучше окрашиваются по Романовскому-Гимзе), нуждаются в стеролах и нативном белке. На плотных средах образуют характерные мелкие колонии с

приподнятым центром («яичница-глазунья»), имеющие тенденцию врастать в среду; морфология колоний достаточно специфична — на поверхности располагаются крупные, часто вакуолизированные клетки, в глубине — мелкие оптически плотные организмы. Это хемоорганотрофные организмы, у большинства видов метаболизм бродильный, основным источником энергии обычно служит глюкоза или аргинин. Подавляющее большинство составляют подвижные факультативные анаэробы, также растущие в аэробных условиях (иногда рост стимулирует внесение 5% CO<sub>2</sub>). Микроорганизмы растут при температуре 22-41°C (оптимальная 36-37°C); оптимум pH 6,8-7,4. Микоплазмы широко распространены в природе, включают много видов, патогенных для растений и животных; некоторые входят в состав микробных ассоциаций организма человека. У животных вызывают контагиозную перипневмонию, инфекционную агалактию овец, микоплазмоз кур и др.

4. Наименование вопроса №4. Характеристика биологических свойств хламидий, болезни, вызываемые патогенными хламидиями.

Хламидии. Это мелкие грамотрицательные кокковидные бактерии (прокариоты), размером 250—1500 нм (0,25—1 мкм). Хламидии имеют все основные признаки бактерий: 1) содержат два типа нуклеиновых кислот — ДНК и РНК; 2) рибосомы; 3) мурамовую кислоту (это компонент клеточной стенки); 4) размножаются бинарным делением и чувствительны к некоторым антибиотикам. На основании этих фактов они были отнесены учеными к бактериям. Размеры хламидийной клетки таковы, что она занимает промежуточное положение между бактериями и вирусами. Хламидии были выделены в самостоятельный порядок из-за уникального, отличающего их от всех прочих бактерий, внутриклеточного цикла развития. Жизненный цикл хламидий двухфазный. Он протекает в цитоплазматической вакуоли в клетке-хозяине и заключается в смене вегетативных репродуцирующихся крупных неинфекционных клеток хламидии (ретикулярных телец - РТ) и небольших плотных элементарных телец (ЭТ) — инфекционных форм микроорганизма. Все изменения и трансформации хламидий происходит в цитоплазме, где осуществляются все стадии цикла развития возбудителя. Через 8—10 часов после заражения клеток можно наблюдать подавление синтеза ДНК и РНК в инфицированных клетках. Хламидиозы у животных характеризуются.abortами маточного поголовья (коровы, овцы, козы, свиньи, лошади), рождением нежизнеспособного или слабого молодняка с симптомами пневмонии, полиартритов, энтеритов, энцефаломиелитов и конъюнктивитов, у птиц — развитием орнитоза.

5. Наименование вопроса №5. Характеристика биологических свойств бактериофагов

Бактериофаги — это вирусы, поражающие бактерии, используются как антибактериальные лекарственные препараты. Каждый бактериофаг способен заражать только определенные виды бактерий, поэтому эффект бактериофагов строго специфичен и не влияет на нормальную микрофлору человека. Механизм действия бактериофагов прост. Вирус проникает в клетку патогенной бактерии, внедряется в ее геном и начинает размножаться. После накопления внутри бактериальной клетки определенного количества новых вирусных частиц (вирионов) клетка разрушается, вирусы выходят наружу и заражают новые бактериальные клетки.

Различают две группы бактериофагов: умеренные и вирулентные. Умеренные фаги медленно размножаются внутри пораженной бактериальной клетки, передаются внутри бактериальной колонии из поколения в поколение, периодически разрушая микробные клетки. Такой эффект называется лизогенным. Вирулентные фаги, попав в клетку микробы, начинают стремительно размножаться, приводя к быстрой гибели зараженной клетки. Такой эффект называется литическим.

В настоящее время фаги используются при лечении ряда инфекций, при лабораторной диагностике.

## 1.4 Лекция № 4 ( 2 часа)

### Тема: «Физиология микроорганизмов»

#### 1.4.1 Вопросы лекции:

- 1 Химический состав прокариотической клетки. Микробные ферменты.
- 2 Метаболизм микроорганизмов. Типы питания и дыхания.
- 3 Рост и размножение микроорганизмов.

#### 1.4.2 Краткое содержание вопросов

3. Наименование вопроса №1. Химический состав прокариотической клетки.

##### *Микробные ферменты*

Вода составляет основную часть микробной клетки, на ее долю приходится в среднем 75-85 %. Часть воды находится в связанном, а часть в свободном состоянии. На долю сухого вещества приходится в среднем 15-25 %, в нем содержатся органогены и зольные элементы. На долю углерода приходится 45-55 %, на долю кислорода – 30-40 %, на долю азота – 8-10 %, водорода -6-8 %, фосфора -3 %, серы, калия, натрия по 1 %, кальция, магния, хлора – по 0,5 %, железа – 0,2 %, на все остальные элементы – менее 0,3 %.

Белки среди органических соединений занимают первое место, в клетке патогенных микробов на их долю приходится более 50 % от сухого вещества. Белки встречаются в форме протеинов и протеидов. Белки принимают активное участие в размножении, передаче наследственной информации, являются основным структурным материалом, осуществляют двигательную, каталитическую, транспортную, гормональную, защитную и др. К белкам относятся ферменты. Микробные клетки синтезируют различные ферменты, относящиеся ко всем 6 классам. Ферментативный состав определяется геномом клетки и является стабильным признаком, поэтому используется в лабораторной практике при идентификации микроорганизма. Ряд ферментов способствует проявлению патогенных свойств микроорганизмов. Одни ферменты локализуются в цитоплазме, другие - в ЦПМ, третьи - в периплазматическом пространстве, четвертые – выделяются в окружающую среду. На этом основано деление ферментов на экзо – и эндоферменты. Экзоферменты расщепляют макромолекулы до более простых молекул, которые поступают в клетку. Эндоферменты обеспечивают протекание метаболических реакций внутри клетки. Ферменты, которые постоянно синтезируются в определенных концентрациях называются конститутивными. Ферменты, концентрация которых возрастает в зависимости от наличия соответствующего субстрата называются индуцибельными. Функциональная активность ферментов зависит от температуры, pH среды.

Нуклеиновые кислоты – высомолекулярные биологические полимеры, несущие генетическую информацию. Содержание нуклеиновых кислот может быть от 10 до 30 % от сухого вещества.

Углеводы. На их долю в микробной клетке приходится от 12 до 28 % от сухого вещества. Углеводы выполняют энергетическую роль. Углеводами богаты капсульные микроорганизмы.

Липиды. Ряд микроорганизмов содержит липиды в значительных количествах. У дрожжей, риккетсий, грибов их содержание доходит до 40 %, а у микобактерий – до 60 %. У других групп микроорганизмов содержание липидов - 3-7 %. Липиды входят в состав токсинов, играют роль резервных веществ, поддерживают определенную структуру цитоплазмы и повышают устойчивость микробов к действию кислот, спиртов, щелочей.

2.Наименование вопроса №2. Метаболизм микроорганизмов. Типы питания и дыхания.

Метаболизм представляет собой совокупность двух противоположных, но взаимосвязанных процессов – катаболизма, или энергетического метаболизма и анаболизма, или пластического (конструктивного) метаболизма. С первым связано дыхание, со вторым - питание.

Питание микроорганизмов. Микроорганизмы, как и все живые существа, нуждаются в питательных веществах. Они поступают из окружающей среды. Известны 2 способа питания: голозойный; голофитный. Голозойный тип характерен для животных. Голофитный – для микроорганизмов, которые не имеют специальных органов пищеварения и питательные вещества проникают в них через свою поверхность. Микробная клетка потребляет за сутки в 20-30 раз больше своей массы.

В конструктивном метаболизме главная роль принадлежит соединениям углерода. Все микроорганизмы по способности усваивать различные источники углерода делятся на 2 группы: аутотрофы (синтезируют все углеродосодержащие соединения из CO<sub>2</sub>); гетеротрофы (используют органические соединения углерода). Гетеротрофы могут быть: сапрофитами (используют органические остатки отмерших организмов); паразитами (используют органические соединения углерода живых организмов). Паразиты могут быть облигатными или факультативными. Но эта классификация не отражает всего многообразия типов питания, поэтому были предложены новые термины, указывающие на источник энергии и доноров электронов. В зависимости от источника энергии микроорганизмы подразделяются на фототрофы (способны использовать энергию света); хемотрофы (способны использовать энергию окислительно-восстановительных реакций). В зависимости от природы доноров электронов хемотрофы подразделяются на хемолиторофы (источником электронов являются неорганические вещества) и хемоорганотрофы (источником электронов являются органические соединения). Все патогенные микроорганизмы относятся к хемоорганотрофам.

Микроорганизмы нуждаются также в источниках азота. Одни могут усваивать атмосферный азот или азот из неорганических соединений и будут называться аминоавтотрофами. Другие – ассимилируют только азотосодержащие органические соединения и будут называться аминогетеротрофами.

Микроорганизмы, которые не способны синтезировать какое-либо соединение, но нуждающееся в нем называются ауксотрофами, а такие соединения называются факторами роста. Очень часто факторами роста являются пуриновые и пиримидиновые основания, витамины, г.о. группы В, аминокислоты (лейцин, тиозин, аргинин).

Транспорт питательных веществ в микробную клетку осуществляется 3 путями:

- пассивной диффузией (протекает без затрат энергии, по градиенту концентрации, так поступает, например, вода, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>);
- облегченной диффузией (протекает без затрат энергии, но при участии мембранных белков – транслоказ);
- активным транспортом (протекает с энергетическими затратами против градиента концентрации при участии белков – пермеаз(каждая пермеаза переносит определенное соединение) или мембранных белков –транслоказ.

Дыхание бактерий (энергетический метаболизм). Дыхание или биологическое окисление основано на окислительно-восстановительных реакциях, идущих с образованием АТФ. При окислении происходит отдача донорами (молекулами или атомами) водорода или электронов, при восстановлении происходит присоединение водорода или электронов к акцептору. Последним может быть молекулярный кислород (такое дыхание называется аэробным) или нитраты, сульфаты (такое дыхание называется анаэробным). Если донорами и акцепторами водорода являются органические вещества, то такой процесс называется брожением.

По типу дыхания микроорганизмы подразделяются на 4 группы:

- облигатные аэробы (растут при свободном доступе кислорода);
- микроаэрофилы (развиваются при низкой концентрации кислорода, до 1 %);
- факультативные анаэробы (развиваются как при доступе кислорода, так и при его отсутствии);
- облигатные анаэробы (развиваются при полном отсутствии кислорода).

### 3. Наименование вопроса № 3. Рост и размножение микроорганизмов.

Термин «рост» означает увеличение цитоплазматической массы отдельной клетки или группы бактерий. Достигнув определенного размера, клетка начинает делиться. Большинство прокариот размножаются бинарным делением, некоторые почкованием, грибы – спорами.

При размножении наиболее важные процессы происходят в нуклеоиде. Репликация ДНК происходит полуконсервативным путем. Правильное расхождение дочерних цепей обеспечивается связью с ЦПМ. Параллельно с репликацией ДНК идет образование перегородки. Вначале с 2-х сторон идет врастание 2-х слоев ЦПМ, затем между ними синтезируется пептидогликан. На последней стадии дочерние клетки отделяются друг от друга. Если разделившиеся клетки сохраняют межклеточные связи, образуются цепочки.

Размножение бактерий определяется временем генерации, т.е. периодом в течение которого осуществляется деление клетки. Продолжительность генерации зависит от вида, питательной среды, температуры и др. факторов.

Фазы развития микробной популяции на несменяемой питательной среде. Процесс размножения на несменяемой питательной среде происходит неравномерно и в нем различают несколько фаз. Эту фазность принято показывать графически в виде кривой, которая отражает зависимость  $\log$  числа живых клеток (ось ординат) от времени (ось абсцисс):

- лаг-фаза или фаза покоя (культура приспосабливается к питательной среде, размножения нет, длится в среднем 4-5 часов);
- логарифмическая фаза или экспоненциальная (характеризуется максимальным увеличением клеток в геометрической прогрессии, длится 5-6 часов);
- стационарная фаза (наступает равновесие между количеством образующихся и отмирающих клеток, длится около 2 часов);
- фаза отмирания (наблюдается не только отмирание, но и изменение клеток, в эту фазу спорообразующие бактерии образуют споры, через несколько недель или месяцев культура погибает).

## **1.5 Лекция № 5 ( 2 часа)**

### **Тема: «Генетика микроорганизмов»**

#### **1.5.1 Вопросы лекции:**

1. Понятие о наследственности и изменчивости. Материальные основы наследственности.
2. Генетическая изменчивость микроорганизмов: мутации; генетические рекомбинации.
3. Использование микроорганизмов в генной инженерии.

#### **1.5.2 Краткое содержание вопросов**

##### 1. Наименование вопроса №1. Понятие о наследственности и изменчивости.

###### *Материальные основы наследственности.*

Основной генетической структурой прокариот является хромосома (нуклеоид). Хромосома одинарная, нет аллели. По химической структуре – полинуклеотид –ДНК, длиной до 1000 мкм (1мл), молекулярной массой 1010 Д. Она суперспирализирована (от 12 до 80 петель), замкнута в кольцо. Одной точкой крепится к ЦПМ. Содержит от 3 до 5

тысяч генов (у человека 3,5 106 генов). При делении ДНК никогда не изменяет своей длины и толщины. Удвоение ДНК всегда сопровождается делением. Строение ДНК универсально для всего живого. Но генетический материал прокариотов содержится не только в хромосоме, но и в плазмidaх, IS-последовательностях, транспозонах.

Плазмиды – это внекромосомные генетические структуры бактерий, представляют из себя замкнутые кольца 2-нитчатой ДНК, их длина составляет 0,1-5 % от длины ДНК-хромосомы, они несут от 40 до 50 генов. Плазмиды способны автономно существовать и копироваться в клетке, но могут включаться в хромосому и реплицироваться с ней (интегрированные плазмиды). Термин «плазмida» впервые ввел американский ученый Д.Ледерберг в 1952 году для обозначения полового фактора бактерий. Плазмиды несут гены не обязательные для клетки-хозяина, но при определенных условиях обеспечивают им временные преимущества перед бесплазмидными клетками. У бактерий различных видов обнаружены следующие виды плазмид:

- R-плазмиды, несут гены, отвечающие за множественную лекарственную устойчивость (к антибиотикам, сульфаниламидным препаратам);
- F-плазмиды (половой фактор) бактерий определяют их способность к конъюгации и образованию половых пилей;
- Ent-плазмиды – детерминируют продукцию энтеротоксинов;
- Col-плазмиды (названы впоследствии бактериоциногенными факторами) детерминируют синтез бактериоциногенов – антибиотических веществ, ингибирующих бактерии родственных видов (наиболее изучены колицины, стафилоцины, пестицины);
- плазмиды, определяющие вирулентность некоторых бактерий (например, возбудителя столбняка, чумы, сибирской язвы);
- плазмиды, определяющие способность почвенных бактерий использовать необычные источники углерода и др.

Плазмиды подвержены мутациям, рекомбинациям, могут быть удалены из клетки, что не влияет на основные свойства бактерий. Благодаря быстрому самокопированию и возможности конъюгационной передачи внутри вида, между видами и даже родами плазмиды играют важную роль в эволюции бактерий. Являются удобной моделью в генной инженерии.

Мигрирующие генетические элементы – это отдельные участки ДНК, способные осуществлять собственный перенос внутри генома. Транспозиция связана со способностью мигрирующих элементов кодировать специфический фермент – транспозазу. К мигрирующим элементам относятся: вставочные (инсерционные) последовательности –IS-элементы; транспозоны.

Вставочные (инсерционные) последовательности –IS-элементы – простейший тип мигрирующих элементов, их величина не превышает 1500 пар нуклеотидов. IS-элементы самостоятельно не реплицируются и не кодируют распознаваемых фенотипических признаков. Содержащиеся в них гены обеспечивают только их перемещение из одного участка в другой. Основные функции IS-элементов: 1) регуляция активности генов бактериальной хромосомы; 2) индукция мутаций типа делеций (выпадение большего или меньшего количества нуклеотидов), инверсий (поворота участка на 180°, дупликаций (повторение какого-либо участка); 3) координация взаимодействия плазмид, транспозонов, профагов (как между собой, так и бактериальной хромосомой).

Транспозоны – участки ДНК, состоящие из 2000-2500 пар нуклеотидов, несут специфические гены и два концевых IS-элемента. При включении в хромосому бактерий вызывают: 1) дупликации; 2) делеции; 3) инверсии. Они не способны самостоятельно реплицироваться и размножаются только в составе хромосомы. Каждый транспозон обычно содержит гены, привносящие важные для бактерий свойства (например, множественную лекарственную устойчивость).

К этой же группе относятся умеренные и дефектные фаги.

Хромосомные ДНК обладают способностью восстанавливать поврежденный генетический материал. Эта система получила название репарационной, а восстановление – репарацией.

## 2. Содержание вопроса №2. Генетическая изменчивость микроорганизмов: мутации; генетические рекомбинации

Под изменчивостью микроорганизмов принято понимать способность клеток изменять видовые признаки и свойства. Различают изменчивость фенотипическую и генотипическую.

Фенотипическая изменчивость. Сходные по генотипу микроорганизмы могут существенно отличаться по фенотипу, что называется модификациями или фенотипическими адаптациями. Модификации существуют до тех пор, пока действует вызвавший их специфический фактор внешней среды. Роль фенотипических изменений – обеспечение выживаемости микробных популяций в изменившейся внешней среде.

Генотипическая изменчивость. Играет большую роль в эволюции микроорганизмов. В ее основе лежат мутации и рекомбинации. Они происходят в структуре ДНК и проявляются в стабильности изменений каких-либо свойств.

Мутации – внезапные скачкообразные изменения наследственных свойств. Они могут быть самопроизвольные и индуцированные. Частота спонтанных мутаций невелика (1 клетка из  $10^6$ -  $10^7$ ). Примером спонтанных мутаций является S-R диссоциация. Индуцированные мутации появляются под действием каких-либо мутагенов (физических, химических, биологических).

Генетические рекомбинации. У бактерий, в отличие от эукариот, наблюдается своеобразный парасексуальный процесс передачи наследственного материала. Из клетки-донора в клетку-реципиент передается фрагмент хромосомы. Фрагмент хромосомы донора спаривается с хромосомой реципиента, после чего происходит рекомбинация – гомологичные участки донора и реципиента обмениваются. Известны 3 основные типа рекомбинаций:

- трансформация;
- трансдукция,
- коньюгация.

Трансформация – изменение генома клетки-реципиента в результате поглощения из среды свободного фрагмента ДНК клетки-донора. Явление впервые установлено Гриффитсом в 1928 году.

Трансдукция – передача ДНК от клетки-донора в клетку-реципиент при участии умеренных бактериофагов. Установлена в 1951 году Циндерлером и Ледербергом. Различают три основные типа трансдукции: общую; специфическую; abortивную.

Коньюгация – это передача генетического материала от донорской клетки клетке-реципиенту при непосредственном контакте. Открыта в 1946 году Ледербергом и Татумом. Способность клетки к коньюгации связана с наличием в ней полового F-фактора (F-плазиды), кодирующими информацию о половых пилиях, которые играют роль коньюгационного мостика, через который передается часть генетического материала, в т.ч. и F-фактор (почти в 100 % случаев). Получая F-фактор, клетка-реципиент сама становится способной к коньюгации.

## 3. Содержание вопроса №3. Использование микроорганизмов в генной инженерии

Генная инженерия является основой биотехнологии. Она сводится по существу к генетической рекомбинации. Основные этапы генной инженерии:

- выделение нужного гена (вырезание из хромосомы с помощью рестриктаз);
- вставка и сшивание с помощью лигаз этого гена с генами вектора (в качестве последнего используются плазиды, бактериофаги);

- введение вектора в клетку-реципиент (в роли клетки-реципиента используются кишечная, сенная палочка, дрожжи, вирус оспы и др.);
- создание условий для размножения клеток-реципиентов;
- получение нужного продукта.

Методом генной инженерии в настоящее время получены: соматотропин; соматостатин; интерферон; интерлейкины; тиреотропный гормон; эритропоэтин, вакцины против гепатита В, сибирской язвы, холеры и др.

## **1.6. Лекция № 6 ( 2 часа)**

**Тема: «Влияние различных факторов внешней среды на микроорганизмы»**

### **1.6.1 Вопросы лекции:**

1. Влияние температуры, высушивания и давления на микроорганизмы.
2. Влияние излучения, аэроионизации, токов высокой частоты на микроорганизмы.
3. Влияние химических веществ на микроорганизмы.
4. Понятие об асептике, антисептике, стерилизации; дезинфекции

### **1.6.2 Краткое содержание вопросов**

#### **1 Наименование вопроса №1. Влияние температуры, высушивания и давления на микроорганизмы**

Микроорганизмы подвергаются воздействию различных факторов внешней среды. Несмотря на это, они остаются жизнеспособными и в жидком воздухе, и в глубоком вакууме, и в уксусе, и в водах атомного реактора. Тысячелетиями они сохраняются в останках вымерших животных. В таких условиях могли сохраниться только те организмы, у которых выработались приспособления к сложившимся условиям. Разнообразие условий породило и разнообразие свойств микроорганизмов под действием физических, химических, биологических факторов.

Температура один из наиболее важных факторов в жизни микробов. Она может быть оптимальной, т.е. благоприятной для развития, а также максимальной, когда подавляются жизненные процессы и минимальной, ведущей к замедлению и прекращению роста. Зоны роста для разных групп микроорганизмов колеблются в довольно широких пределах. В зависимости от пределов оптимальной температуры бактерии делятся на 3 физиологические группы:

- психрофильные;
- мезофильные;
- термофильные.

Психрофильные (криофильные) микробы развиваются при низких температурах:  $\min t$  для них  $\approx 0^{\circ}\text{C}$ ;  $\text{opt } t 15-20^{\circ}\text{C}$ ;  $\max t - 30-35^{\circ}\text{C}$ . Такие микроорганизмы являются преимущественно обитателями северных морей, океанов, ледников, холодильных камер. Среди них могут быть возбудители болезней рыб, водных растений, но некоторые факультативные психрофилы могут размножаться в продуктах в условиях морозильных камер и вызывать заболевания у человека и животных (листерии, клебсиеллы).

Мезофилы — это наиболее обширная группа бактерий, в которую входят сапрофиты и почти все патогенные микроорганизмы, так как оптимальная температура для них  $- 37^{\circ}\text{C}$  (температура тела),  $\min t - 10^{\circ}\text{C}$ ,  $\max t - 40-45^{\circ}\text{C}$ .

Термофилы — теплолюбивые бактерии, развиваются при оптимальной  $t - 50-60^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{opt } t$  для них  $-30^{\circ}\text{C}$ ,  $\max t - 70-76^{\circ}\text{C}$ . Эти микроорганизмы обитают в горячих источниках, вызывают саморазогрев сена и т.д. Способность некоторых неспорообразующих бактерий горячих источников существовать при  $t$  до  $93^{\circ}\text{C}$  и выше, дало основание для выделения их в новую группу — экстремально-термофильных бактерий.

Высокие и низкие температуры по-разному воздействуют на микроорганизмы. При низких температурах микробные клетки переходят в состояние анабиоза, в котором могут

существовать довольно долго (например, холерный вибрион долго может храниться во льду, не утратив при этом своей жизнеспособности, споры бактерий могут выдерживать до  $-250^{\circ}\text{C}$ ). Низкие  $t$  приостанавливают бродильные и гнилостные процессы, что используется на практике для сохранения продуктов в холодильных камерах, ледниках, погребах.

Действие высоких температур на микроорганизмы положено в основу стерилизации. Все микроорганизмы, включая и споровые, погибают при температуре  $165\text{--}170^{\circ}\text{C}$  в течение часа.

**Высушивание.** Для нормальной жизнедеятельности микроорганизмов нужна вода. Высушивание приводит к обезвоживанию цитоплазмы, нарушается целостность цитоплазматической мембраны, что ведет к гибели клетки. Некоторые микроорганизмы под влиянием высушивания погибают уже через несколько минут (менингококки, гонококки), другие более устойчивы к высушиванию (возбудители туберкулеза, капсульные формы бактерий). Особенно устойчивыми к высушиванию споры (например, споры плесневых грибов могут сохранять способность к прорастанию в течение 20 лет, а споры сибирской язвы могут сохраняться в почве до 100 лет). При хранении микроорганизмов и изготовлении лекарственных препаратов из бактерий часто используется метод лиофильной сушки. Сущность метода состоит в том, что микроорганизмы сначала замораживают при  $-273^{\circ}\text{C}$ , а потом высушивают в условиях вакуума. При этом микробные клетки переходят в состояние анабиоза и сохраняют свои биологические свойства в течение нескольких лет.

**Действие давления.** К атмосферному давлению бактерии, а особенно споры, очень устойчивы. Встречаются бактерии, называемые барофильными, которые живут в морях и океанах на глубине 1000—10 000 м под давлением от 100 до 900 атм. Сочетание повышенных температур и повышенного давления используется в паровых стерилизаторах для стерилизации паром под давлением. Большее влияние на рост микроорганизмов оказывает осмотическое давление среды, которое определяется концентрацией растворенных в ней веществ. Внутри бактериальной клетки осмотическое давление соответствует давлению 10-20 % раствора сахарозы. Если микробную клетку поместить в среду с более высоким осмотическим давлением, то произойдет плазмолиз (потеря воды и гибель клетки), а если микробную клетку поместить в среду с более низким осмотическим давлением, то произойдет плазмоптоз (вода поступает в клетку и клеточная стенка может разорваться). Это явление используется в промышленности и быту при консервировании. Но существуют микробы, которые могут переносить высокое осмотическое давление среды, их называют галофилами.

## 2. Наименование вопроса №2. Влияние излучения, ультразвука, аэроионизации, токов высокой частоты на микроорганизмы.

**Лучистая энергия.** В природе бактериальные клетки постоянно подвергаются воздействию солнечной радиации. Прямые солнечные лучи губительно действуют на микроорганизмы. Это относится и к ультрафиолетовому спектру солнечного света. УФ-лучи с длиной 200-295 нм обладают бактерицидной активностью. Они инактивируют ферменты клетки и разрушают ДНК. Патогенные бактерии более чувствительны к УФ-лучам, чем сапрофиты. Поэтому в бактериологической лаборатории микроорганизмы выращивают и хранят в темноте. Бактерицидное действие УФ-лучей используют для стерилизации закрытых помещений: операционных, боксов и т.д. Для этого используются бактерицидные лампы ультрафиолетового излучения с длиной волны 200—400 нм.

На микроорганизмы оказывают влияние и другие виды лучистой энергии — это рентгеновское излучение,  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -лучи оказывают губительное действие на микроорганизмы только в больших дозах. Эти лучи разрушают ядерную структуру клетки. В последние годы радиационным методом стерилизуют изделия для одноразового

использования — шприцы, шовный материал, чашки Петри. Малые дозы излучений могут стимулировать рост микроорганизмов.

Ультразвук (высокочастотные механические колебания упругой среды с частотой 20 тыс. Г/сек) вызывает поражение клетки. Под действием ультразвука внутри клетки возникает очень высокое давление. Это приводит к разрыву клеточной стенки и гибели клетки. Ультразвук используют для стерилизации продуктов: молока, фруктовых соков.

Электричество высокой и малой частоты убивает микробы, особенно первые. Длительное действие токов высокой частоты приводит к электрофорезу некоторых компонентов клетки.

Аэроионы, несущие отрицательный заряд, оказывают наибольшее отрицательное влияние на микроорганизмы. Аэроионизация используется для оздоровления воздуха помещений (для этого можно использовать, например, лампы Чижевского).

### 3. Наименование вопроса №3. Влияние химических веществ на микроорганизмы

Влияние химических веществ на микроорганизмы различно. Оно зависит от химического соединения, его концентрации, продолжительности воздействия.

В малых концентрациях химическое вещество может являться питанием для бактерий, а в больших — оказывать на них губительное действие (например, поваренную соль в малых количествах добавляют в питательные среды, а в больших концентрациях она задерживает размножение микроорганизмов). Многие химические вещества используются в медицинской практике в качестве дезинфицирующих средств. К ним относятся: фенолы, поверхностно-активные вещества, соли тяжелых металлов, кислоты, щелочи, спирты, окислители, красители.

Поверхностно-активные вещества изменяют энергетическое соотношение. Бактериальные клетки теряют отрицательный заряд, а приобретают положительный заряд. Это нарушает функцию ЦПМ. К ним относятся: мыла; жирные кислоты; детергенты.

Красители задерживают рост микроорганизмов, а некоторые обладают бактерицидным действием (метиленовый синий, бриллиантовый зеленый).

Фенол, крезол и их производные. Повреждают клеточную стенку, а затем и белки клетки.

Соли тяжелых металлов (например, соли ртути, серебра, цинка) вызывают коагуляцию белков клетки.

Окислители (перекись водорода, калия перманганат) выделяют атомарный кислород, что приводит к деструкции мембран и белков.

Спирты (особенно 70 % этиловый спирт) обезвоживают клетку и приводят к свертыванию белков.

Кислоты и щелочи изменяют pH среды, в высоких концентрациях вызывают коагуляцию белков.

### 4. Наименование вопроса №4. Понятие об асептике, антисептике, стерилизации; дезинфекции

Для уничтожения микроорганизмов в окружающей среде применяют стерилизацию и дезинфекцию. Стерилизация - это полное освобождение объектов окружающей среды от микроорганизмов и их спор. Существуют физические, химические и механические способы стерилизации. К наиболее распространенным способам физической стерилизации относятся автоклавирование и сухожаровая стерилизация.

Асептика – это система мероприятий в клинической, микробиологической или производственной практике, предупреждающих внесение (попадание) микроорганизмов из окружающей среды в рабочую зону и развитие нежелательных процессов. Асептика предусматривает стерилизацию инструментов и материалов, специальную обработку рук работников, соблюдение особых санитарно-гигиенических правил и приемов работы.

Методы и правила асептики должны строго соблюдаться при производстве лечебных и профилактических препаратов, а также в работе микробиологических лабораторий.

Антисептика — комплекс лечебно-профилактических мероприятий, направленных на уничтожение микроорганизмов, способных вызвать инфекционный процесс на поврежденных или интактных участках кожи и слизистых оболочек, ранах, в полостях. В качестве антисептиков используются различные химические соединения, оказывающие антимикробное действие: 70% этиловый спирт, 5% спиртовой раствор йода, 0,5—2% раствор хлорамина, 0,1% раствор КМп04, 0,5—1% раствор формалина, 1—2% спиртовые растворы метиленового синего или бриллиантового зеленого, различные детергенты.

Дезинфекция — это процесс удаления или уничтожения патогенных микроорганизмов на предметах окружающей среды и разнообразных объектах. Основная цель дезинфекции — не допустить распространения инфекционных болезней.

## 1.7 Лекция №7 ( 2 часа)

### Тема: «Экология микроорганизмов»

#### 1.7.1 Вопросы лекции:

1. Экосистемы, экологические ниши. Типы симбиоза
2. Микрофлора воды, санитарно-микробиологическая оценка воды.
3. Микрофлора почвы, санитарно-микробиологическая оценка почвы.
4. Микрофлора воздуха, санитарно-микробиологическая оценка воздуха.
5. Микрофлора тела человека. Дисбактериозы. СПФ-животные и животные гнотобионты.

#### 1.7.2 Краткое содержание вопросов

##### 1. Наименование вопроса №1. Экосистемы, экологические ниши. Типы симбиоза

Экосистема, термин, введенный в науку А. Тенсли (1935) для обозначения любого единства (самого разного объема и ранга), включающего все организмы (т. е. биоценоз) на данном участке (биотопе) и взаимодействующего с физической средой таким образом, что поток энергии создает четко определенную трофическую структуру, видовое разнообразие и круговорот веществ (т. е. обмен между биотической и абиотической средой) внутри системы.

Это понятие обозначает относительно устойчивую систему динамического равновесия, в которой организмы и неорганические факторы являются полноправными компонентами.

Экологическая ниша — совокупность всех факторов среды в ареале, при которых возможно существование определенного вида. Понятие включает в себя не только положение вида в пространстве, но и его функциональную роль в сообществе.

Симбиоз [от греч. *symbiosis*, совместное проживание] — совместное длительное существование микроорганизмов в долгоживущих сообществах. Взаимоотношения, при которых микроорганизм располагается вне клеток хозяина (более крупного организма), известны как эктосимбиоз; при локализации внутри клеток — как эндосимбиоз. Типичные эктосимбиотические микробы — *Escherichia coli*, бактерии родов *Bacteroides* и *Bifidobacterium*, *Proteus vulgaris*, а также другие представители кишечной микрофлоры. Как пример эндосимбиоза можно рассматривать плазмиды, обеспечивающие, например, резистентность бактерий к ЛС. Симбиотические отношения также разделяют по выгоде, получаемой каждым из партнёров.

Мутуализм [от лат. *mutuus*, взаимный] — взаимовыгодные симбиотические отношения. Так, микроорганизмы вырабатывают БАБ, необходимые организму хозяина (например, витамины группы В). При этом обитающие в макроорганизмах эндо- и эктосимбионты защищены от неблагоприятных условий среды (высыхания и экстремальных температур) и имеют постоянный доступ к питательным веществам.

Комменсализм — разновидность симбиоза, при которой выгоду извлекает только один партнёр (не принося видимого вреда другому); микроорганизмы, участвующие в таких взаимоотношениях. — комменсалы [от лат. *сопутствующий*]. Микроорганизмы-комменсалы колонизируют кожные покровы и полости организма человека (например, ЖКТ), не причиняя «видимого» вреда; их совокупность — нормальная микробная флора (естественная микрофлора). Типичные эктосимбиотические организмы-комменсалы — кишечная палочка, бифидобактерии, стафилококки, лактобациллы. Многие бактерии-комменсалы принадлежат к условно-патогенной микрофлоре и способны при определённых обстоятельствах вызывать заболевания макроорганизма (например, при внесении их в кровоток во время медицинских манипуляций).

Антагонистический симбиоз — симбиотические отношения, наносящие хозяину более или менее выраженный вред; его крайнее проявление — паразитизм . Если микроорганизмы-сапрофиты утилизируют мёртвые органические субстраты, то паразитические виды живут за счёт живых тканей растений или животных. Проникая в организм хозяина, они могут вызывать у него заболевание, поэтому их обозначают как патогенные микроорганизмы. Паразитические микроорганизмы разделяют на внутри- и внеклеточные. Внутриклеточные паразиты — вирусы, риккетсии и хламидии. Внеклеточные паразиты — большинство бактерий и простейших. Факультативные паразиты. В зависимости от внешних условий некоторые микроорганизмы могут вести себя как паразиты, либо как сапрофиты. Поэтому их так и называют — факультативные паразиты. К ним относят большинство условно-патогенных бактерий. Облигатные паразиты полностью утратили собственные метаболические возможности и живут, разрушая ткани хозяина.

## 2. Наименование вопроса №2. Микрофлора воды.

Микрофлора воды. В воде количество микроорганизмов значительно выше, чем в воздухе, так как многие из них способны жить и развиваться в воде. В 1 мл (см<sup>3</sup>) воды поверхностных источников может находиться до миллиона микробов. В артезианской воде микробов очень мало. Поверхностные воды рек, озер, водохранилищ загрязняются сточными водами населенных пунктов, промышленных предприятий и животноводческих ферм. Микробное загрязнение воды возрастает также после обильных дождей и весеннего половодья. Проточные водоемы (реки, каналы) обладают способностью к самоочищению, количество микробов ниже места загрязнения реки может существенно не изменяться, а через некоторое время чистота воды в реке восстанавливается. Вода служит фактором передачи ряда инфекций. Многие патогенные микроорганизмы (лептоспирсы, возбудитель туберкулеза и др.) могут сохраняться в воде до нескольких месяцев. Особенно богата микрофлора открытых водоемов и рек. Наибольшее количество микроорганизмов находится в поверхностных слоях воды, в прибрежной зоне водоемов. С увеличением глубины количество микроорганизмов уменьшается. Содержание их в воде зависит от времени года и метеорологических условий. Осенью, а также во время разливов рек, сильных дождей, когда в воду попадают микробы, смываемые с поверхности почвы, число их бывает наибольшим. В соленых водах морей и океанов, в минеральных источниках также обитают приспособившиеся к высокому осмотическому давлению разнообразные микроорганизмы. Важную роль в формировании микрофлоры природных водных источников играет микрофлора придонного ила. Численность обитающих там бактерий достигает 400 млн. на 1 г ила. На поверхности ила они образуют особый слой, содержащий серобактерии, нитрифицирующие и азотофиксирующие бактерии, а также анаэробные бактерии, разлагающие клетчатку, жиры и другие вещества. Все они обеспечивают круговорот веществ в водоеме.

Микробиологические методы исследования воды сводятся к определению общего количества микроорганизмов в 1 мл воды и выявлению тех или иных видов патогенных бактерий (особенно холерного вибриона). Кроме того, поскольку прямое выделение патогенных бактерий из воды требует специальных исследований, существуют косвенные

методы, позволяющие дать количественную оценку степени фекального загрязнения воды. Питьевая вода считается хорошей, если общее количество бактерий в 1 мл — не более 100; сомнительной — 100-150; загрязненной, — если содержание бактерий в 1 мл 500 и более. Количество микроорганизмов в придонном слое ила озер и рек варьирует в пределах от 100 до 400 млн на 1 г.

- 3. Наименование вопроса №3. Микрофлора почвы.

Почва — продукт жизнедеятельности микроорганизмов, осуществляющих процесс её формирования, самоочищения, круговорота азота, углерода, серы и железа в природе, в одном грамме которой, может находиться до 10 млрд микробов и более. Биомасса в почве на площади 1 га составляет 2-5 т. Микробная биомасса в разных почвах колеблется от единиц до нескольких десятков тонн на гектар, причем на долю грибов приходится от 88 до 99% биомассы, а доля бактерий составляет 1-12%. В верхних слоях обитают актиномицеты и аэробы. В нижних — грибы и анаэробы. Общее количество микроорганизмов уменьшается по мере углубления в почву. Независимо от глубины наиболее густо всегда заселена оклокорневая (ризосферная) зона растений. Качественный состав оклокорневой микрофлоры зависит от вида растений, но во всех случаях преобладает грибная флора. Количество микроорганизмов оклокорневой зоны в тысячи раз превышает микробное число не занятой растениями почвы.

Микрофлора почвы включает все известные группы микроорганизмов: споровые и споронеобразующие бактерии, актиномицеты, грибы, спирохеты, архебактерии, простейшие, сине-зеленые водоросли, микоплазмы и вирусы. На качественный и количественный состав микрофлоры почвы влияет тип почвы, её плодородие, влажность, аэрация и физико – химические свойства. На микробоценоз почвы существенно влияет деятельность человека: обработка почвы, внесение удобрений, мелиорация, загрязнение отходами производств.

Почва как субстрат, состоящий из твердой фазы и воды, служит естественным местом обитания для возбудителей многих заразных болезней: клостридиозов, сибирской язвы, псевдотуберкулеза, листериоза, лептоспироза, эризипелоида, туберкулеза, мелиоидоза, синегнойной инфекции, дерматомикозов, микотоксикозов, холеры, иерсиниоза, сальмонеллеза.

Санитарное состояние почвы оценивают по коли — титру, количеству анаэробов, споровых и термофилов, по наличию яиц гельминтов и специфических возбудителей инфекций. Для чистой почвы титр кишечной палочки не более 1 г, умеренно загрязненной — до 50 мг, для сильно загрязненной — 1-2 мг. Обезвреживание почвы, обсемененной патогенными микроорганизмами, проводят механической обработкой и посевом растений.

4 Наименование вопроса № 4. Микрофлора воздуха.

Воздух как среда обитания для микроорганизмов менее благоприятен, чем почва и вода, так как в нем не содержится или содержится очень мало питательных веществ, необходимых для размножения микроорганизмов. Кроме того, на них сильнее действуют такие неблагоприятные факторы, как высушивание и ультрафиолетовые лучи солнечного света. Тем не менее, попадая в воздух, многие микроорганизмы могут сохраняться в нем более или менее длительное время. Воздух особенно загрязнен вблизи земной поверхности, а с высотой он становится все более чистым. Больше всего микробов в атмосфере содержится летом, меньше всего — зимой. Главным источником загрязнения воздуха является почва, в меньшей степени — вода.

В воздухе в естественных условиях обнаруживаются сотни видов сапрофитных микроорганизмов, представленных кокками (в т.ч. сарцинами), споровыми бактериями и грибами, отличающимися большой устойчивостью к высушиванию и к другим неблагоприятным воздействиям внешней среды, например действию солнечных лучей. Количество микробов в воздухе варьирует в больших диапазонах — от нескольких

бактерий до десятков тысяч их в 1 кубометре. В 1 г пыли может содержаться до 1 млн бактерий. Воздух открытых пространств более чист, так как сказывается действие солнечных лучей, высушивания, чем воздух закрытых помещений. В помещениях самоочищение воздуха происходит слабее, поэтому и загрязненность может быть значительно больше. В воздухе закрытых помещений, особенно если они плохо проветриваются, накапливается микрофлора, выделяемая через дыхательные пути человека или животных. Патогенные микроорганизмы попадают в воздух из мокроты и слюны при кашле, чихании.

Помимо капельного способа, распространение патогенных микробов через воздух может осуществляться «пылевым» путем. Пылевой путь играет особенно важную роль в эпидемиологии туберкулеза, туляремии, чумы и других заболеваний.

При санитарно-бактериологическом исследовании воздуха проводят:

- определение общей бактериальной обсемененности воздуха (общее число бактерий в 1 м<sup>3</sup>);
- выявление санитарно-показательных микроорганизмов;
- по эпидемическим показаниям выделение вирусов и патогенных бактерий из воздуха закрытых помещений;
- при исследовании атмосферного воздуха дополнительное определение качественного состава микрофлоры с учетом наличия спорообразующих аэробов и анаэробов, которые служат показателем загрязненности воздуха микроорганизмами почвы.

Методы отбора проб воздуха для бактериологического исследования подразделяют на: 1) аспирационные, основанные на активном просасывании воздуха с помощью различных приборов; 2) седиментационные, основанные на принципе механического оседания микробов.

Пробы воздуха берут на уровне сидящего или стоящего человека, выделяя одну точку взятия проб на каждые 20 м<sup>2</sup> площади.

##### 5. Наименование вопроса №5. Микрофлора тела человека.

Организм человека заселен (колонизирован) более чем 500 видов микроорганизмов, составляющих нормальную микрофлору человека, находящихся в состоянии равновесия (эзубиоза) друг с другом и организмом человека. Микрофлора представляет собой стабильное сообщество микроорганизмов, т.е. микробиоценоз. Она колонизирует поверхность тела и полости, сообщающиеся с окружающей средой. Место обитания сообщества микроорганизмов называется биотопом. В норме микроорганизмы отсутствуют в легких и матке.

Различают нормальную микрофлору кожи, слизистых оболочек рта, верхних дыхательных путей, пищеварительного тракта и мочеполовой системы. Среди нормальной микрофлоры выделяют резидентную и транзиторную микрофлору. Резидентная (постоянная) облигатная микрофлора представлена микроорганизмами, постоянно присутствующими в организме.

Транзиторная (непостоянная) микрофлора не способна к длительному существованию в организме. Организм человека и его нормальная микрофлора составляют единую экологическую систему. Формирование микрофлоры новорожденных начинается с попадания микроорганизмов в процессе родов на кожу и слизистые оболочки. Дальнейшее формирование микрофлоры определяется санитарным состоянием среды, в которой проходили роды, типом вскармливания и др. Нормальная микрофлора становится устойчивой и к концу третьего месяца жизни сходной с микрофлорой взрослого. Количество микроорганизмов у взрослого человека составляет около 10<sup>14</sup> особей, причем преобладают в значительной степени облигатные анаэробы.

Представители нормальной микрофлоры заключены в экзо-полисахаридно-муциновый матрикс, образуя на слизистых оболочках и коже биологическую пленку, устойчивую к различным воздействиям.

Микрофлора кожи имеет большое значение в распространении микроорганизмов в воздухе. В результате десквамации (шелушения) несколько миллионов чешуек, несущих каждая по несколько микроорганизмов, загрязняют окружающую среду. На коже и в ее более глубоких слоях (волосяные мешочки, просветы сальных и потовых желез) анаэробов в 3-10 раз больше, чем аэробов. Кожу колонизируют пропионибактерии, коринеформные бактерии, стафилококки, стрептококки, дрожжи *Pityrosporum*, дрожжеподобные грибы *Candida*, редко микроплакомицеты, *Myc. fortuitum*. На 1 см<sup>2</sup> кожи приходится менее 80 000 микроорганизмов. В норме это количество не увеличивается в результате действия бактерицидных стерилизующих факторов кожи, в частности в поте кожи обнаружены а-глобулины, иммуноглобулины А, G, трансферрин, лизоцим и другие противомикробные вещества. Процесс самоочищения кожи усиливается на чисто вымытой коже.

В верхние дыхательные пути попадают пылевые частицы, нагруженные микроорганизмами, большая часть которых задерживается в носо- и ротоглотке. Здесь растут бактероиды, коринеформные бактерии, гемофильные палочки, пептококки, лактобактерии, стафилококки, стрептококки, непатогенные нейссерии и др. Трахея и бронхи обычно стерильны. Микрофлора пищеварительного тракта является наиболее представительной по своему качественному и количественному составу. При этом микроорганизмы свободно обитают в полости пищеварительного тракта, а также колонизируют слизистые оболочки.

В полости рта обитают актиномицеты, бактероиды, бифидобактерии, эубактерии, фузобактерии, лактобактерии, гемофильные палочки, лептотрихии, нейссерии, спирохеты, стрептококки, стафилококки, вейлонеллы и др. Обнаруживаются также грибы рода *Candida* и простейшие. Ассоцианты нормальной микрофлоры и продукты их жизнедеятельности образуют зубной налет.

Микрофлора желудка представлена лактобациллами и дрожжами, единичными грамотрицательными бактериями. Она несколько беднее, чем, например, кишечника, так как желудочный сок имеет низкое значение рН, неблагоприятное для жизни многих микроорганизмов. При гастритах, язвенной болезни желудка обнаруживаются изогнутые формы бактерий – *Helicobacter pylori*, которые являются этиологическими факторами патологического процесса. В тонкой кишке микроорганизмов больше, чем в желудке; здесь обнаруживаются бифидобактерии, клостридии, эубактерии, лактобациллы, анаэробные кокки. Наибольшее количество микроорганизмов накапливается в толстой кишке. В 1 г фекалий содержится до 250 млрд микробных клеток. Около 95 % всех видов микроорганизмов составляют анаэробы. Основными представителями микрофлоры толстой кишки являются: грам-положительные анаэробные палочки (бифидобактерии, лактобациллы, эубактерии); грамположительные спорообразующие анаэробные палочки (клостридии, перфриганс и др.); энтерококки; грам-отрицательные анаэробные палочки (бактероиды); грамотрица-тельные факультативно-анаэробные палочки (кишечные палочки и сходные с ними бактерии сем. *Enterobacteriaceae* – цитробактер, энтеробактер, клебсиеллы, протей и др.). В меньших количествах обнаруживаются фузобактерии, пропионибактерии, вейлонеллы, пептококки, стафилококки, синегнойная палочка, дрожжеподобные грибы, а также простейшие, вирусы, включая фаги. На эпителии успешно растут спирохеты, нитевидные бактерии. Бифидобактерии и бактероиды составляют 80-90 % от общего количества микрофлоры кишечника.

**Дисбактериоз.** Нарушение эволюционно сложившихся соотношений видов в нормальной микрофлоре или изменение количественных соотношений между важнейшими группами микроорганизмов аутомикрофлоры или изменение качества самих микробных представителей приводит к развитию дисбактериоза. Как следствие этого – развитие патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, которые могут вызывать заболевания, дисфункции и т. д.

В настоящее время не только получены безмикробные животные (мыши, крысы, морские свинки, цыплята, поросыта и другие виды), но и успешно развивается новая отрасль биологии – гнотобиология (греч. gnatos – познание, bios – жизнь). У гнотобиотов ввиду отсутствия антигенного «раздражения» иммунной системы возникает недоразвитие иммунокомпетентных органов (тимуса, лимфоидной ткани кишечника), дефицит IgA, ряда витаминов. Как следствие у гнотиботов нарушаются физиологические функции: уменьшается масса внутренних органов, объем крови, понижено содержание воды в тканях. Исследования с использованием гнотиботов позволяют изучать роль нормальной микрофлоры в механизмах инфекционной патологии и иммунитета, в процессе синтеза витаминов, аминокислот. Заселение организма гнотиботов теми или иными видами (сообществами) микроорганизмов удается выявлять физиологические функции этих видов (сообществ).

Большую ценность для развития животноводства представляют СПФ-животные (англ. Spezifisch patogen frei) – свободные только от патогенных видов микроорганизмов и имеющие все необходимые виды микробов в своем теле для проявления физиологических функций. СПФ-животные растут быстрее обычных, реже заболевают и могут служить ядром для племенных ферм, свободных от инфекционных заболеваний. Для организации такой фермы необходим высший уровень ветеринарно-санитарных мероприятий.

## 1.8 Лекция № 8 ( 2 часа)

### Тема: «Роль микроорганизмов в круговороте элементов в природе»

#### 1.8.1 Вопросы лекции:

- 1 Участие микроорганизмов в круговороте азота в природе
- 2 Участие микроорганизмов в круговороте углерода в природе
- 3 Участие микроорганизмов в круговороте железа и серы в природе

#### 1.8.2 Краткое содержание вопросов

##### 1. Наименование вопроса №1. Участие микроорганизмов в круговороте азота в природе

Азот составляет 80% земной атмосферы, в круговороте участвует 108—109 т его в год. Различают следующие этапы круговорота азота:

- азотфиксация;
- аммонификация (гниение);
- нитрификация;
- денитрификация.

**Азотфиксация.** Азот – это газ химически инертный, он не может быть непосредственно использован растениями, животными и большинством микроорганизмов. Этот этап (азотфиксация), осуществляется исключительно азотфиксирующими бактериями. Значение биологической азотфиксации для жизни на планете огромно. Азотфиксация в природе осуществляется как свободноживущими микроорганизмами, так и бактериями, существующими в сообществе с растениями (симбиотическая азотфиксация). Несимбиотическая азотфиксация осуществляется бактериями рода Azotobacter, цианобактериями, клостридиями, представителями рода Bacillus, сульфатредуцирующими бактериями и др. Симбиотическая фиксация азота осуществляется бактериями рода Rhizobium (вызывают образование клубеньков у бобовых растений), актиномицетами рода Frankia (симбионты тропических растений), цианобактериями.

**Аммонификация.** При разложении растительных и животных белков в почве освобождается аммоний ( $\text{NH}_3$ ). Процесс аммонификации обусловлен деятельностью различных грибов и бактерий (Bacillus cereus, Proteus vulgaris, псевдомонад и др.).

**Нитрификация.** Если в почве достаточно кислорода, то аммоний подвергается нитрификации, которую осуществляют две группы микроорганизмов, соответственно окисляя аммиак до нитрита (виды *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus*) и нитрит до нитрата (*Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrococcus*). Частично нитрификация осуществляется и при участии гетеротрофных бактерий (виды *Arthrobacter*), образующих нитрит из аммония, и грибов, способных окислять аммоний до нитрата. Однако скорость нитрификации у гетеротрофных бактерий многократно меньше, чем у аутотрофных. Нитраты – это основное азотистое вещество почвы, используемое растениями в процессе роста, служит источником азота для построения клеточных компонентов

**Денитрификация.** В отсутствие кислорода бактерии из нитрата, используемого в качестве акцептора водорода, образуют молекулярный азот. Этот процесс известен как денитрификация (диссимиляционная нитратредукция). Способностью к денитрификации обладают многие факультативно аэробные бактерии (*Pseudomonas aeruginosa*, *P. stutzeri*, *P. fluorescens*, *Bacillus Ucheniformis*, *Paracoccus denitrificans*, *Thiobacillus denitrificans*). Без денитрификации земной и атмосферный запас азота в конце концов сосредоточился бы в виде солей в океане, и жизнь стала бы возможной только на узкой прибрежной полосе. Удаление токсичных нитратов и мутагенных нитритов из пресной воды в реакциях денитрификации приводит к улучшению качества питьевой воды. Таким образом, микроорганизмы — естественные регуляторы количества связанного (то есть доступного для жизнедеятельности) азота в природе.

## 2. Наименование вопроса № 2. Участие микроорганизмов в круговороте углерода в природе

Круговорот углерода складывается из двух взаимосвязанных процессов:

- потребления углекислоты атмосферного воздуха зелеными растениями и многими аутотрофными микробами;
- возвращения, пополнения запасов углекислоты в атмосфере.

Потребление CO<sub>2</sub> атмосферного воздуха совершается зелеными растениями и фотосинтезирующими микроорганизмами. При фотосинтезе образуются различные органические соединения. Основная масса фиксированного углерода отлагается в растениях в форме различных сахаров-полимеров (целлюлоза, крахмал, пектин) или мономеров (глюкозы, фруктозы и др.). Образовавшиеся органические соединения используются животными и человеком для питания. После гибели растений и животных органические вещества переходят в почву. Возвращение углекислоты в атмосферу происходит в результате процессов, в которых значительную роль играют микроорганизмы почвы и воды. Большое количество углекислоты поступает обратно в атмосферу при минерализации органических остатков растений и животных почвенными бактериями и грибами. Главными субстратами процессов минерализации в природе являются сахара в форме полимеров. Использование глюкозы в качестве основного энергетического материала при процессах биологического окисления (брожение и дыхание) приводит к высвобождению углекислоты и пополнению ее запасов в атмосфере. Большая часть углекислоты поступает в атмосферу также при сжигании нефти, каменного угля и метана. Одним из этапов круговорота углерода в природе являются процессы брожения. Они происходят при участии микроорганизмов. Продукты, образующиеся при брожении, имеют огромное значение в народном хозяйстве.

**Спиртовое брожение.** Характеризуется распадом углеводов с образованием этилового спирта и углекислого газа. Брожение осуществляется при участии дрожжей из рода *Saccharomyces*. Этот вид брожения известно очень давно. Его используют при изготовлении спиртных напитков (вино, пиво). Процесс спиртового брожения может происходить в анаэробных и аэробных условиях. Спиртовое брожение вызывают также дрожжи из рода *Torula* и некоторые плесени, например *Mucor*.

**Уксуснокислое брожение.** Происходит при попадании в вино или пиво уксуснокислых бактерий. Они окисляют этиловый спирт в аэробных условиях до уксусной кислоты. Уксуснокислые бактерии относятся к роду *Acetobacter* и могут приводить к порче вина и пива.

**Молочнокислое брожение.** Вызывается бактериями родов *Lactobacillus*, *Streptococcus*. При брожении бактерии выделяют ферменты, гидролизующие лактозу молока (молочный сахар) до моносахаридов (глюкоза). Глюкоза используется микроорганизмами в процессе биологического окисления, конечным продуктом которого является молочная кислота. Она губительно действует на другие микробы, находящиеся в кислом молоке, а также на гнилостные микробы кишечника. Молочнокислые бактерии широко используют при изготовлении молочнокислых продуктов: *L. bulgaricum* — для приготовления простокваша, *L. acidophilum* — ацидофилина и т.д.

**Маслянокислое брожение.** Осуществляется строгими анаэробами из рода *Bacillus* и *Clostridium*. Конечным продуктом брожения является масляная кислота, образование которой вызывает порчу овощей, молока, сыров, консервов.

**Анаэробное разложение клетчатки (целлюлозы).** Имеет очень большое значение в круговороте углерода в природе, так как благодаря ему клетчатка, являющаяся составным элементом оболочек растительных клеток, разрушается. В результате водородного брожения образуются масляная и уксусная кислоты, углекислота и водород, а при втором типе брожения (метановый) вместо водорода — метан. Анаэробное разложение клетчатки происходит в глубине почвы. В аэробных условиях клетчатка разрушается различными плесенями, актиномицетами и бактериями.

### 3. Наименование вопроса №3. Участие микроорганизмов в круговороте железа и серы в природе

Железо входит в состав белка гемоглобина, содержащегося в эритроцитах. Этим объясняется его важная роль в процессе дыхания человека и животных.

Основные представители железобактерий — нитчатые бактерии родов *Crenotrix*, *Chlamydothrix*, *Cladotrichix*. Эти бактерии представляют длинные нити, покрытые общим слизистым влагалищем, в котором отлагается гидрат окиси железа. После отмирания бактерий образуется болотная и озерная железная руда, залегающая островами в десятки и сотни квадратных метров. Железобактериям принадлежит важная роль в образовании железомарганцевых отложений в природе.

В состав белка растительного и животного происхождения входит и сера, этим объясняется важность этого элемента в круговороте веществ. Бактерии, усваивающие соединения серы, называют серобактериями. Живут они в почве, воде, навозе. При разложении в почве органических серосодержащих веществ, а также при восстановлении солей серной, сернистой и серноватистой кислот образуется сероводород, ядовитый для растений и животных. Этот газ превращается в безвредные, доступные для растений соединения серобактериями.

## 1.9 Лекция № 9 ( 2 часа)

Тема: «Инфекция»

### 1.9.1 Вопросы лекции:

1. Понятия инфекции, инфекционного процесса, инфекционной болезни.
2. Условия возникновения инфекции Понятие о патогенности и вирулентности микроорганизмов. Факторы патогенности микроорганизмов.
3. Классификация инфекционных болезней.

### 1.9.2 Краткое содержание вопросов

1 Наименование вопроса №1. Понятия инфекции, инфекционного процесса, инфекционной болезни

В процессе эволюции адаптация паразитов к хозяину шла по линии специализации, т.е. приобреталась способность паразитировать в определенных тканях (например, сальмонелл в слизистой кишечника, бруцелл – в плаценте и т. д.). Это называется тропизмом.

Различают следующие виды паразитизма:

- факультативный паразитизм – микроорганизмы, в зависимости от условий, ведут себя или как сапрофиты или как паразиты (возбудители столбняка, ботулизма);
- облигатный внутриклеточный паразитизм – микроорганизмы паразитируют в полостях, в межклеточном пространстве;
- облигатные внутриклеточные паразиты – паразитируют только в клетках.

Инфекция – это совокупность физиологических, патологических и адаптивных реакций, возникающих в макроорганизме при внедрении в него патогенных микроорганизмов и вызывающих нарушение его внутренней среды и физиологических функций.

Состояние инфекции, как и всякого биологического процесса, динамично, динамику развития инфекции называют инфекционным процессом. Выделяют три основные формы инфекционного процесса:

1) микробоносительство, которое не связано с предшествующим переболеванием, наличие возбудителя в органах и тканях не приводит к патологическому процессу и не сопровождается иммунологической перестройкой (наблюдается, например, при носительстве возбудителя рожи свиней, пастереллеза);

2) иммунизирующая субинфекция, при которой попавшие в организм патогенные микробы вызывают лишь специфическую иммунологическую перестройку, но сами при этом погибают;

3) инфекционная болезнь - наиболее яркая форма проявления инфекции, она характеризуется внешними признаками нарушения нормальной жизнедеятельности организма (манифестная инфекция) или малозаметными признаками (латентная, бессимптомная).

Инфекционная болезнь имеет ряд признаков, отличающих ее от неинфекционных болезней:

- этиологическим фактором является микробный агент;
- заболевший организм сам становится источником инфекции (т.е. присуща заразность, микробоносительство);
- характеризуется цикличностью;
- после себя оставляет ту или иную степень невосприимчивости.

Периоды развития инфекционного заболевания:

• инкубационный период – время с момента заражения до появления первых клинических признаков заболевания (в зависимости от заболевания может длиться от нескольких часов до нескольких месяцев и даже лет);

• продромальный период – характеризуется первыми, не всегда специфическими для данного заболевания симптомами (например, повышение  $t$ , слабость, угнетение, потеря аппетита), продолжительность от нескольких часов до нескольких суток (в среднем 24-48 часов);

• период развития основных клинических признаков (разгар болезни), характеризуется появлением типичных для данной болезни признаков;

• исход болезни (смерть; выздоровление; бактерионосительство; рецедив), выздоровлении (реконвалесценция) не всегда сопровождается освобождением от микроорганизмов, часто отмечается микробоносительство (при сальмонеллезе, пастереллезе).

2.Наименование вопроса №2. Условия возникновения инфекции Понятие о патогенности и вирулентности микроорганизмов. Факторы патогенности микроорганизмов.

Для возникновения инфекционной болезни требуется несколько условий:

- 1) микроб должен быть достаточно вирулентным;
- 2) необходимо внедрение определенного количества микроорганизмов;
- 3) они должны проникнуть в организм через наиболее благоприятные для них ворота инфекции и достичь восприимчивых тканей;
- 4) организм хозяина должен быть восприимчивым к данному возбудителю;
- 5) необходимы определенные условия среды, при которых происходит взаимодействие между микробом и организмом.

Для возникновения инфекции микроб должен обладать патогенностью вообще и вирулентностью в частности.

Патогенность микробы – это видовой генетический признак, его потенциальная возможность при благоприятных условиях вызывать инфекционную болезнь. Но далеко не все патогенные микроорганизмы могут вызывать инфекционную болезнь, для этого они должны быть еще и вирулентными. Вирулентность – это степень патогенности микроорганизма. Ее можно измерить. За единицу измерения условно принимаются летальная и инфицирующая дозы: D<sub>c1</sub> (Dosis certa letalis, 100%), D<sub>lm</sub> (Dosis letalis minima, 95%), LD<sub>50</sub>, ID, ID<sub>50</sub>. Устанавливают эти дозы опытным путем при помощи заражения лабораторных животных и математических расчетов.

Высоковирулентные микробы способны вызывать заболевания даже в очень малых дозах (например, 2-3 палочки M. tuberculosis вызывают заболевание у морской свинки, 1-2 клетки B. anthracis могут вызвать заболевание даже у крупных животных). Вирулентность может значительно колебаться под действием физических, химических, биологических факторов. Ее можно искусственно понизить или повысить. Например, Л.Пастер снизил вирулентность B. anthracis, выращивая культуру при t= 42,50C, французские исследователи Кальмет и Герен получили вакциновый авирулентный штамм БЦЖ, выращивая вирулентный штамм M.bovis на среде с бычьей желчью в течение 18 лет, сделав 230 пассажей.

Вирулентность микроорганизмов связана с инвазивностью и токсигенностью – факторами патогенности. Инвазивность (от лат. Invasio –нашествие, нападение) – это способность микробы преодолевать защитные барьеры организма, проникать в органы, ткани и полости, размножаться в них и подавлять защитные силы организма.

Токсигенность ( от греч.toxicum – яд, genus – происхождение) – это способность микробы образовывать токсины, которые вредно действуют на макроорганизм путем изменения его метаболических функций.

Инвазивность обуславливают следующие факторы вирулентности:

1. микробные ферменты, деполимизирующие структуры, препятствующие проникновению и распространению возбудителя в организме:

• гиалуронидаза – повышает проницаемость тканей за счет расщепления гиалуроновой кислоты, входящей в состав подкожной и межмышечной клетчатки;

• фибринолизин – разжижает плотные кровяные сгустки;

• нейраминидаза – деполимеризует поверхностные структуры эпителия, разжижает носовой секрет, муциновый слой кишечника;

• ДНК-аза – деполимеризует ДНК, появляющуюся при разрушении лейкоцитов, которая привлекает в очаг воспаления другие фагоцитирующие клетки;

• коллагеназа – расщепляет коллаген, в результате наступает расплавление мышечной ткани;

• коагулаза (плазмокоагулаза) свертывает кровяную плазму, благодаря этому вокруг микробы образуется фибринозный барьер, что затрудняет его распознавание и фагоцитоз;

2. факторы, обуславливающие способность микробы к адгезии, колонизации и даже

пенетрации (адгезия – это способность прикрепляться к поверхности клеток, колонизация – это способность размножаться на поверхности клеток, пенетрация – способность проникать внутрь клеток). Механизм адгезии основан или на физико-химическом взаимодействии возбудителя с клетками организма (электростатических, ван-дер-вальсовы силы) или чаще всего на специфическом взаимодействии адгезинов (химических группировок на поверхности микробных клеток) с рецепторами на поверхности клеток макроорганизма. У каждого вида и даже штамма микроорганизмов есть свои уникальные адгезины. Адгезивные свойства многих бактерий связывают с пилиями, тейхоевыми кислотами, иногда с капсулами, белками наружной мембранны;

3. поверхностные структуры, обладающие антифагоцитарным действием (капсула, корд-фактор, А-протеин у золотистого стафилококка, Vi-антител и т.д.), а многие из таких факторов обладают еще защитой от системы комплемента. Некоторые капсулы имеют в своем составе сиаловые кислоты, напоминающие по составу сиаловые кислоты клеток хозяина.

Токсигенность обуславливается выработкой токсинов. Они делятся на экзо- и эндотоксины. Экзотоксины высокоактивные яды, выделяемые микробом на протяжении всей жизни в качестве продуктов обмена веществ. Эндотоксины – менее ядовитые, образуются при распаде клетки. Экзотоксины образуют главным образом Гр+-бактерии, эндотоксины – Гр-бактерии.

Экзотоксины независимо от сложности имеют 2 центра: первый центр (В) фиксирует молекулу токсина на соответствующем клеточном рецепторе; второй центр (А) проникает внутрь клетки, где блокирует жизненно важные метаболические реакции. Клеточные рецепторы для разных экзотоксинов неодинаковы, что и определяет избирательность действия. В зависимости от механизма действия различают 4 типа токсинов:

- цитотоксины (дифтерийный токсин, дерманекротический токсин, энтеротоксины);
- мембранотоксины – повышают проницаемость поверхностных мембран, встраиваясь в них и образуя каналы;
- функциональные блокаторы (нейротоксины);
- эксфолиантины и эритрогенины, влияют на процесс взаимодействия клеток между собой и с межклеточным веществом (образует скарлатинозный стрептококк, золотистый стафилококк).

Экзотоксины: гемолизины; нейротоксины; энтеротоксины; некротоксины; лейкоцидины.

К эндотоксинам относится ЛПС Гр-бактерий. Он вызывает однотипную реакцию. При введении больших доз наблюдается слабость, отдышка, расстройство кишечника, падение сердечной деятельности, понижение температуры. Генетический контроль осуществляют гены хромосомы, плазиды, фаги.

Судьба патогенных микробов, попавших в организм может быть различной, в зависимости от состояния макроорганизма и вирулентности самого микробы. Некоторые микробы, попав в организм, с током крови заносятся в определенные органы и там размножаются (возбудитель туберкулеза), другие, попав в организм, остаются в воротах инфекции, вырабатывают токсины, которые проникая в кровь вызывают токсемию. Если микробы, попав в кровь, не размножаются в ней, а только разносятся в ткани и органы, то это состояние называют бактериемией, размножение возбудителя в крови и наводнение им многих органов и тканей называется септицемией или сепсисом. Если в результате распространения микроорганизмов гематогенным или лимфогенным путем возникают гнойные очаги – это называется септикопилемией.

### 3. Наименование вопроса №3. Классификация инфекционных болезней

По характеру проявления инфекции делятся на:

- кишечные – передаются алиментарно;

- кровяные – передаются трансмиссивно;
- инфекции кожных покровов и слизистых оболочек – передаются через предметы ухода, при прямом контакте, половым способом.

По характеру возникновения инфекции делятся на экзогенные и эндогенные. Последние вызываются условно-патогенной микрофлорой, которая постоянно находится в организме, но до поры не проявляет своих патогенных свойств.

При повторном заболевании одной и той же инфекцией речь ведут о реинфекции. Повторное заражение организма тем же возбудителем до выздоровления называется суперинфекцией.

Инфекция, вызываемая одним возбудителем называется моноинфекцией, разными возбудителями, вызывающими самостоятельные заболевания - смешанной инфекцией или микст-инфекцией.

Инфекция, возникающая вслед за первичной инфекцией и вызванная условно-патогенной микрофлорой, называется вторичной или секундарной.

В зависимости от источника заболевания различают:

- зоонозы – источником являются животные;
- антропонозы – источником являются люди;
- зооантропонозы - источником являются животные и люди;
- сапронозы – источником инфекции являются объекты окружающей среды, в которых обитают патогенные микробы.

По длительности течения инфекций могут быть острыми (протекают в короткие сроки) и хроническими (протекают от нескольких месяцев до нескольких лет). Персистирующие инфекции характеризуются длительным пребыванием патогенов в организме, но из организма они не выделяются.

## 2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

### **2.1 Лабораторная работа №1 (2 часа).**

**Тема:** «Правила работы в микробиологической лаборатории и техника безопасности. Устройство светового микроскопа».

**2.1.1 Цель работы:** ознакомить студентов с назначением бактериологической лаборатории, ее устройством, основным оборудованием и техникой безопасности, с устройством светового микроскопа.

#### **2.1.2 Задачи работы:**

1. Ознакомить студентов с учебной литературой по микробиологии.
2. Ознакомить студентов с устройством бактериологической лаборатории и техникой безопасности при работе в ней.
3. Ознакомить студентов с устройством светового микроскопа.

#### **2.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Литература учебная;
2. Устройство и оборудование кафедры микробиологии и заразных болезней
3. Световые микроскопы: микроскоп «Ломо», микроскоп бинокулярный XSP-103Р; микроскоп «Биалам», микроскоп МБР-3, микроскоп МБС-1, МБС-9.

#### **2.1.4 Описание (ход) работы:**

Ветеринарно-бактериологическая лаборатория – это учреждение Государственной ветеринарной службы РФ. Различают лаборатории: районные, межрайонные, областные, краевые, республиканские. Их основные задачи: проведение бактериологических,

серологических, вирусологических, микологических, биохимических и других исследований. Основная цель их исследований – установление лабораторного диагноза болезней животных и птиц, экспертиза молока, мяса, яиц, кормов.

Лаборатория размещается в специальном здании с дифференциацией на отделы. В бактериологическом отделе имеются следующие помещения: боксы, моечная, бактериологическая кухня, автоклавная, лаборатория, приемная патологического материала, вскрывочная.

- Правила техники безопасности в ветеринарно-бактериологической лаборатории:
1. входить в помещение только в специальной одежде – халате и шапочке;
  2. не разрешается вносить посторонние вещи, принимать пищу и курить;
  3. проверять перед началом работы исправность приборов;
  4. не разрешается зажигать одну спиртовку от другой;
  5. исследуемый материал должен рассматриваться как особо опасный и при работе с ним необходимо соблюдать принятые в микробиологической практике технические правила, исключающие возможность заражения;
  6. в случае попадания материала или культур на пол, стол и т.д. необходимо обработать эти поверхности дезинфицирующим раствором;
  7. после окончания работы отдать лаборанту культуры для обеззараживания, убрать и продезинфицировать рабочее место, помыть руки, халаты и шапочки сложить в полиэтиленовые пакеты.

После ознакомления с правилами студенты расписываются в журнале.

Ознакомительная экскурсия студентов по кафедре, демонстрация помещений и оборудования.

Демонстрация световых микроскопов разных марок, повторение устройства микроскопа и правил работы с ним. Разбор особенностей иммерсионной системы микроскопа.

Демонстрация работы с иммерсионной системой:

Для получения увеличенных изображений в микроскопах используют проходящее или отраженное от объекта квантовое излучение различного вида (видимого диапазона, ультрафиолетовое или рентгеновское), а также потоки элементарных частиц (поток электронов). Поэтому существует несколько разновидностей микроскопического метода: световая, ультрафиолетовая, рентгеновская, электронная микроскопии. Наиболее распространены в цитологии и гистологии световая и электронная микроскопии.

Методы микроскопирования позволяют наблюдать и изучать только такие объекты или их структуры, размеры которых превосходят половину длины волны излучения, используемого в конкретном методе. Таким образом, основной характеристикой любого микроскопа является значение его предельного разрешаемого расстояния  $d$  (разрешающая способность, или разрешение).

Разрешение — это наименьшее расстояние между двумя точками объекта, при котором они видны раздельно; наименьший размер объекта, при котором микроскоп еще «разрешает» рассмотреть детали изображения.

Теоретически предельная разрешающая способность выражается формулой, из которой следует, что чем короче длина волны излучения, используемого в микроскопе, тем выше его разрешение и, следовательно, больше максимальное увеличение. Разрешение светового микроскопа равно 0,25 мкм, так как средняя длина волны кванта света видимого диапазона равна 0,5 мкм, что позволяет увеличивать изображение в 1500 раз.

В электронном микроскопе длина волны потока электронов равняется 0,000005 мкм, поэтому он позволяет рассматривать объекты, размеры которых в 100 000 раз меньше, и практически достигать увеличений в 1 000 000 раз.

Объект в микроскопах может освещаться двумя основными способами: излучение проходит через него или отражается. В первом случае исследуют внутреннюю структуру, во втором — поверхность объекта.

Микроскопы, в которых используют разные способы освещения, значительно различаются по конструкции и имеют разные названия: просвечивающие (трансмиссионные) — микроскопы проходящего света; микроскопы отраженного света — сканирующие (растровые).

Наиболее часто в клинической и экспериментальной практике применяют световой микроскоп, позволяющий изучать гистологические препараты в проходящем свете и светлом поле. При световой микроскопии для достижения специальных целей применяют и другие методы изучения и наблюдения гистологического препарата. Эти методы реализуют с помощью дополнительных приставок и устройств к обычным биологическим микроскопам или с помощью специализированных микроскопов.

Широко используют метод темного поля, когда объект освещается только косым светом с боковых сторон, поэтому детали объекта контурно выделяются на темном фоне. Метод фазового контраста предполагает, что объект освещают два луча со сдвинутой на четверть длиной волны фазы. Проходя через объект с разных сторон и дополнительно сдвигаясь по фазе структурами препарата, эти лучи в области первичного изображения скрещиваются. Вследствие интерференции происходит сложение или вычитание их амплитуд, что выражается в сильном изменении яркости структур объекта и сильном повышении его зрительного контраста.

Люминесцентная (флюоресцентная) микроскопия основана на флюоресценции — вынужденном свечении некоторых веществ, входящих в состав клеточных и тканевых структур, при освещении их лучами света с короткой длиной волны (первичная флюоресценция) или на флюоресценции специальных люминесцентных красителей (флюорохромов), которыми окрашивают препарат (вторичная люминесценция). При этом возбуждающий люминесценцию свет задерживается специальным (запирающим) фильтром окуляра и флюоресценция становится видна в поле зрения микроскопа. Этот метод позволяет выявлять не только невидимые с помощью других методов структуры клеток и тканей, но и судить об их качественном химическом составе.

При электронной микроскопии источник света заменен источником электронов (электронная пушка), с помощью высокого напряжения (100 000 В) разогнанных до большой скорости. Электроны, прошедшие через изготовленный по особым методикам препарат, находящийся в вакууме, фокусируются не стеклянными, а электромагнитными линзами, играющими роль объектива и окуляра, и проецируются на экран, покрытый люминофором. Подобно экрану телевизора под действием электронов он светится в видимом диапазоне, позволяя видеть увеличенные в сотни тысяч раз структуры объекта. Если узкий электронный луч не проходит через препарат, а последовательно пробегает (сканирует) его поверхность, в результате чего образуется трехмерное изображение, то данная разновидность электронного микроскопа называется растровой (сканирующей).

Демонстрация световых микроскопов разных марок, повторение устройства микроскопа и правил работы с ним. Разбор особенностей иммерсионной системы микроскопа. Демонстрация работы с иммерсионной системой:

### **Задание для самостоятельной работы** Контрольные вопросы

1. Изучить устройство светового микроскопа, освоить приемы работы с иммерсионным объективом микроскопа, заполнить таблицу.
2. Ответить на контрольные вопросы.

Основные узлы микроскопа	Функции

### Контрольные вопросы

1. Каково устройство бактериологического отдела?
2. Каковы основные правила техники безопасности?
3. Каковы основные правила работы с иммерсионным объективом светового микроскопа?
3. Как рассчитать степень увеличения микроскопа?

## **2.2 Лабораторная работа №2 (2 часа).**

**Тема: «Основные формы бактерий. Техника приготовления мазков. Анилиновые красители. Простые методы окрашивания»**

**2.2.1 Цель работы:** ознакомить студентов с формами бактерий, красителями, техникой простой окраски.

**2.2.2 Задачи работы:**

1. Познакомить студентов с основными формами бактерий.
2. Познакомить с основными анилиновыми красителями.
3. Освоить технику приготовления мазка.
4. Окрасить мазки простым методом.

**2.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Набор сухих бактериологических красок и их растворов.
2. Культуры бактерий, выращенных на МПА (*S.aureus*, *E.coli*, *B.subtilis*).
3. Световые микроскопы бинокулярные XSP-103Р.
4. Обезжиренные стекла, физиологический раствор, бактериологические петли, спиртовые горелки.

**2.2.4 Описание работы:**

Обычно форму бактерий, особенности строения и химического состава бактериальной клетки определяют путем микроскопии окрашенных препаратов. Окрашенные клетки четко видны. Кроме того, окрашенные бактерии становятся безопасными.

Отношение к различным красителям и методам окраски называют **тинкториальными свойствами** микроорганизмов. Для окраски микроскопических препаратов применяют синтетические анилиновые красители, которые дифференцируются на основные и кислые. У основных красителей ионом, придающим бактериальной клетке окраску, служит катион, у кислых – анион.

**Основные красители:** красные (нейтральный красный, сафранин, пиронин, фуксин основной); фиолетовые (генцианвиолет, кристалловиолет, метилвиолет, гематоксилин, тионин); синие (метиленовый синий, виктория); зеленые (малахитовый зеленый, метиленовый зеленый, янус зеленый).

**Кислые красители:** розовые и красные (кислый фуксин, эозин, эритрозин); желтые (аурантил, конго, пикриновая кислота); черные (нигрозин).

Из красителей готовят спиртовые и водные растворы красителей. Далее студентам демонстрируется техника приготовления мазка, его фиксация и окраска одним из красителей.

**Обработка предметных стекол.** Для приготовления мазка берут предметные стекла, предварительно вымытые и обезжиренные. Для этого не бывшие в употреблении стекла кипятят несколько минут в 1%-растворе соды, прополаскивают водой и слабой соляной

кислотой и тщательно промывают водой. После употребления стекла погружают на 2 часа в концентрированную серную кислоту. После чего кипятят в щелочи и промывают водой. Чистые стекла хранят в 26%-спирте, в банке с притертой пробкой.

**Приготовление мазка из бульонной культуры.** Пробирку с культурой кладут в левую руку на ладонь и придерживают большим пальцем. Прокаливают бактериологическую петлю на пламени спиртовки. Мизинцем правой руки вынимают пробку из пробирки. Обжигают на пламени край пробирки, отводят ее влево и вперед от пламени и, проводя еще раз бактериологическую петлю через пламя, вводят ее в пробирку. Захватывают петлей капельку культуры и наносят на предметное стекло. Обжигают петлю. Обжигают край пробирки, конец пробирки и закрывают пробирку. Культуру тонко распределяют по стеклу и прокаливают петлю. Мазок высушивают на воздухе или высоко над пламенем спиртовки в струе теплого воздуха

**Приготовление мазка из микробов, выращенных на плотной среде.** На предметное стекло петлей наносят каплю стерильного физиологического раствора. Из пробирки или из чашки стерильно берут петлей немного материала, смешивают петлей с физиологическим раствором и распределяют тонким слоем по стеклу. Мазок высушивают на воздухе или высоко над пламенем спиртовки в струе теплого воздуха.

**Фиксация препарата.** Фиксацией препарата преследуется цель прикрепить микробную культуру и обезвредить ее. Кроме того, фиксированный препарат лучше окрашивается. Высушенный мазок захватывают большим указательным пальцем и проводят 3–4 раза через пламя спиртовой горелки. Существуют химические методы фиксации: 1) смесь спирта с эфиром поровну на 10–15 мин; 2) ацетон 5 мин; 3) метиловый спирт 2–3 мин.

**Простой метод окраски.** На мазок наливают несколько капель краски, чаще всего метиленовой синьки или разведенного фуксина, на 2–3 минуты. Промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой.

#### **Задание для самостоятельной работы**

1. Приготовить микроскопические препараты из агаровых культур.
2. Окрасить их одним из красителей простым методом.
3. Промикроскопировать препараты, определить форму бактерий.
4. Заполнить протокол исследования.
5. Ответить на контрольные вопросы.

#### **Протокол исследований**

Исследуемый материал	Иммерсионная микроскопия	
	Рисунок	Метод окраски

#### **Контрольные вопросы**

1. Какие из красителей наиболее часто применяют в лабораторной практике?
2. Какова техника приготовления мазка?
3. Какова техника простой окраски мазков?

### **2.3 Лабораторная работа №3 (2 часа).**

**Тема: «Сложные методы окраски. Окраска по Граму и Цилю-Нильсену».**

**2.3.1 Цель работы:** познакомить студентов со сложными методами окраски, используемые для дифференциации бактерии.

### **2.3.2 Задачи работы:**

1. Познакомить студентов с основной дифференциально-диагностической окраской в бактериологии – окраской по Граму.
2. Раскрыть сущность окраски по Граму.
3. Познакомить студентов с дифференциальной окраской по Цилю-Нильсену.

### **2.3.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Смесь культур *E.coli* и *S.aureus*, отдельно выращенные культуры *B.subtilis*, *E. coli*, вакциновый штамм БЦЖ.
2. Световые микроскопы бинокулярные XSP-103Р.
3. Набор красителей для окраски по Граму и Цилю-Нильсену.
4. Обезжиренные предметные стекла, физиологический раствор, бактериологические петли, спиртовые горелки.
5. Табличный материал.

### **2.3.4 Описание работы**

При сложных методах окраски используются несколько различных красителей, что позволяет выявлять особенности строения и химического состава клеток.

**Окраска по Граму.** Самый распространенный метод дифференциальной окраски, основан на различиях в строении и химическом составе клеточной стенки. В зависимости от окраски все бактерии подразделяются на грамположительные и грамотрицательные. Эта окраска является важным диагностическим признаком, она коррелирует со многими другими свойствами бактерий. Сущность окраски заключается в том, что при обработке клеток прокариот сначала красителем генциановым фиолетовым, а затем йодом, образуется окрашенный комплекс, который при последующей обработке спиртом удерживается грамположительными бактериями и вымывается из клеток грамотрицательных бактерий, которые в результате обесцвечиваются. При последующей обработке фуксином они приобретают розово-красную окраску, а грамположительные имеют сине-фиолетовую окраску

Приготовление препаратов бактерий и окраска по Граму, включает следующие этапы:

1. Приготовление мазка.
2. Фиксация препарата.
3. Окрашивание препарата генциановым фиолетовым (1-2 мин.).
4. Обработка раствором Люголя до почернения.
5. Обработка 96° этиловым спиртом (0.5-1 мин.).
6. Промывание препарата водой.
7. Окрашивание фуксином (1-2 мин.).
8. Промывание препарата водой.
9. Высушивание препарата.
10. Микроскопирование препарата с иммерсионной системой.

При правильном окрашивании грамположительные бактерии имеют сине-фиолетовый цвет, грамотрицательные - красный цвет фуксина.

**Окраска по Цилю-Нильсену.** Применяется для дифференциации кислотоустойчивых и некислотоустойчивых микроорганизмов. Устойчивость бактерий к кислоте обусловлена повышенным содержанием в клеточной стенке и цитоплазме липидов, воска и оксикислот. Принцип основан на том, что кислотоустойчивые бактерии за счёт содержания указанных веществ прочно связывают карболовый фуксин при нагревании (т.е. окрашиваются в красный цвет) и не обесцвечиваются кислотой. Некислотоустойчивые бактерии обесцвечиваются серной кислотой и при использовании дополнительного красителя – метиленового синего окрашиваются в синий цвет. Споры кислотоустойчивы, поэтому красятся в красный цвет.

Окраска по Цилю–Нильсену:

1. На фиксированный мазок наносят карболовый раствор фуксина через полоску фильтровальной бумаги и подогревают до появления паров в течение 3-5 мин.
2. Снимают бумагу, промывают мазок водой.
3. На мазок наносят 5% раствор серной кислоты или 3% раствор солянокислого спирта на 1-2 мин для обесцвечивания.
4. Промывают водой.
5. Докрашивают мазок водным раствором метиленового синего в течение 3-5 мин.
6. Промывают водой, высушивают и микроскопируют.

#### **Задание для самостоятельной работы**

1. Из смеси культур *E.coli* и *S.aureus* и отдельно выращенных культур *B.subtilis*, *E. coli*, приготовить мазки, окрасить по методу Грама, промикроскопировать, заполнить протокол №1.
2. Из вакцинного штамма БЦЖ приготовить мазки, окрасить по методу Циля–Нильсена, промикроскопировать и заполнить протокол №2.
3. Ответить на контрольные вопросы.

#### **Протокол исследования №1**

Исследуемый материал	Ингредиенты окраски по Граму и время их действия	Назначение основных ингредиентов	Результат (рисунок с обозначениями)

#### **Протокол исследования № 2**

Исследуемый материал	Ингредиенты окраски по Цилю–Нильсену	Назначение основных ингредиентов	Результат (рисунок с обозначениями)

#### **Контрольные вопросы**

1. Каково строение и химический состав клеточной стенки бактерий.
2. Основные отличия грамположительных и грамотрицательных бактерий?
3. Какова сущность окраски по Граму?
4. Какова сущность окраски по Цилю–Нильсону?

#### **2.4 Лабораторная работа №4 (2 часа).**

#### **Тема: «Окраска капсул, спор. Определение подвижности микроорганизмов».**

**2.4.1 Цель работы:** ознакомить студентов с методами обнаружения у бактерий спор, капсул, определения подвижности.

#### **2.4.2 Задачи работы:**

1. Познакомить студентов с методами окраски капсул.
2. Познакомить студентов с методами окраски спор.
3. Познакомить студентов с методами определения подвижности бактерий.

#### **2.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Культура *B. subtilis* на стадии спорообразования, 20-ти часовая культура *E.coli*.
2. Готовые окрашенные мазки-отпечатки с *B. anthracis*, окрашенные по Михину и

- Ольту.
3. Табличный материал.
  4. Красители, предметные и покровные стекла, стекла с лунками, физиологический раствор, бактериологические петли, спиртовые горелки, вазелин.
  5. Световые микроскопы бинкулярные XSP-103Р.

#### 2.4.4 Описание работы

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

Примером дифференциального способа окраски спор является окраска по методу Вальдмана, Шеффера-Фултона.

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

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

**Подвижность микроорганизмов.** Это видовой признак и всегда учитывается при изучении вида, его морфологической характеристики. Осуществляется подвижность с помощью жгутиков, которые представляют собой тонкие, длинные нити белковой природы, прикрепляющиеся к ЦПМ. Диаметр жгутиков менее 0,02 мкм, поэтому в световом микроскопе не видны. Их обнаруживают в электронном микроскопе и при специальных методах обработки. Жгутики не являются жизненно важными структурами клетки, в определенных фазах развития они могут отсутствовать, чаще при старении культур. По наличию жгутиков бактерии делятся на монотрихи – бактерии с одним полярно расположенным жгутиком, амфитрихи – жгутики имеются на обоих концах, по одному или несколько, лофотрихи – пучок жгутиков на одном конце клетки, перитрихи – бактерии со множеством жгутиков, расположенных по всей поверхности клетки. Монотрихи и лофотрихи осуществляют поступательное движение, амфитрихи и перитрихи – беспорядочное. Для определения подвижности бактерий берут молодые культуры 12–24 часовые. Классификация подвижных форм: 1) монотрихи; 2) амфитрихи; 3) лофотрихи; 4) перитрихи.

Подвижность бактерий исследуют двумя методами: «висячая» капля и «придавленная».

**Метод «висячая» капля.** Каплю молодой бульонной культуры или каплю взвеси в физиологическом растворе агаровой – наносят на покровное стекло. Используют предметное стекло с углублением (луночкой), край луночки смазывают вазелином.

Предметное стекло приклеивают к покровному и переворачивают вверх покровным стеклом. В таком препарате капля повешена с внутренней поверхности покровного стекла и находится в герметически закрытой влажной камере. Препарат микроскопируют при затемненном поле зрения (пользуются диафрагмой опущенным конденсором). При малом увеличении находят край капли, затем, приподняв тубус, переводят в рабочее состояние объектив среднего увеличения (40–60 раз), под контролем глаза (смотреть сбоку) опускают тубус до соприкосновения фронтальной линзы объектива с покровным стеклом. Глядя в окуляр, слегка приподнимают тубус, находят поле зрения, край капли. Микровинтом регулируют видимость, изучают характер движения.

**Метод «раздавленная» капля.** На обычное предметное стекло наносят каплю молодой бактериальной культуры, накрывают покровным стеклом так, чтобы между стеклами не образовались пузырьки воздуха и капля не выходила за края покровного стекла. Осторожно опускают объектив под контролем глаза (смотреть сбоку) и микроскопируют. Иногда подвижность микробов определяют методом Шукевича. Для этого каплю культуры вносят в конденсат скошенной плотной среды (мясопептонного агара) в пробирке. Подвижные бактерии, передвигаясь из конденсата, растут на поверхности среды, неподвижные виды размножаются только в конденсате.

### **Задание для самостоятельной работы**

1. Ознакомится с некоторыми методами окраски спор и осуществить окраску спор по методу Шеффера-Фултона и Вальдмана.
2. Ознакомится с методами окраски капсул, промикроскопировать мазки с окрашенными капсулами *B. anthracis* по методу Ольта и Михина.
3. Ознакомится с методами определения подвижности, приготовить препараты «висячая капля» и «раздавленная капля» и промикроскопировать их, понаблюдать за движением бактерий.
4. Заполнить таблицы.
5. Ответить на контрольные вопросы.

#### **Протокол исследования**

Компонент бактериальной клетки	Исследуемый материал	Метод обнаружения, окраска	Результат (рисунок с обозначением)

#### **Контрольные вопросы**

1. В чем сущность окраски спор?
2. На чем основывается окраска капсул?
3. Какие методы изучения подвижности бактерий существуют в микробиологической практике?
4. Как классифицируются подвижные бактерии?

### **2.5 Лабораторная работа №6 (4 часа).**

Тема: «Морфология, способы размножения и классификация грибов».

**2.5.1 Цель работы:** ознакомить студентов с особенностями морфологии, размножения, классификации микроскопических грибов.

**2.5.2 Задачи работы:**

1. Познакомить студентов с морфологическими особенностями и способами размножения грибов.
2. Отработать технику приготовления препаратов для микроскопии.

3. Отработать методы идентификации микроскопических грибов.

### **2.5.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Культуры грибов родов *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus* и дрожжей.
2. Красители, предметные и покровные стекла, смесь глицерина и спирта, раствор, микологические иглы, спиртовые горелки.
3. Световые микроскопы бинокулярные XSP-103Р, лупы.

### **2.5.4 Описание работы**

Грибы – хемоорганотрофные эукариотические микроорганизмы, лишенные фотосинтетических пигментов. Широко распространены в природе. Грибы относятся к царству Mycota в который входят истинные грибы (Eumycota) и слизневики. Слизневики - (Mucomycota) Миксомицеты, своеобразные организмы, встречающиеся в виде слизистой массы и передвигаются подобно амебам. В этой массе не разделенной на клетки много ядер. Размножаются простым делением. В некоторые периоды времени слизистые массы соединяются друг с другом и образуют плодовое тело в котором возникают споры. Среди миксомицетов есть паразиты растений, они вызывают, например Килу капусты. Истинные грибы (Eumycota) делятся на 5 классов:

1. Хитридиомицеты (*Chytridiomycetes*)
2. Зигомицеты (*Zygomycetes*)
3. Аскомицеты (*Ascomycetes*)
4. Базидиомицеты (*Basidiomycetes*)
5. Дейтеромицеты (*Deuteromycetes*) - несовершенные грибы.

**Морфология грибов.** У большинства видов грибов вегетативное тело (*таллом*) состоит из ветвящихся нитевидных клеток – *гифов*, образующих *мицелий* или *грибницу*.

Различают мицелий субстратный и воздушный. Попадая в субстрат, гифы растут концевыми участками и ветвятся радиально от центра к периферии. У некоторых грибов для прикрепления к субстрату существуют специальные ризоиды – корешкообразные выросты. К видоизмененному мицелию относят также склероции – округлые или продолговатые сплетения гифов, содержащие много питательных веществ, необходимые гриbam в неблагоприятных условиях.

По строению мицелия грибы подразделяются на низшие грибы (фимомицеты) и высшие грибы (микомицеты). Низшие грибы имеют несептированный мицелий, представленный одной разветвленной гигантской клеткой без перегородок со множеством ядер. Высшие грибы характеризуются септированным мицелием, гифы разделены перегородками (септами) на отдельные одноядерные или многоядерные клетки. У некоторых высших грибов – дрожжей, мицелий отсутствует, а вегетативное тело представлено отдельными клетками с клеточной стенкой.

Способы размножения грибов. Различают вегетативный и репродуктивный способы размножения. Вегетативный способ размножения происходит без участия специальных органов, простым распадением мицелия на обособленные клетки: хламидоспоры; оидии; артроспоры; бластоспоры.

Репродуктивный способ включает бесполое и половое размножение.

Бесполое размножение осуществляют особые клетки, которые развиваются эндогенно (спорангииоспоры, зооспоры) или экзогенно (конидии). Половое размножение происходит в результате слияния ядер двух клеток и последующего редукционного деления образуются специализированные гифы с органами полового спороношения – сумками (асками), в которых развиваются аскоспоры у аскомицетов и базидиями, в которых развиваются базидиоспоры у базидиомицетов.

Грибы, способные к половому размножению называются совершенными, развивающиеся без полового размножения – несовершенные.

К микомицетам относят грибы родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*.

Дрожжи – представители класса *Ascomycetes* – одноклеточные организмы круглой или овальной формы. Размножение дрожжей происходит почкованием или делением.

**Особенности микроскопического исследования грибов.** Грибы обычно исследуют в неокрашенном состоянии. На предметное стекло наносят каплю жидкости, состоящей из воды, этанола и глицерина в равных объемах. Микологическим крючком берут кусочек мицелия, расправляют препаровальной иглой и накрывают покровным стеклом. Микроскопируют с объективом  $\times 40$  при затемненном поле зрения.

#### **Задания для самостоятельной работы**

1. Приготовить препараты из культур грибов родов *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus* и дрожжей.
2. Изучить под микроскопом строение мицелия, морфологию органов плодоношения и спор, заполнить таблицу.
3. Ответить на контрольные вопросы.

#### **Протокол исследования**

Исследуемый материал	Результат (рисунок с обозначениями)

#### **Контрольные вопросы**

1. Каковы характерные особенности микроскопических грибов?
2. В чем характерное отличие высших и низших грибов?
3. В чем характерные особенности грибов *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus* и дрожжей?

### **2.6 Лабораторная работа №6 (2 часа).**

#### **Тема: «Методы стерилизации»**

**2.6.1 Цель работы:** ознакомить студентов с назначением и основными методами стерилизации, применяемыми в микробиологии.

#### **2.7.2 Задачи работы:**

1. Познакомить студентов с основными методами стерилизации.
2. Осуществить стерилизацию инструментария методом кипячения и простерилизовать жидкость с помощью фильтра Зейтца.

#### **2.6.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Автоклавы, печь Пастера, аппарат Коха, керамические, асbestовые и мембранные фильтры, лампы бактерицидные, стерилизаторы, фильтр Зейтца.
2. Лабораторная посуда, шприцы, пинцеты, колба Бунзена.

#### **2.6.4 Описание работы**

Стерилизация, в отличие от дезинфекции, предусматривает уничтожение в стерилизуемом объекте всех вегетативных и споровых, патогенных и непатогенных микроорганизмов. Стерилизацию производят различными способами: паром, сухим горячим воздухом, кипячением, фильтрацией и т. д. Выбор того или иного способа стерилизации определяется качеством и свойствами микрофлоры стерилизуемого объекта.

##### **Виды стерилизации**

Стерилизация кипячением. Стерилизацию кипячением производят в стерилизаторе. В стерилизатор наливают дистиллированную воду, так как водопроводная образует накипь. (Стеклянные предметы погружают в холодную, металлические предметы — в горячую

воду с добавлением гидрокарбоната натрия). Стерилизуемые предметы кипятят на слабом огне 30-60 минут. Началом стерилизации считается момент закипания воды в стерилизаторе. По окончании кипения инструменты берут стерильным пинцетом, который кипятят вместе с остальными предметами.

Стерилизация сухим жаром. Стерилизация сухим жаром производится в печи Пастера. Подготовленный к стерилизации материал кладут на полки так, чтобы он не соприкасался со стенками. Шкаф закрывают и после этого включают обогрев. Продолжительность стерилизации при температуре 150°C 2 ч, при 165°C – 1 ч, при 180°C – 40 мин, при 200°C – 10-15 мин (при 170°C бумага и вата желтеют, а при более высокой температуре обугливаются). Началом стерилизации считается тот момент, когда температура в печи достигнет нужной высоты. По окончании срока стерилизации печь выключают, но дверцы шкафа не открывают до полного охлаждения, так как холодный воздух, поступающий внутрь шкафа, может вызвать образование трещин на горячей посуде.

Стерилизация паром под давлением. Стерилизацию паром под давлением производят в автоклаве. Автоклав состоит из двух котлов, вставленных один в другой, кожуха и крышки. Наружный котел называют водопаровой камерой, внутренний — стерилизационной камерой. В водопаровом кotle происходит образование пара. Во внутренний котел помещают стерилизуемый материал. В верхней части стерилизационного котла имеются небольшие отверстия, через которые проходит пар из водопаровой камеры. Крышка автоклава герметически привинчивается к кожуху. Кроме перечисленных основных частей, автоклав имеет ряд деталей, регулирующих его работу: манометр, водомерное стекло, предохранительный клапан, выпускной, воздушный и конденсационный краны. Манометр служит для определения давления, создающегося в стерилизационной камере. Нормальное атмосферное давление (760 мм рт. ст.) принимается за нуль, поэтому в неработающем автоклаве стрелка манометра стоит на нуле. Между показаниями манометра и температурой имеется определенная зависимость. Соотношения показаний манометра и температуры кипения воды

Показания манометра, атм.	$t$ кипения воды, °C	Показания манометра, атм.	$t$ кипения воды, °C
0,0	100°	0,8	117°
0,2	105°	0,9	119°
0,4	110°	1,0	121°
0,5	112°	1,5	127°
0,6	114°	2,0	134°
0,7	116°		

Красная черта на шкале манометра определяет максимальное рабочее давление, которое допускается в автоклаве. Предохранительный клапан служит для предохранения от чрезмерного повышения давления. Его устанавливают на заданное давление, то есть, давление, при котором нужно производить стерилизацию, при переходе стрелки манометра за черту клапан автоклава автоматически открывается и выпускает лишний пар, замедляя тем самым дальнейший подъем давления.

На боковой стенке автоклава имеется водомерное стекло, показывающее уровень воды в водопаровом кotle. На трубке водомерного стекла нанесены две горизонтальные черты — нижняя и верхняя, обозначающие соответственно допускаемый нижний и верхний уровень воды в водопаровой камере. Воздушный кран предназначен для удаления воздуха из стерилизационной и водопаровой камер в начале стерилизации, так как воздух, являясь плохим проводником тепла, нарушает режим стерилизации. На дне автоклава находится конденсационный кран для освобождения стерилизационной камеры от конденсата, образующегося в период нагревания стерилизуемого материала.

Стерилизация текучим паром. Стерилизация текучим паром производится в текучепаровом аппарате Коха или в автоклаве при незавинченной крышке и открытом выпускном кране. Аппарат Коха представляет собой металлический полый цилиндр с двойным дном. Пространство между верхней и нижней пластинками дна заполняют на 2/3 водой (для спуска оставшейся после стерилизации воды есть кран). Крышка аппарата имеет в центре отверстие для термометра и несколько небольших отверстий для выхода пара. Стерилизуемый материал загружают в камеру аппарата неплотно, чтобы обеспечить возможность наибольшего контакта его с паром. Началом стерилизации считается время с момента закипания воды и поступления пара в стерилизационную камеру. В текучепаровом аппарате стерилизуют, главным образом, питательные среды, свойства которых изменяются при температуре выше 100°C. Стерилизацию текучим паром проводят повторно, так как однократное прогревание при температуре 100°C не обеспечивает полного обеззараживания. Такой метод получил название дробной стерилизации: обработку стерилизуемого материала текучим паром проводят по 30 минут ежедневно в течение 3 дней. В промежутках между стерилизациями материал выдерживают при комнатной температуре для прорастания спор в вегетативные формы, которые погибают при последующих прогреваниях.

Тиндализация. Тиндализация—дробная стерилизация с применением температуры ниже 100°C, предложенная Тиндалем. Прогревание стерилизуемого материала производят в водяной бане, снабженной терморегулятором, по часу при температуре 60—65°C в течение 5 дней или при 70—80°C в течение 3 дней. В промежутках между прогреваниями обрабатываемый материал выдерживают при температуре 25°C для прорастания спор в вегетативные формы, которые погибают при последующих прогреваниях. Тиндализацией пользуются для обспложивания питательных сред, содержащих белок.

Механическая стерилизация с помощью бактериальных ультрафильтров. Бактериальные фильтры применяют для освобождения жидкости от находящихся в ней бактерий, а также для отделения бактерий от вирусов, фагов и экзотоксинов. Вирусы бактериальными фильтрами не задерживаются, и поэтому ультрафильтрацию нельзя рассматривать как стерилизацию в принятом значении этого слова. Для изготовления ультрафильтров применяют мелкопористые материалы (каolin, асбест, нитроцеллюлоза и др.), способные задерживать бактерии. Асbestовые фильтры (фильтры Зейтца) представляют собой асbestовые пластиинки толщиной 3—5 мм и диаметром 35 и 140 мм для фильтрации малых и больших объемов жидкости. В нашей стране асbestовые фильтры, изготавлиают двух марок: «Ф» (фильтрующие), задерживающие взвешенные частицы, но пропускающие бактерии, и «СФ» (стерилизующие), более плотные, задерживающие бактерии. Перед употреблением асbestовые фильтры монтируют в фильтровальные аппараты и вместе с ними стерилизуют в автоклаве. Асbestовые фильтры используются однократно. Мембранные ультрафильтры изготавливаются из нитроцеллюлозы и представляют собой диски белого цвета диаметром 35 мм и толщиной 0,1 мм.

Бактериальные фильтры различаются по величине пор и обозначаются порядковыми номерами:

1. фильтр №1 — диаметр пор 0,3 мкм;
2. фильтр №2 — диаметр пор 0,5 мкм;
3. фильтр №3 — диаметр пор 0,7 мкм;
4. фильтр №4 — диаметр пор 0,9 мкм;
5. фильтр №5 — диаметр пор 1,2 мкм.

### **Задания для самостоятельной работы**

1. Ознакомится с разными методами стерилизации.
2. Определить достоинства и недостатки каждого метода, заполнить таблицу.
3. Смонтировать фильтр Зейтца и простериллизовать жидкость.
4. Подготовить лабораторную посуду для стерилизации.

5. Простерилизовать шприцы, пинцеты и скальпели в стерилизаторе.

Метод стерилизации	Устройство аппарата	Режимы стерилизации	Стерилизуемые объекты	Достоинства и недостатки метода

### **Контрольные вопросы**

Что такое стерилизация?

Каковы основные методы стерилизации?

Каково устройство и назначение автоклава?

Каково устройство и назначение печи Пастера?

Чем обусловлена дробная стерилизация в аппарате Коха?

## **2.7 Лабораторная работа №7 (2 часа).**

**Тема: «Питательные среды в микробиологической практике».**

**2.7.1 Цель работы:** познакомить студентов с основными питательными средами, используемыми в микробиологической практике.

### **2.7.2 Задачи работы:**

1. Познакомить студентов с классификациями питательных сред и требованиями, предъявляемыми к ним.
2. Познакомить с прописями наиболее употребляемых питательных сред.
3. Самостоятельно приготовить и простерилизовать среды.

### **2.7.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Агар-агар, пептон, желатин, мясная вода, МПА, МПБ, МПЖ, среда Китт-Тароцци, среда Эндо, Левина, Гисса, кровяной МПА.
2. Электрическая плитка, pH-метр, индикаторные бумажки, лабораторная посуда.

### **2.7.4 Описание работы**

Среды необходимы для накопления, выделения и сохранения микроорганизмов, а также для выращивания культур с целью исследования их обмена веществ или получения ценных продуктов метаболизма.

Требования, предъявляемые к средам. Среды должны соответствовать следующим условиям: 1) быть питательными, то есть должны содержать все компоненты, необходимые для конструктивных и энергетических процессов клетки - источники углерода, азота, зольные элементы, микроэлементы, факторы роста (витамины, некоторые аминокислоты, которые клетка не может синтезировать); 2). иметь оптимальную концентрацию водородных ионов (pH), так как только при оптимальной реакции среды, влияющей на проницаемость оболочки, микроорганизмы могут усваивать питательные вещества; 3). быть изотоничными для микробной клетки, т.е. осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки. Для большинства микроорганизмов оптимальна среда, соответствующая 0,5% раствору натрия хлорида; 4). быть стерильными, так как посторонние микробы препятствуют росту изучаемого микробы, определению его свойств и изменяют свойства среды; 5). плотные среды должны быть влажными и иметь оптимальную для микроорганизмов консистенцию; 6). обладать определенным окислительно-восстановительным потенциалом, то есть соотношением

веществ, отдающих и принимающих электроны, выражаемым индексом RH2. Окислительно-восстановительный потенциал большинства сред удовлетворяет требованиям к нему аэробов и факультативных анаэробов; 7) быть по возможности унифицированными, т.е. содержать постоянные количества отдельных ингредиентов.

По консистенции среды бывают жидкие (мясо-пептонный бульон), полужидкие и плотные (мясо-пептонный агар). Основу многих питательных сред составляет мясная вода, которую готовят из свежего нежирного говяжьего мяса. Для приготовления плотных сред к мясной воде прибавляют 1,5- 2,5% агар-агара (полисахарид, получаемый из некоторых морских водорослей) или 10-15% желатина, которые используются для уплотнения среды. При приготовлении полужидких сред вносят 0,1- 0,2% агара.

По составу среды делят на простые и сложные. К первым относят мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар (МПА), бульон и агар Хоттингера, питательный желатин и пептонную воду. Сложные среды готовят, прибавляя к простым средам кровь (кровяной агар), сыворотку (сывороточный агар), углеводы и другие вещества, необходимые для роста и размножения того или иного микроорганизма.

По происхождению среды для культивирования делят также на три группы: естественные или натуральные, синтетические и полусинтетические. Натуральные среды состоят из продуктов животного и растительного происхождения, имеющих сложный неопределенный химический состав. К ним относят: овощные и фруктовые соки, животные ткани, молоко, молочную сыворотку, пивное сусло, мелассу, отвары и экстракты, полученные из природных субстратов. Эти среды имеют сложный, непостоянный химический состав и используются, главным образом, для поддержания культур микроорганизмов, накопления их биомассы и диагностических целей. К числу натуральных сред, широко применяемых в лабораторной практике, относятся мясо-пептонный бульон, мясо- пептонный агар, солодовое (неохмеленное пивное) сусло, дрожжевые среды, обезжиренное молоко и т. д.

В состав синтетических сред входят только определенные, химически чистые соединения, взятые в точно указанных концентрациях. В большинстве случаев их готовят на водопроводной воде без добавления микроэлементов, так как они в небольших количествах всегда в ней содержатся. При изучении потребностей микроорганизмов в отдельных компонентах минеральных солей для приготовления синтетических сред используют дистиллированную воду. В этом случае микроэлементы вносят в среду обязательно. Синтетические среды используют для исследований, связанных с изучением обмена веществ микроорганизмов.

Среды, в состав которых наряду с соединениями известной химической природы (углеводы, соли аммония или нитраты, фосфаты и т. д.) входят вещества неопределенного состава (дрожжевой автолизат, кукурузный экстракт, меласса, гидрол, молочная сыворотка, барда и т. д.), относят к полусинтетическим. Эти среды обычно используются в биотехнологии для промышленного культивирования микроорганизмов с целью получения витаминов, антибиотиков, аминокислот и других продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

По назначению различают универсальные среды, содержащие питательные вещества, в присутствии которых растут многие виды микроорганизмов (мясо-пептонный бульон, мясо-пептонный агар); специальные среды, которые применяют для выращивания микроорганизмов, не размножающихся на универсальных средах; элективные, дифференциально-диагностические, накопительные, оптимальные среды. Элективные среды служат для выделения определенного вида микроорганизмов, задерживая или подавляя рост сопутствующих микроорганизмов. Жидкие элективные среды называют средами накопления. Дифференциально-диагностические (индикаторные) среды позволяют достаточно быстро отличить одни виды микроорганизмов от других по ферментативной активности, например, среды Гисса с углеводами и индикатором. Состав этих сред подбирают с таким расчетом, чтобы он позволил четко выявить наиболее

характерные свойства определенного вида. Примером индикаторной среды для выявления бактерий семейства из группы кишечной палочки является агаризованные среды Эндо, которая содержит лактозу и фуксин, обесцвеченный сульфатом натрия, *E.coli* ферментирует лактозу, фуксин освобождается и окрашивает колонии кишечной палочки в красный цвет.

Накопительные среды были предложены голландским ученым М. Бейеринком. В них интересующий исследователя компонент среды дается в избытке, чтобы выяснить, какой микроорганизм или группа микроорганизмов его используют, поскольку именно он или они будут доминировать в этой среде.

Приготовление обычных питательных сред. Основой для приготовления этих сред служит мясная вода, содержащая экстрактивные вещества.

Посуда. Питательные среды готовят в кастрюлях, эмалированных или из нержавеющей стали. Готовые питательные среды разливают во флаконы, пробирки, чашки. Новую стеклянную посуду кипятят в 1—2% растворе соляной кислоты для нейтрализации растворимой щелочи, затем тщательно промывают в проточной воде и сушат. Посуду, бывшую в употреблении, стерилизуют, затем моют, прополаскивают и сушат. Сухие флаконы, колбы, пробирки закрывают ватно-марлевыми пробками.

Мясная вода. 500 г свежей говядины или телятины освобождают от костей, жира и сухожилий, пропускают через мясорубку, фарш заливают 1 литром водопроводной воды, хорошо размешивают. Оставляют на сутки в прохладном месте или помещают на 2 часа в термостат. Мясную пасту отжимают через марлю, кипятят в течение 5 минут. Для свертывания белков дают остыть. Фильтруют через ватный фильтр, доливают водой до первоначального объема. Мясную воду разливают во флаконы, стерилизуют 20-30 минут при 120°C и сохраняют в темном месте. Она имеет вид прозрачной желтоватой жидкости слабокислой реакции (рН 6,2—6,4), без белков. В мясной воде содержится небольшое количество аминокислот, солей, углеводов, факторов роста и экстрактивных веществ. Для приготовления обычных питательных сред к мясной воде прибавляют сухой пептон, который является первичным продуктом гидролиза белка и состоит из смеси полипептидов и аминокислот, полученных путем пептического или триптического переваривания.

На мясокомбинатах для производства сухого пептона используют фибрин, кровь и другие отходы. Сушат пептон в распылительной вакуум-сушилке.

Жидкий пептон можно приготовить в лабораторных условиях путем пептического переваривания белков.

Мясо-пептонный бульон (МПБ). В 1 л мясной воды растворяют при подогревании и помешивании 10 г пептона (1%) и 5 г (0,5%) хлористого натрия. Рекомендуется брать 3 части хлористого натрия и 2 части двузамещенного фосфорнокислого натрия. Смесь вводится в количестве 0,5%. Фосфорнокислый натрий стабилизирует реакцию среды и служит дополнительным источником фосфора. Устанавливают рН среды до 7,6—7,8, кипятят 30—45 минут до выпадения осадка.

Охлаждают, фильтруют через бумажный фильтр, доливают водой до первоначального объема, проверяют рН.

Разливают по пробиркам, флаконам и стерилизуют 15—20 минут в автоклаве при 120°C. Концентрированный мясо-пептонный бульон готовят на особой мясной воде (1 кг мяса заливают 1 л воды). Такой бульон служит для выращивания анаэробных и других микробов.

Мясо-пептонный агар (МПА). К мясо-пептонному бульону для придания плотности добавляют 2—2,5% мелко нарезанного и промытого агар-агара.

Агар-агар получают путем специальной обработки морских водорослей. Он является веществом полисахаридной природы, содержит незначительное количество азота и не представляет собой питательный субстрат. Студень, образуемый агар-агаром, расплавляется при 70—100°C и застывает при 40—50°.

Кипятят, помешивая, до полного расплавления агара. В некоторых случаях для просветления среды прибавляют белок одного куриного яйца, смешанного с двойным количеством холодной воды. Среду помещают в автоклав на 45 минут при 115°C. Свернувшиеся хлопья белка адсорбируют взвешенные частицы и осаждаются на дно.

Проверяют и исправляют реакцию среды. Отстаивают и фильтруют через ватно-марлевый фильтр в горячем автоклаве или в специальной металлической воронке с двойными стенками, между которыми находится горячая вода.

Разливают среду через стеклянную воронку с зажимом в пробирки и флаконы и стерилизуют в автоклаве при 120°C в течение 15—20 минут.

Из расплавленного стерильного мясо-пептонного агара приготовляют скошенный и прямой агар (агар столбиком). В первом случае пробирки укладывают горизонтально до полного застывания, во втором — пробирки помещают в штатив вертикально.

В настоящее время бактериологические лаборатории широко используют сухие питательные среды в виде порошков, хранящихся в герметически закрытых банках и пакетах.

Кроме обычных питательных сред (МПБ и МПА), имеются специальные и дифференциально-диагностические среды. Готовят среды по прописи, указанной на этикетке, навеску порошка растворяют в определенном объеме дистиллированной воды, среду разливают в пробирки и стерилизуют при соответствующей температуре. Постоянство состава, стандартность среды, простота и удобство в работе, легкость транспортировки и хранения являются большим преимуществом сухих питательных сред. Для определения pH плотных питательных сред их расплавляют. Определяют pH с использованием pH-метров или (менее точно) с помощью индикаторной бумаги.

После установления соответствующего pH среду кипятят, фильтруют, осветляют, разливают во флаконы, пробирки и стерилизуют. Следует учитывать, что после стерилизации среда становится более кислой.

Стерилизация питательных сред. Стерилизацию питательных сред осуществляют различными способами в зависимости от тех ингредиентов, которые входят в их состав.

Синтетические среды и все агаровые среды, не содержащие в своем составе нативного белка и углеводов, стерилизуют 15—20 мин в автоклаве при температуре 115—120°C.

Среды с углеводами и молоком (в состав которого входит лактоза), питательный желатин стерилизуют текучим паром при температуре 100°C дробно или в автоклаве при 112°C.

Среды, в состав которых входят белковые вещества (сыворотка крови, асцитическая жидкость), обсплюживаются тиндализацией или фильтрованием.

Для стерилизации питательных сред, содержащих в своем составе нативные белки, пользуются фильтрацией через мембранные фильтры Зейтца.

Подготовленные к употреблению питательные среды проверяют на стерильность. Для этого их ставят в термостат при температуре 37°C. Среды, простерилизованные в автоклаве, выдерживают в термостате 1 сутки, простерилизованные текучим паром — 3 суток.

### **Задания для самостоятельной работы**

1. Познакомится с прописями питательных сред наиболее часто употребляемых, заполнить таблицу.
2. Приготовить МПА и МПБ, разлить по пробиркам и колбам.
3. Приготовить среду Эндо, разлить по чашкам Петри.
4. Ответить на контрольные вопросы

Название питательной среды	Состав и способ приготовления	Для культивирования какого возбудителя предназначена

### **Контрольные вопросы**

Какие требования предъявляются к питательным средам?

Как классифицируются питательные среды по консистенции?

Как классифицируются питательные среды по происхождению?

Как классифицируются питательные среды по назначению?

Каков состав МПБ?

Каков состав МПА?

Каков состав МПЖ?

## **2.8 Лабораторная работа № 8 (2 часа).**

**Тема: «Техника посева и методы культивирования микроорганизмов »**

**2.8.1 Цель работы:** освоение студентами техники посева микроорганизмов на питательные среды и их культивирования.

**2.8.2 Задачи работы:**

1. Познакомить студентов с техникой посева микроорганизмов на плотные и жидкие питательных сред
2. Познакомить студентов с методами культивирования аэробов и анаэробов.

**2.8.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Бульонные и агаровые культуры *E.coli*, *S.aureus*, *B. Subtilis*
2. Стерильные МПА и МПБ в пробирках и чашках.
3. Стеклянные шпатели, пастеровские пипетки, бактериологические петли, спиртовые горелки.
4. Термостат суховоздушный, анаростат, эксикатор, газпак.

### **2.8.4 Описание работы**

Техника посева микроорганизмов.

Бактериологический метод—выделение чистых культур микробов и их последующая идентификация — имеет большое значение в диагностике инфекционных заболеваний, но первым этапом этой методики является посев или пересев бактериальной культуры на различные типы питательной среды. Материалом для посева могут быть пересеваемые культуры бактерий, различные выделения животных и человека, ткани трупа, вода, почва, продукты питания. Жидкий материал для посева берут петлей или пипеткой. При взятии петлей жидкость должна образовать в кольце петли тонкую прозрачную пленку — «зеркало». Пипетками пользуются в том случае, когда материал засевают в большом или точно отмеряют объеме.

Способ взятия плотного материала определяется его консистенцией. При посевах чаще всего пользуются бактериальной петлей. Все манипуляции, связанные с посевом и выделением микробных культур, производят над пламенем горелки. Бактериальную петлю прокаливают над пламенем непосредственно перед взятием материала, затем петлю остужают. Для этого при пересеве микробной культуры с пробирки горячую петлю погружают в конденсационную жидкость, а при пересеве с чашек Петри прикасаются к поверхности питательной среды, свободной от микробного роста. Достаточно остуженная петля не вызывает шипения конденсационной жидкости и не растапливает агар при соприкосновении со средой. После окончания посева петлю прожигают повторно для уничтожения находящейся на ней микробной культуры или инфицированного микроорганизмами материала.

Пипетки и шпатели, используемые для посевов, так же, как и бактериальные петли, перед посевом прожигают, а после посевов опускают в дезинфицирующий раствор.

Перед посевом вся посуда проверяется на целостность, далее, на чашках Петри со стороны дна, на пробирках в верхней трети, надписывают название засеянного материала или ставят номер анализа и дату посева.

Техника посевов на плотные и жидкие питательные среды. При посеве в жидкую питательную среду петлю с находящимся на ней материалом погружают в среду. Если материал вязкий и с петли не снимается, его растирают на стенке сосуда, а затем смывают жидкой средой. Жидкий материал, набираемый в пастеровскую или градуированную пипетку, вливают в питательную среду. При посеве на скошенный мясо-пептонный агар пробирку берут в левую руку между I и II пальцами, чтобы основание пробирки находилось на поверхности кисти руки и посев осуществлялся под контролем глаза. Пробку из пробирки вынимают правой рукой V и IV пальцами, не прикасаясь к той части пробки, которая входит внутрь пробирки. Остальные 3 пальца правой руки остаются свободными для взятия бактериальной петли, посредством которой производится посев. Петлю держат, как писчее перо. После вынимания пробки пробирку с питательной средой держат в наклонном положении во избежание попадания в нее посторонних микроорганизмов из воздуха. Петлю с находящимся на ней пересеваемым материалом вводят в пробирку до дна, опускают плашмя на поверхность питательной среды и скользящими движениями наносят штрихи снизу вверх, от одной стенки пробирки к другой. При посеве на поверхность плотной питательной среды в чашки Петри чашку держат в левой руке. Дно ее с одной стороны придерживают I и II пальцами, а с другой — IV и V пальцами. Крышку, приоткрытую настолько, чтобы в образовавшуюся щель свободно проходили петля или шпатель, фиксируют I и III или I и II пальцами. Небольшое количество исследуемого материала втирают бактериальной петлей в поверхность питательной среды у края чашки. Затем петлю прожигают, чтобы уничтожить избыток находящегося на ней материала. Линию посева начинают с того места, в котором находится материал. Бактериальную петлю кладут плашмя на питательную среду, чтобы не поцарапать ее поверхности, и проводят штрихи по всей среде или по секторам, разграфив предварительно дно чашки (при условии, что среда прозрачна) на несколько равных частей. Нужно стараться, чтобы штрихи, наносимые петлей, располагались как можно ближе друг к другу, так как это удлиняет общую линию посева и дает возможность получить изолированные колонии микроорганизмов. Для равномерного распределения засеваемого материала по поверхности плотной питательной среды можно пользоваться вместо петли тампоном или шпателем. При обилии в засеваемом материале микробов они растут в виде пленки, покрывающей всю поверхность питательной среды. Такой характер микробного роста получил название сплошного, или газонного. Посев газоном производят, когда нужно получить большие количества микробной культуры одного вида.

4. Из материала, подлежащего посеву в толщу плотной питательной среды, готовят взвесь в стерильной водопроводной воде или в изотоническом растворе. Набирают 0,1—1 мл взвеси в пипетку (в зависимости от степени предполагаемого микробного загрязнения) и выливают в пустую стерильную чашку Петри. Вслед за этим чашку заливают 15—20 мл мясо-пептонного агара, расплавленного и остуженного до температуры 40—45°C (при такой температуре пробирка со средой, приложенная к щеке, не должна вызывать ощущения ожога). Для равномерного распределения исследуемого материала в питательной среде закрытую чашку с содержимым слегка врашают по поверхности стола. Посев уколом в столбик питательной среды производят в пробирку со средой, застывшей в виде столбика. Пробирку берут в левую руку, как обычно, и в центре столбика до дна пробирки вкалывают петлю с находящимся на ней материалом. Для анаэробов необходимы свежеприготовленные среды, и посев штрихом следует проводить в течение первых 4 ч после их автоклавирования, чтобы избежать накопления растворенного кислорода

**Культивирование микроорганизмов.** Пробирки с посевами аэробных микроорганизмов помещают в термостат и устанавливают оптимальную для данного микроорганизма температуру (для большинства – 37 градусов).

Для анаэробных микроорганизмов создают анаэробные условия физическим, химическим и ли биологическим способом. Самый распространенный – физический способ (при помощи анаэростата)

Анаэростат — прибор для выращивания микробов в анаэробных условиях. Представляет собой толстостенный металлический цилиндр с герметически привинчивающейся крышкой, на которой имеются вакуумметр и два крана для присоединения к вакуум-насосу.

### **Задания для самостоятельной работы**

Осуществить посев на МПБ и МПА (скошенный в пробирках и в чашках Петри).

Поместить посевы анаэробной культуры в анаэростат и откачать воздух.

Ответить на контрольные вопросы.

### **Контрольные вопросы**

При помощи чего осуществляют посев на питательные среды?

Какова техника посева культур на жидкие и плотные питательные среды?

Какие методы выделения чистой культуры наиболее часто используются?

Способы культивирования аэробов и анаэробов?

## **2.9 Лабораторная работа № 9 (2 часа).**

**Тема: «Методы выделения чистых культур»**

**2.9.1 Цель работы:** познакомить студентов с методами получения чистых культур Микроорганизмов.

**2.9.2 Задачи работы:**

1. Познакомить студентов с методами получения чистых культур, основанных на механическом разобщении микробов.
2. Познакомить студентов с методами получения чистых культур, основанных на биологических свойствах микроорганизмов.

**2.9.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Бульонные и агаровые культуры *E.coli*, *S.aureus*, *B. Subtilis*.
2. Стерильные МПА и МПБ в пробирках и чашках.
3. Стеклянные шпатели, пастеровские пипетки, бактериологические петли, спиртовые горелки.
4. Термостат суховоздушный, анаэростат, эксикатор, газпак.

### **2.9.4 Описание работы**

В микробиологической практике зачастую имеют дело со смешанными культурами, а для работы необходимы чистые. Существует много методов выделения чистых культур, одни из которых основаны на механическом разобщении клеток. Эти методы наиболее часто применяют при выделении чистых культур микроорганизмов.

*Метод Пастера* (метод разведений): из исследуемого материала готовят ряд последовательных, чаще десятикратных разведений на стерильной жидкой питательной среде в пробирках или колбах (10-1...10-10). Предполагают, что количество микробных клеток в каждом последующем разведении будет меньше, чем в предыдущем, и в какой-то

из пробирок останется только одна микробная клетка, которая и даст/начало чистой культуре Микроорганизма. Однако для успешного применения этого метода необходимо, чтобы искомый микроорганизм в материале количественно преобладал над сопутствующими видами.

*Метод Коха* (метод заливок): исследуемый материал в небольшом количестве вносят в пробирку с расплавленным и охлажденным до 45...50 °С МПА, перемешивают, затем каплю питательной среды переносят во вторую пробирку с расплавленным МПА и т. д. Количество разведений зависит от предполагаемой численности микроорганизмов в исследуемом материале. Затем содержимое каждой пробирки выливают в стерильные чашки Петри, после затвердения среды посевы помещают в термостат. Фиксированные в плотной среде микробные клетки при размножении формируют колонии, из которых можно отобрать (пересеять) чистую культуру микроорганизма.

*Метод Дригальского*: берут три-пять чашек Петри с плотной питательной средой. В одну из чашек вносят посевной материал и распределяют его шпателем по поверхности питательной среды. Не обжигая шпатель, оставшийся на нем материал последовательно растирают на поверхности среды во второй, третьей и остальных чашках. В последних чашках Петри после инкубирования в термостате обычно наблюдают формирование изолированных колоний бактерий.

Но более экономичен следующий способ получения изолированных колоний. Бактериологической петлей с посевным материалом несколько раз делают параллельные штрихи в одном секторе чашки Петри с питательным агаром. Петлю прожигают в пламени горелки, дают остывть и часть материала из первого сектора (A) аналогичным образом распределяют во втором секторе (B), затем в третьем (C) и четвертом (D) секторах. Даже при рассеве бактериальной массы из колоний в секторе D при таком способе получают рост изолированных колоний.

Методы, основанные на биологических особенностях микроорганизмов. Направлены на подавление роста сопутствующей микрофлоры.

*Прогревание*: при выделении чистой культуры спорообразующего вида бактерий исследуемый материал прогревают при 80 °С 20 мин или кратковременно кипятят. Вегетативные клетки сопутствующей микрофлоры в этих условиях погибают, а споры искомого микроорганизма сохраняют жизнеспособность и прорастают после посева на питательные среды.

*Использование селективных питательных сред*, которые содержат вещества, подавляющие рост сопутствующей микрофлоры (антибиотики, красители и т. д.), — частый прием при исследовании контаминированного материала. Однако необходимо учитывать, что селективные факторы часто находятся не в бактерицидных, а в бактериостатических концентрациях, поэтому клетки сопутствующих микроорганизмов не растут, но остаются жизнеспособными на поверхности питательной среды и при отвивке колоний исследуемой культуры на обычные среды могут быть причиной получения смешанной культуры.

*Биопроба* — заражение чувствительных лабораторных животных — метод, с помощью которого не только выделяют возбудитель из патологического материала, но также изучают вирулентность чистой культуры. Организм животного с его защитными факторами служит биологическим «фильтром», который уничтожает сопутствующую непатогенную микрофлору, но не способен подавить размножение вирулентных бактерий, что позволяет достаточно легко выделить возбудитель в чистой культуре из тканей погибшего или убитого с диагностической целью животного.

При выделении чистых культур некоторых видов бактерий используют их другие биологические особенности. Например, способность микроорганизма расти при низких (листерии) или высоких (термофильные бактерии) температурах, которые лежат за пределами температурных диапазонов сопутствующих видов бактерий. Для выделения культуры *P. vulgaris* используют способность данного вида давать ползучий рост (роение)

на поверхности плотной питательной среды. С этой целью материал, содержащий *P. vulgaris*, засевают в конденсационную воду на дне пробирки со скошенным МПА, не касаясь поверхности среды. Сопутствующая микрофлора растет в нижней части питательной среды, а протей в виде прозрачной пленки распространяется вверх. Для выделения *C. tetani* материал засевают точечно на плотную питательную среду в чашках Петри и после выращивания отвивают культуру с периферии ползучего роста.

#### **Задание для самостоятельной работы**

1. Провести посев смешанной бульонной культуры на МПА в чашках Петри по методу Дригальского.
2. Выделить из смешанной культуры спорообразующие путем прогрева ее на водяной бане с последующим посевом на МПА.
3. Ответить на контрольные вопросы.

#### **Контрольные вопросы**

1. С какой целью получают чистые культуры?
2. В чем суть метода получения чистых культур по Дригальскому?
3. Как выделяют патогенные микроорганизмы из смешанной культуры?
4. Как выделяют споровые формы из смешанной культуры?

### **2.10 Лабораторная работа № 10 (2 часа)**

#### **Тема: «Культуральные свойства микроорганизмов**

**2.10.1 Цель работы:** «Познакомить студентов с культуральными свойствами микроорганизмов»

#### **2.10.2 Задачи работы:**

1. Познакомить студентов с характером роста микроорганизмов на жидких питательных средах.
2. Познакомить студентов с характером роста микроорганизмов на плотных питательных средах.

#### **2.10.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Бульонные и агаровые культуры *E.coli*, *S.aureus*, *B. subtilis*, культуры плесневых грибов, выращенных в чашках и пробирках с жидкой средой.
2. Лупы, спиртовки, бактериологические петли.
3. Табличный материал.

#### **2.10.4 Описание работы**

*Культуральные свойства* микроорганизмов определяются характером роста их на питательных средах. Будучи постоянными для каждого вида микроба, они являются важным диагностическим признаком.

*Рост микробов на плотной питательной среде.* Для изучения свойств колоний микробы культивируют на плотных питательных средах в чашках Петри. При посеве материала стараются получить изолированный рост колоний. Чашки с посевом просматривают сначала невооруженным глазом или через лупу, затем помещают их на столик микроскопа вверх дном и просматривают колонии в проходящем свете с объективом малого увеличения и с суженной диафрагмой. Колонии характеризуют: по величине, форме, контуру края, рельефу, поверхности, цвету, структуре и консистенции.

*Величина колонии* определяется ее диаметром. В зависимости от диаметра различают колонии точечные (диаметр меньше 1 мм), мелкие (диаметр 1—2 мм), средние (диаметр 2—4 мм) и крупные (диаметр 4—6 мм и более).

*Форма колонии* бывает: правильная — круглая, неправильная — амебовидная, ризоидная — корневидная, напоминающая переплетающиеся корни деревьев. *Характер контура* края определяют при рассмотрении колонии под лупой или микроскопом с малым увеличением. Различают:

1. ровный край в виде четко выраженной линии;
2. волнистый край;
3. зубчатый край;
4. бахромчатый край, имеющий нежные ворсинки;
5. локонообразный т.д.

Рельеф колонии характеризуется приподнятостью ее над поверхностью питательной среды и контуром формы в вертикальном разрезе. Определяется рельеф колонии невооруженным глазом или с лупой при рассматривании сверху и сбоку. Различают: каплеобразные и куполообразные колонии правильной круглой формы с различно выраженной степенью выпуклости; колонии плоско-выпуклые с плоским верхом, пологими или круто обрывающимися краями; имеют в вертикальном разрезе форму трапеции; колонии конусообразные, имеющие в вертикальном разрезе форму треугольника: колонии с приподнятой в виде соска серединой и валиком по периферии; колонии с вдавленным центром; колонии плоские, стелющиеся по поверхности среды.

*Поверхность колонии* изучают с помощью лупы или под микроскопом при малом увеличении. Поверхность колоний бывает матовая или блестящая с глянцем, сухая или влажная, гладкая или шероховатая. Гладкие колонии обозначают буквой S (smooth), шероховатые — буквой R (rough), что означает соответственно «гладкий» и «шероховатый». Механизм формирования гладких и шероховатых форм колоний обусловлен различием процессов клеточного деления. Микробные клетки в колониях S-форм располагаются, соприкасаясь своими боковыми поверхностями, клетки R-форм, сохраняя при делении цитоплазматические мостики, образуют цепочки, которые, накладываясь друг на друга, обуславливают шероховатую поверхность и неровный край колонии. Переход S-форм в R-формы наблюдается при диссоциации. Явление диссоциации у патогенных микробов наблюдается под действием антибиотико- и химиотерапии, факторов специфического иммунитета, формирующихся в течение инфекционного процесса, а также факторов внешней среды. Среди шероховатых форм колоний различают: складчатые, гирозные, по виду напоминающие исчерченную извилинами поверхность мозга; бородавчатые, концентрически или радиально исчерченные; шагреневые, т. е. мелкозернистые.

*Цвет колонии* определяется пигментом, который продуцирует культура микробов. Преобладающее большинство патогенных бактерий пигмента не образуют, вследствие чего колонии их бесцветны или молочно-мутного цвета, похожи на опал. В проходящем свете такие колонии в большей или меньшей степени прозрачны. Пигментообразующие виды микробов дают колонии различных цветов: кремовые, желтые, золотисто-оранжевые, синие, красные, сиреневые, черные и др.

*Структура колоний* определяется в проходящем свете при слабом увеличении микроскопа, суженой диафрагме или при несколько опущенном конденсоре. У пигментированных колоний и колоний, не пропускающих света, она не определяется.

По характеру структуры различают следующие виды колоний:

гиалиновые — бесцветные, прозрачные, без видимой определенной структуры; зернистые, которые в зависимости от величины зерен разделяются на мелко- и грубозернистые; нитевидные или волокнистые, характеризующиеся наличием длинных, густо переплетающихся нитей в толще колонии. Колонии бывают однородные и неоднородные. Строение первых одинаково во всех частях, у вторых центральная часть отличается от периферической или отдельные сектора имеют строение, неодинаковое с остальной массой.

*Консистенцию колонии*, определяющую ее физическое состояние, исследуют посредством прикосновения или взятия из нее части материала бактериальной петлей. По характеру консистенции колонии бывают: пастообразные, легко снимающиеся и размывающиеся по поверхности питательной среды наподобие сливочного масла; вязкие или слизистые, прилипающие и тянувшиеся за петлей; волокнистые или кожистые, плотные, снимающиеся с поверхности питательной среды в виде упругой пленки, соответствующей величине и форме колонии; хрупкие, сухие, рассыпающиеся при прикосновении петли.

### **Особенности микробного роста на жидких питательных средах**

На жидких питательных средах характер роста микробов менее разнообразен, чем на плотных питательных средах. Однако и здесь выявлены следующие формы роста бактерий. Рост бактерий с равномерным помутнением среды, цвет которой остается неизмененным или изменяется в соответствии с цветом водорастворимого пигmenta, образующегося в культуре микробы. Такой рост характерен для многих патогенных бактерий, относящихся к группе факультативных анаэробов.

Придонный рост бактерий характеризуется образованием *осадка* на дне пробирки с жидкой питательной средой. *Осадок* может быть скучным или обильным, крошковидным, гомогенным, волокнистым или в виде крупных рыхлых хлопьев, по консистенции вязким, слизистым, хрупким или пастообразным. Питательная среда над осадком может быть прозрачной или мутной. Цвет осадка и среды, находящейся над ним, определяется наличием пигmenta, продуцируемого культурой микробов. Если культура пигmenta не образует, цвет среды не изменяется, а осадок приобретает, как правило, серовато-белый или желтоватый цвет. Придонный рост специфичен для бактерий с анаэробным типом дыхания.

*Пристеночный рост* бактерий выражается в том, что питательная среда, находящаяся в пробирке, остается совершенно прозрачной. Бактерии растут, образуя более или менее крупные рыхлые хлопья или, наоборот, компактные зерна, прикрепленные к внутренней поверхности стенок сосуда, с которых в зависимости от вида бактерий снимаются легко или с трудом.

Поверхностный рост бактерий характеризуется появлением на поверхности жидкой питательной среды *пленки*, внешний вид и характер которой могут быть различны: пленка тонкая, нежная, бесцветная, имеет вид едва заметного налета, исчезающего при встряхивании пробирки и взбалтывании среды; пленка влажная, толстая, хорошо видимая простым глазом, вязкой, слизистой консистенции, прилипает к петле и тянется за ней; пленка плотная, сухая, внешним видом напоминает кусочки кожи и при попытке взятия из нее материала снимается целиком в виде круглого диска, соответствующего диаметру пробирки: пленка плотная, сухая, со сморщенной, а иногда бородавчатой поверхностью, краями прикрепленная к стенкам сосуда; при взбалтывании жидкости или прикосновении бактериальной петли разбивается на кусочки, погружающиеся в глубь жидкости.

Цвет пленки, как и питательной среды, зависит от пигmenta, вырабатываемого растущей культурой микробов. Рост бактерий в виде поверхностной пленки характерен для микробов-аэрофилов.

### **Задания для самостоятельной работы**

1. Описать рост культуры в МПБ, заполнить таблицу.
2. Описать колонии, выросшие на МПА и заполнить таблицу.
3. Ответить на контрольные вопросы.

### **Протокол исследования №1**

Бульонная культура микроорганизма	Вид роста	Параметры описания
-----------------------------------	-----------	--------------------

--	--	--

## Протокол исследования №2

№	Форма	Диаметр, мм	Цвет	Поверхность	Профиль	Край	Структура	Консистенция	Запах
---	-------	-------------	------	-------------	---------	------	-----------	--------------	-------

### **Контрольные вопросы**

1. Какие культуральные признаки учитывают при идентификации бактерий?
2. По каким параметрам идет описание роста микроорганизма на плотной питательной среде?
3. По каким параметрам идет описание роста микроорганизма на жидкой питательной среде?

### **2.11 Лабораторная работа № 11 (2 часа)**

**Тема: «Биохимические свойства микроорганизмов»**

**2.12.1 Цель работы:** «Познакомить студентов с биохимическими свойствами микроорганизмов»

**2.12.2 Задачи работы:**

1. Познакомить студентов с определением сахаролитических свойств микроорганизмов.
2. Познакомить студентов с определением протеолитических свойств микроорганизмов.
3. Познакомить студентов с определением редуцирующих свойств микроорганизмов.

**2.12.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Засеянные среды Гиса (глюкоза, лактоза, сахароза и т.д.) с признаками кислото- и газообразования.
2. Культура E.coli на МПБ с индикаторной бумажкой на индол, культура B.subtilis в молоке, культура S.aureus, 3,5-ный раствор перекиси водорода.
3. Тест-системы для быстрой идентификации бактерий

**2.12.4 Описание работы**

В жизнедеятельности микробов ферменты играют большую роль. Они являются обязательными участниками разнообразных биохимических реакций, лежащих в основе функций питания, дыхания, размножения. По характеру связи с цитоплазменными структурами и по месту проявления своего действия ферменты делятся на внутри- и внеклеточные. Каждый вид микроорганизмов продуцирует постоянный для него набор ферментов, одни из которых расщепляют в разной степени белки и углеводы, а другие вызывают окисление и восстановление различных субстратов.

Стабильность ферментативных систем бактерий позволяет использовать биохимические свойства бактерий в сочетании с их морфологическими, культуральными и другими постоянными признаками для определения видов и типов бактерий.

Для обнаружения ферментов исследуемую культуру микробов засевают на специальные дифференциально-диагностические питательные среды.

*Сахаролитические свойства микроорганизмов.* Свойство расщеплять углеводы и высокоатомные спирты, которые принято объединять в одну группу, именуемую сахарами, присущее многим патогенным микробам. Под действием сахаролитических

ферментов бактерий сахара расщепляются на альдегиды и кислоты. Конечными продуктами их расщепления являются газообразные вещества:  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2$ .

Характерно, что различные виды и даже разновидности микробов относятся по-разному к одним и тем же сахарам. Так, например, одни бактерии, ферментируя лактозу, остаются нейтральными в отношении глюкозы, другие, наоборот, сбраживают глюкозу, а третьи, наиболее активные, вызывают расщепление и глюкозы, и лактозы. Для обнаружения сахаролитических ферментов исследуемую культуру бактерий засевают в питательные среды Гисса, называемые также «пестрым» рядом. «Пестрый» ряд Гисса содержит обычно 5 пробирок: с глюкозой, лактозой, маннитом, мальтозой и сахарозой. При некоторых исследованиях для более углубленного изучения биохимических свойств выделенного микробы ряд Гисса дополняют дульцитом, сорбитом, ксилозой, арабинозой и некоторыми другими сахарами. Другими словами, есть «большой» и «малый» «пестрый ряд». Название «пестрый» ряд обусловлено тем, что под действием ферментов микробы одни углеводы остаются неизменными и, следовательно, цвет питательной среды не меняется, в то время как другие сахара расщепляются, образуя кислые продукты распада, которые изменяют цвет индикатора и, соответственно, цвет питательной среды.

Среды Гисса бывают жидкими и полужидкими (с добавлением 0,2—0,5% агар-агара). В пробирки с жидкими средами Гисса для обнаружения газов, являющихся конечными продуктами распада сахаров, опускают «поплавок» — трубочку диаметром 0,5—0,7 см, запаянную с одного конца. «Поплавок» помещают запаянным концом вверху; при стерилизации он полностью заполняется питательной средой. При образовании в среде газообразных продуктов они вытесняют часть жидкости, находящейся в «поплавке», вследствие чего у запаянного конца его собирается воздушный пузырек. В полужидких средах Гисса газообразование определяют по наличию мелких пузырьков газа в толще среды и стойкой пены на ее поверхности. Таким образом, при изучении сахаролитических ферментов, выделяемых микробами, учитывают не только явления расщепления тех или иных сахаров по кислотообразованию, но и глубину ферментативного процесса по наличию в питательной среде конечных газообразных продуктов. Пробирки с набором сред Гисса ставят в штатив в один ряд. На каждой пробирке надписывают название сахара, содержащегося в среде. На первой пробирке каждого ряда, кроме названия сахара, указывают номер или вид исследуемой микробной культуры. Культуру берут на кончик петли в очень небольшом количестве и засевают по общепринятой методике.

*Протеолитические свойства микроорганизмов.* Некоторые виды микроорганизмов продуцируют и выделяют во внешнюю среду протеолитические ферменты — протеазы, катализирующие расщепление белков. В результате расщепления молекулы белка образуются высокомолекулярные промежуточные продукты распада — пептоны, альбумозы и полипептиды. Под действием других протеолитических ферментов пептоны в свою очередь расщепляются на полипептиды (соединения двух или нескольких аминокислот) и отдельные аминокислоты. Для выявления протеолитических ферментов исследуемую культуру микробы засевают в питательную среду, содержащую тот или иной белок. Чаще всего для этой цели применяют желатин, реже — свернутую лошадиную сыворотку, коагулированный яичный белок, молоко или кусочки вареного мяса. Протеолитическая активность одного и того же микробы при определении ее на разных питательных средах будет проявляться неодинаково, что обусловлено специфичностью ферментов. Поэтому для разных видов микробов рекомендуют питательные среды различного состава.

#### *Определение протеолитической активности микробов.*

*На желатине.* Мясо-пептонный желатин разливают в пробирки столбиком по 5—6 мл. Посев производят уколом, погружая петлю с исследуемой культурой в глубь питательной среды до дна пробирки. Микроны, способные расти при низкой температуре, оставляют стоять в комнате при 20—22°C. Остальные посевы инкубируют в термостате

при 37°C. Вместе с опытными пробирками в термостат ставят одну или две пробирки с незасеянным желатином для контроля. При температуре 37°C желатин плавится, поэтому после инкубации пробирки, вынутые из термостата, опускают в холодную воду или ставят в холодильник. После застудневания желатина в контрольных пробирках приступают к просмотру роста и учету изменений в питательной среде опытных пробирок. Там, где под действием фермента желатиназы произошло расщепление белков желатина, отмечается разжижение питательной среды. Пробирки, в которых после суточного инкубирования среда остается без изменения, оставляют в термостате. Наблюдение за изменением среды ведется в течение 20 суток. В протоколе исследования обязательно отмечают день появления признаков разжижения среды, степень и характер ее разжижения.

*На молочном агаре Эйкмана.* Молочный агар Эйкмана, разлитый и остуженный в чашках Петри, засевают исследуемой культурой микробов. Посев делают петлей или шпателем так, чтобы получить изолированные колонии. Через 24—48 ч инкубации в термостате культуры, продуцирующие протеолитический фермент, обусловливают пептонизацию молочного белка — казеина, в результате чего вокруг таких колоний образуются прозрачные зоны, четко выделяющиеся на общем молочно-мутном фоне среды.

*На свернутой кровяной сыворотке.* Культуру исследуемых аэробных микробов засевают на чашки, анаэробных — уколом в столбик свернутой лошадиной сыворотки, инкубируют в термостате при 37°C. Штаммы, продуцирующие протеолитические ферменты, разжижая питательную среду, образуют углубления вокруг колоний или на поверхности столбика среды.

*В бульоне с куриным яичным белком.* В пробирку с мясо-пептонным бульоном или бульоном Хоттингера, содержащим кусочек свернутого куриного белка, вносят одну петлю исследуемой культуры микробы. Посевы просматривают ежедневно в течение 5 дней. Протеолитически активные культуры микробов расщепляют коагулированный яичный белок; кусочки белка, содержащиеся в среде, заметно уменьшаются в размере, превращаясь в крошкообразную массу, или полностью растворяются.

Аналогичным образом проявляются протеолитические свойства микробов в средах с кусочком вареного мяса. Некоторые виды патогенных микробов с выраженной протеолитической активностью обладают способностью расщеплять белок и пептон до продуктов глубокого распада: индола, сероводорода, мочевины и аммиака.

При определении видов и дифференциации разновидностей патогенных микробов наибольшее значение имеет выявление двух первых продуктов: индола и сероводорода.

*Определение индола в культуре микроорганизмов.* Индол образуется при расщеплении сложной гетероциклической аминокислоты — триптофана. Для выявления индолообразования петлю исследуемой культуры засевают в среду Строгова или другие среды, рекомендуемые для обнаружения индола. Тотчас после посева в пробирку вносят полоску индикаторной бумаги, пропитанную раствором щавелевой кислоты, так, чтобы индикаторная бумага не касалась питательной среды. Для этого верхнюю треть бумажной полоски прижимают пробкой к стенке пробирки. Посевы инкубируют 24—48 ч при температуре 37°C. Образование индола определяют по окрашиванию нижнего конца индикаторной бумаги в бледно-розовый цвет, хорошо заметный в проходящем свете.

*Определение сероводорода.* Сероводород является конечным продуктом расщепления аминокислот: цистина, цистеина и метионина, содержащих серу. Петлю исследуемой культуры микробов засевают в пробирку с мясо-пептонным бульоном или бульоном Хоттингера. Тотчас после посева в пробирку вносят пропитанную ацетатом свинца полоску индикаторной бумаги на определение сероводорода. В положительных случаях образующийся в культуре сероводород вступает в соединение с бесцветным ацетатом свинца и превращается в сульфид свинца, который придает индикаторной бумаге черно-буровое окрашивание.

Окончательный учет результатов на образование индола и сероводорода проводят на 7—10-й день после посева, так как процесс ферментативного расщепления белка и образования конечных продуктов распада происходит иногда в течение длительного времени.

*Окислительно-восстановительные свойства микроорганизмов.* В культуре микробов могут быть обнаружены окислительно-восстановительные ферменты, связанные главным образом с дыхательной функцией микроорганизма. Как известно, процесс окисления субстрата может происходить посредством присоединения к нему кислорода с участием ферментов оксидаз или в результате отщепления от него водорода с участием ферментов дегидрогеназ. Для этого типа реакции характерно то, что окисление какого-либо одного вещества всегда сопровождается восстановлением (редукцией) другого органического вещества. Первое вещество, от которого отщепляется водород, называют донатором, а то вещество, к которому он присоединяется, — акцептором. Акцептором водорода чаще всего является кислород воздуха, однако им могут быть также многие органические соединения, способные легко окисляться и восстанавливаться. С целью выявления ферментов дегидрогеназ и определения их активности в практике микробиологических исследований предложен метод, основанный на введении в питательную среду органической краски, выполняющей роль акцептора водорода. В результате присоединения водорода краситель восстанавливается, превращаясь в бесцветное соединение, называемое лейкобазой. При обильном доступе кислорода оно может вновь окислиться и приобрести прежний цвет.

В качестве акцептора водорода используют метиленовый синий, лакмусовую настойку, малахитовый зеленый, индигокармин, нейтральный красный и др.

Для выявления редуцирующих свойств микроорганизмов указанные красители добавляют к обычным питательным средам: мясо-пептонному бульону, мясо-пептонному агару, молоку. Один и тот же вид микробы ведет себя неодинаково по отношению к краскам разного состава. Это свойство микробы использовано в микробиологической практике в качестве дифференциального признака. Бактерии брюшного тифа редуцируют метиленовый синий, но не редуцируют лакмуса и не изменяют нейтрального красного в противоположность кишечной палочке, которая остается нейтральной в отношении метиленового синего, но восстанавливает лакмус и нейтральный красный.

*Определение редуцирующей способности:* 1) в 5 мл среды — молока с метиленовым синим — засевают петлю исследуемой культуры с плотной питательной среды или 0,1 мл 18-часовой бульонной культуры и после 24 ч инкубации учитывают результаты роста. При положительной реакции на редукцию метиленового синего среда из голубой становится кремового цвета, а при слабоположительной — приобретает зеленоватое окрашивание; 2) пробирки с лакмусовым молоком, средой Минкевича засевают так же, как молоко с метиленовым синим, суточной культурой с плотной или жидкой питательной среды. Посевы инкубируют в термостате в течение 10 дней, ежедневно наблюдая за изменением цвета среды. Редукция лакмуса проявляется полным обесцвечиванием молока, имеющего розовато-сиреневый цвет до посева.

*Определение фермента каталазы.* Некоторые виды микроорганизмов, принадлежащие к группе аэробов, в процессе дыхания образуют перекись водорода, являющуюся клеточным ядом. Количество перекиси водорода в культуре никогда не достигает высоких концентраций, так как по мере образования перекись расщепляется на воду и молекулярный кислород при участии фермента каталазы. На поверхность микробной культуры, выращенной на плотной питательной среде в чашке Петри, наносят 1—2 мл 1% раствора перекиси водорода так, чтобы она покрывала поверхность культуры тонким слоем. Появление пузырьков газа в слое нанесенной жидкости свидетельствует об образовании кислорода в результате расщепления перекиси водорода под действием

катализы. Подобный результат в протоколе опыта отмечается знаком + как положительный результат реакции на каталазу.

### **Задания для самостоятельной работы**

1. Ознакомиться с тестами, характеризующими ферментативные свойства бактерий.
2. Используя готовые планшеты, идентифицировать микроорганизмы при помощи дифференциальных таблиц.
3. Определить каталазную активность *S.aureus*.
4. Заполнить протокол исследования.
5. Ответить на контрольные вопросы.

### **Протокол исследования**

Идентифицируемая культура	Идентификация до вида

### **Контрольные вопросы**

1. Какое таксономическое значение имеет определение набора ферментов у микроорганизмов?
2. Как определяются сахаролитические свойства с помощью сред Гисса?
3. Как определяется индол?
4. Как определяется сероводород?
5. Как определяется каталаза?

## **2.12 Лабораторная работа № 12 (2 часа)**

**Тема:** «Антибиотики, классификация, принципы рациональной антибиотикотерапии. Определение антибиотикочувствительности у микроорганизмов»

**2.12.1 Цель работы:** познакомить студентов с классификациями антибиотиков, принципами рациональной антибиотикотерапии, методами определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

### **2.12.2 Задачи работы:**

1. Познакомить студентов с классификациями антибиотиков, принципами рациональной антибиотикотерапии, механизмами приобретения лекарственной устойчивости, побочными действиями антибиотиков.
2. Познакомить студентов с определением антибиотикочувствительности у Микроорганизмов.

### **2.12.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

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

### **2.12.4 Описание работы**

**Антибиотики.** Эти вещества, образуемые бактериями, грибами, растениями, животными тканями, способны убивать микроорганизмы или подавлять их рост. Абсолютное большинство известных антибиотиков получают из актиномицетов. Бактерии

синтезируют такие антибиотики, как полимиксины, грамицидины, бацитрацин, гризин. Из грибов выделены пенициллины, цефалоспорины, фумагиллин, гризофульвин, из животных тканей — эритрин, экмолин, из высших растений — аллицин и др. Часть антибиотиков получают химическим синтезом (левомицетин), а большинство — биосинтезом. Активность препаратов определяют бактериологическими или физико-химическими методами. Биологическую активность антибиотиков выражают в условных единицах действия - ЕД. За 1 ЕД принимают специфическую активность, содержащуюся в 1 мкг чистого препарата. Активность товарных антибиотиков чаще всего выражают в мкг активного вещества, содержащегося в 1 мг препарата.

Успех лечения инфекционных заболеваний человека и животных зависит от выбора эффективного лекарственного средства с учетом чувствительности к нему возбудителя болезни. Материал для лабораторного исследования следует брать до лечения антимикробными препаратами. Чувствительность микроорганизма к антибиотикам определяют с чистой культурой возбудителя.

Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. К ним относят метод диффузии в агар, метод серийных разведений (на жидкой и плотной питательных средах) и ускоренные методы.

*Метод диффузии в агар (метод бумажных дисков).* Это наиболее простой в исполнении метод. В качестве питательной среды применяют МПА, агар на переваре Хоттингера. Диски с антибиотиками (диаметр 5...6 мм) готовят из специальных сортов фильтровальной бумаги. Каждый диск содержит определенное количество антибиотика, которое указано на этикетке флакона. Во флакон насыпают силикагель, который впитывает влагу и служит индикатором: при переувлажнении меняет окраску с синей на розовую. При изменении окраски силикагеля во флаконе диски для использования непригодны. Флаконы с дисками хранят при температуре 4...20 °С. Расплавленную питательную среду разливают в чашки Петри по 20 мл (толщина слоя 4...5 мм). Перед посевом чашки со средой досушивают в термостате. Для посева используют суточную бульонную культуру или смывы суточной агаровой культуры. 1 мл микробной суспензии в физиологическом растворе (концентрация клеток 10<sup>9</sup>/мл) наносят на агар и покачиванием чашки распределяют по поверхности питательной среды. Избыток жидкости удаляют стерильной пастеровской пипеткой. Засеянные чашки Петри подсушивают при комнатной температуре 30...40 мин, а затем на поверхность среды стерильным пинцетом накладывают, плотно прижимая, диски с разными антибиотиками на расстоянии 2 см друг от друга и от края чашки. Чашки с дисками выдерживают в термостате при 37 °С 18 ч в положении вверх дном. Антибиотик из диска дифундирует в агар, вызывая гибель чувствительных бактерий, формируя таким образом вокруг диска зону отсутствия роста. Ближе к диску концентрация антибиотика в агаре выше, по мере удаления от диска концентрация снижается. Следовательно, чем больше диаметр зоны задержки роста вокруг антибиотика, тем более чувствительна к нему исследуемая культура. Диаметр зоны задержки (отсутствия) роста микроорганизмов измеряют с помощью линейки или миллиметровой бумаги с точностью до 1 мм. Отсутствие зоны задержки роста микроорганизмов вокруг диска указывает на устойчивость исследуемой культуры к данному антибиотику. При зоне задержки роста до 14 мм говорят о малой чувствительности к антибиотику, от 15 до 25 мм - о достаточной чувствительности, свыше 25 мм - о высокой чувствительности.

*Метод серийных разведений.* Методы разведения основаны на использовании двойных последовательных разведений концентраций антибиотика от максимальной к минимальной. При этом антибиотик в различных концентрациях вносят в жидющую питательную среду (бульон) или в агар. Затем бактериальную суспензию определенной плотности, соответствующую стандарту мутности 0,5 по McFarland, помещают в бульон с антибиотиком или на поверхность агара в чашке. После инкубации в течение ночи при температуре 35-37°C проводят учет полученных результатов. Наличие роста

микроорганизма в бульоне (помутнение бульона) или на поверхности агара свидетельствует о том, что данная концентрация антибиотика недостаточна, чтобы подавить его жизнеспособность. По мере увеличения концентрации антибиотика рост микроорганизма ухудшается. Первую наименьшую концентрацию антибиотика (из серии последовательных разведений), где визуально не определяется бактериальный рост принято считать минимальной подавляющей концентрацией (МПК). Измеряется МПК в мг/л или мкг/мл.

#### **Задания для самостоятельной работы**

1. Определить чувствительность культуры стафилококка и кишечной палочки к антибиотикам методом бумажных дисков, заполнить протокол исследования.
2. Ответить на контрольные вопросы.

Протокол исследования

Название микроорганизма	Название антибиотика	Зона задержки роста	Вывод о чувствительности к данному антибиотику

#### **Контрольные вопросы**

1. Что такое антибиотики?
2. Как используют антибиотики в ветеринарии?
3. Какими методами определяют чувствительность микроорганизмов к антибиотикам?
4. Что принимают за минимальную подавляющую концентрацию антибиотика?

### **2.13-15 Лабораторная работа № 13-15 (4 часа)**

**Тема: «Санитарно-микробиологическая оценка воды, почвы, воздуха»**

**2. 13-15.1 Цель работы:** познакомить с основными методами санитарно-микробиологической оценки объектов внешней среды

**2.13-15.2 Задачи работы:**

1. Познакомить студентов с основными этапами санитарно-микробиологического исследования воздуха.
2. Познакомить студентов с основными этапами санитарно-микробиологического исследования воды.
3. Познакомить студентов с основными этапами санитарно-микробиологического исследования почвы.

**2.13-15.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

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

#### **2.16-17.4 Описание работы**

Для оценки санитарно-гигиенического состояния объектов окружающей среды проводят санитарно-бактериологические исследования, цель которых состоит в определении эпизоотологической и эпидемиологической безопасности. Показателем неблагополучия служит выявление патогенных микроорганизмов. Однако прямое их обнаружение связано с большими трудностями, и прежде всего с низкой концентрацией данных микробов, которые в основном не могут размножаться в воде, воздухе и почве. Поэтому в санитарно-микробиологической практике используют косвенные методы, направленные на определение микробной обсемененности объекта и обнаружение в нем так называемых санитарно-показательных бактерий. О бактериальной обсемененности судят *по микробному числу* — общему количеству микроорганизмов, содержащихся в единице объема или массы (1 мл воды, 1 г почвы, 1 м<sup>3</sup> воздуха).

Содержание санитарно-показательных бактерий определяют по двум показателям: титру и индексу. Титром называют минимальный объем или массу, в которых выявляют данные бактерии, индексом — количество санитарно-показательных бактерий, содержащихся в соответствующем количестве среды.

К санитарно-показательным бактериям относят представителей облигатной микрофлоры организма человека и теплокровных животных, для которых среда обитания — кишечник или воздушно-дыхательные пути. Они характеризуются следующими свойствами: 1) постоянно выделяются с калом или капельками слизи из воздушно-дыхательных путей; 2) не имеют других мест обитания; 3) способны сохраняться в окружающей среде то же время, что и патогенные бактерии, паразитирующие в кишечнике или воздушно-дыхательных путях; 4) не способны интенсивно размножаться вне организма хозяина и изменять свои свойства. Перечисленные признаки присущи бактериям, признанным санитарно-показательными для различных объектов окружающей среды. Санитарно-показательные бактерии группы кишечных палочек принадлежат к различным родам семейства энтеробактерий.

Обнаружение кишечной палочки в разных объектах окружающей среды считают наиболее достоверным признаком свежего фекального загрязнения. Наличие в этих же объектах бактерий родов *Citrobacter* и *Enterobacter* указывает на относительно давнее фекальное загрязнение.

Присутствие *C. perfringens*, *C. sporogenes* и других клостридий в почве свидетельствует о ее фекальном загрязнении, причем как свежем, так и давнем, поскольку эти бактерии образуют споры, что позволяет им длительно переживать в окружающей среде (в частности, в почве).

Обнаружение в объектах окружающей среды *Streptococcus faecalis* также свидетельствует об их фекальном загрязнении. Резкое увеличение количества этих бактерий в саморазогревающемся навозе и компостах может свидетельствовать о загрязнении почвы разлагающимися отбросами.

Гемолитические стрептококки, будучи облигатными обитателями носоглотки и зева, выделяются с капельками слизи орально-капельным путем. Сроки выживания гемолитических стрептококков в окружающей среде практически не отличаются от сроков, характерных для большинства других возбудителей воздушно-капельных инфекций. Обнаружение гемолитических стрептококков в воздухе помещений указывает на возможное его загрязнение микроорганизмами, содержащимися в зеве, носоглотке, верхних дыхательных путях и вызывающими инфекции, передаваемые воздушно-капельным путем.

*Staphylococcus aureus* — также факультативный обитатель носоглотки и зева. Его присутствие в воздухе помещений служит показателем орально-капельного загрязнения. Одновременное обнаружение золотистого стафилококка и гемолитических — естественная среда обитания микробов, которые в большом количестве поступают из почвы, воздуха, с

отбросами, стоками. Особенно много микроорганизмов в открытых водоемах и реках. Кроме сапрофитов в воде могут находиться возбудители инфекций животных и человека. При контроле санитарного состояния воды исследованию подлежат: вода централизованного водоснабжения, колодцев, открытых водоемов (реки, озера), плавательных бассейнов, сточные жидкости.

Отбор проб воды. Из открытых водоемов пробы воды отбирают с глубины 10...15 см от поверхности и на расстоянии 10... 15 см от дна. Водопроводную воду набирают в стерильные флаконы объемом 0,5 л с притертой пробкой. Предварительно кран обжигают и спускают воду в течение 10... 15 мин. Хлорированную воду перед исследованием нейтрализуют тиосульфатом натрия из расчета 10 мл на 1 л воды. Бактериологическое исследование проб воды следует проводить в течение двух часов после отбора или шести часов при температуре хранения 1...5°C.

Определение микробного числа воды. Водопроводную воду засевают в количестве 1 мл, воду открытых водоемов — по 1,0; 0,1; 0,01 мл. Все пробы вносят в стерильные чашки Петри, после чего их заливают 10...12 мл расплавленного и охлажденного до 40...45 °C питательного агара, который тщательно перемешивают с водой. Посевы инкубируют при 37 °C в течение 1...2 сут. Воду из открытых водоемов засевают параллельно на две серии чашек, одну из которых инкубируют при 37 °C в течение суток, другую — 2 сут при 20 °C. Затем подсчитывают количество выросших на поверхности и в глубине колоний и вычисляют микробное число воды — количество микроорганизмов в 1 мл.

Определение коли-титра и коли-индекса воды. Минимальное количество воды в мл, в котором обнаруживаются бактерии группы кишечных палочек (БГКП), называют коли-титром воды, количество БГКП, содержащихся в 1 л исследуемой воды, называют коли-индексом воды. Коли-титр и коли-индекс воды определяют титрационным (бродильным) методом или методом мембранных фильтров.

Титрационный метод. В глюкозо-пептонную среду (1%-я пептонная вода, 0,5%-й раствор хлорида натрия, 0,5%-й раствор глюкозы, индикатор Андреа и поплавок) проводят посевы различных объемов воды. Воду открытых водоемов исследуют в объемах 100; 10; 1 и 0,1 мл. Для анализа водопроводной воды делают посевы трех объемов по 100 мл, трех объемов по 10 мл и трех объемов по 1 мл. Посевы инкубируют при 37 °C в течение суток. О брожении судят по образованию пузырьков газа в поплавке. Из забродивших или помутневших проб делают посевы на среду Эндо. Из выросших колоний готовят мазки, окрашивают по Граму и ставят оксидазный тест, с помощью которого дифференцируют бактерии родов *Escherichia*, *Citrobacter* и *Enterobacter* от грамотрицательных бактерий семейства *Pseudomonadaceae* и других оксидазоположительных бактерий, обитающих в воде. С этой целью 2...3 изолированные колонии наносят «штрихом» на фильтровальную бумагу, смоченную диметил-*p*-фенилендиамином. При отрицательном оксидазном teste цвет бумаги не изменяется, при положительном она окрашивается в синий цвет в течение 1 мин. Грамотрицательные палочки, не образующие оксидазу, вновь исследуют в бродильном teste — вносят в полу жидккий питательный агар с 0,5 % глюкозы и инкубируют при 37 °C в течение суток. При положительном результате определяют коли-титр и коли-индекс по статистической таблице.

Метод мембранных фильтров. Определенный объем воды пропускают под давлением через мембранный фильтр № 3, предварительно стерилизованный кипячением в дистиллированной воде. Водопроводную воду и воду артезианских скважин фильтруют в объеме 333 мл. Чистую воду открытых водоемов фильтруют в объеме 100, 10, 1 и 0,1 мл, более загрязненную воду перед фильтрованием разводят стерильной водой. Фильтры накладывают на агар Эндо в чашки Петри и после инкубации при 37 °C в течение суток подсчитывают количество выросших красных колоний. Из двух-трех колоний делают мазки, окрашивают их по Граму и ставят оксидазный тест. Грамотрицательные палочки, не образующие оксидазу, принадлежат к БГКП. По существующим нормативам (ГОСТ

2874—82) питьевую воду считают качественной, если ее коли-индекс не более 3, а микробное число — не более 100.

Общепринятым дополнительным показателем фекального загрязнения воды служит количество *S.faecalis*. Для определения его титра цельную воду и ее 10-кратные разведения засевают в жидкую элективную среду (щелочная полимиксиновая сре́да). После инкубирования при 37 °C в течение двух суток, а затем еще через сутки и двое суток делают высе́вы на плотные элективные среды. Фекальные стрептококки идентифицируют по морфологическим, культуральным и тинкториальным свойствам. Есть данные о корреляции между содержанием в воде фекальных кишечных палочек и фагами бактерий группы кишечных палочек. Поэтому определение данных фагов служит косвенным показателем возможного присутствия кишечных палочек в исследуемой пробе воды.

**Санитарно-микробиологическое исследование воздуха.** Микрофлора воздуха зависит от микрофлоры почвы и воды. Воздух — неблагоприятная среда для обитания микроорганизмов из-за отсутствия питательных веществ, действия солнечных лучей, высушивания. Наряду с сапрофитами в воздухе могут находиться патогенные бактерии, споры грибов родов *Aspergillus*, *Mucor* и др. Санитарную оценку воздуха осуществляют по двум показателям: 1) определение микробного числа воздуха; 2) определение количества санитарно-показательных бактерий — гемолитических стрептококков и стафилококков.

Количественные микробиологические методы исследования воздуха основаны на принципах осаждения (седиментации), аспирации или фильтрации.

**Седиментационный метод осаждения Коха.** Чашки Петри с МПА оставляют открытыми на 5...10 мин. Для определения санитарно-показательных бактерий берут чашки Петри с кровяным МПА и время экспозиции увеличивают до 40 мин. Чашки выдерживают при 37 °C и комнатной температуре 24 ч и подсчитывают выросшие колонии. Микробное число воздуха (общее количество бактерий в 1 м<sup>3</sup>) определяют по формуле Омелянского  $X = a * 100 * 1000 * 5 / (b * 10 * T)$ , где X - количество микробов в 1 м<sup>3</sup> (1000 л) воздуха; a - количество выросших колоний в чашках; b - площадь чашки; T - время, в течение которого чашка была открыта; 5 - время по правилу Омелянского; 10 - объем воздуха в литрах (правило Омелянского предусматривает, что на поверхности агара в чашке Петри площадью 100 см<sup>3</sup> за 5 мин из воздуха оседает такое количество микробов, которое находится в его 10 л.). Прямое обнаружение патогенных микробов воздуха проводят только при специальных показаниях.

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

**Санитарно-микробиологическое исследование почвы.** Анализ почвы включает в себя определение микробного числа, коли-титра, перфирингенс-титра и титра термофильных бактерий. По эпидемиологическим признакам проводят определение в почве патогенных микроорганизмов: сальмонелл, шигелл, возбудителей столбняка, ботулизма, злокачественного отека, сибирской язвы. Бактериологический анализ почвы

нужен при выборе территории под пастбище, ферму, хозяйственные постройки, детские сады, больницы и др.

Предварительно делают отбор проб почвы. На обследуемой территории площадью до 1000 м<sup>3</sup> выделяют два участка по 25 м<sup>3</sup> (один - вблизи источника загрязнения, другой — в отдалении от него), берут пробы из 5 точек (4 - по углам участка, 1 - в центре) на глубине 10...20 см стерильным совком (из более глубоких мест - с помощью специального бура Некрасова или Френкеля). Пробы почвы по 200...300 г отбирают в широкогорлые стеклянные банки с ватными пробками (можно все взятые с одного участка пробы перемешать и на исследование направить 1 кг). На банки наклеивают этикетки, отправляют с нарочным и сопроводительным письмом. Пробы почвы полагается исследовать сразу же или в течение 6... 18 ч, сохраняя их при температуре не выше 1...5°C.

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

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

Определение коли-титра, перфрингенс-титра и титра термофильных бактерий почвы. Для определения коли-титра почвы различные разведения почвенной взвеси засевают по 1 мл в пробирки со средой Кесслера (на 1л дистиллированной воды — 10 г пептона, 50 мл бычьей желчи — 2,5 г лактозы, 4 мл 1%-го водного раствора генцианвиолета) и инкубируют при 43 °C в течение 48 ч. В дальнейшем исследования проводят по схеме, применяемой при определении коли-титра воды. Наибольшее разведение почвенной суспензии, в котором отмечена ферментация лактозы (газообразование), соответствует коли-титру почвы. Для определения перфрингенс-титра почвы различные разведения почвенной суспензии по 1 мл засевают в пробирки со стерильным обезжиренным молоком или железосульфитной средой Вильсона—Блера, приготовленной ех tempore. Посевы инкубируют при 43 °C в течение 24...48 ч, после чего учитывают результаты по свертыванию молока или по образованию черных колоний *C. perfringens* в агаровом столбике среды Вильсона—Блера. Из колоний делают мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют и вычисляют перфрингенс-титр, который соответствует наибольшему разведению почвы, вызвавшему почернение и разрыв среды Вильсона—Блера в первые 12 ч роста.

Для определения титра термофильных бактерий разведения почвенной суспензии по 1 мл вносят в чашки Петри, заливают расплавленным и охлажденным агаром. Посевы инкубируют в течение суток при 60 °C, а затем подсчитывают количество выросших колоний и пересчитывают на 1 г почвы.

Санитарно-микробиологическую оценку почвы проводят по комплексу показателей, из которых наиболее важный линия степени фекального загрязнения.

### **Задания для самостоятельной работы**

1. Определить общее микробное число воздуха учебных комнат.
2. Провести исследование водопроводной воды с целью установления микробного числа и коли-титра.
3. Определить общее микробное число и перфингенс-титр почвы.
4. Составить протокол исследования.

### **Протокол**

Исследование воздуха		Исследование воды		Исследование почвы	
Общее микробное число	Гемолитические стрептококки, стафилококки	Общее микробное число	Коли-титр	Общее микробное число	Коли-титр, перфингенс-титр

### **Контрольные вопросы**

1. Что такое санитарно-показательные микроорганизмы?
2. Как определяют коли-титр воды?
3. Как определяют микробное число почвы?
4. Как определяют перфингенс-титр почвы?
5. Какие методы применяют для определения микробного числа воздуха?
6. Что такое санитарно-показательные микробы воздуха и как их определяют?

## **2.16 Лабораторная работа № 16 (2 часа)**

**Тема: «Исследование патогенности и вирулентности микроорганизмов»**

**2.16 Цель работы:** познакомить студентов с факторами патогенности микроорганизмов, определением вирулентности микроорганизмов.

### **2.16.2 Задачи работы:**

1. Познакомить студентов с определением факторов патогенности.
2. Познакомить студентов с методикой определения вирулентности патогенных микроорганизмов.

### **2.16.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Чашки с кровяным агаром, засеянные гемолитическими стафилококками.
2. Положительная плазмокоагулазная проба .
3. Положительная лецитовителлазная проба.

### **2.15.4 Описание работы**

Определение вирулентности и токсигенности микроорганизмов. В повседневной диагностической практике обычно ограничиваются установлением факта патогенности микроорганизма; при оценке биопрепараторов необходимы количественные характеристики вирулентности микроорганизма, взятого для заражения животного.

Вирулентность (токсигенность) микробы измеряют в специальных условных единицах: абсолютная летальная доза ( $D_{cl}$  — dosis certae letalis) вызывает гибель 100 % зараженных животных; 50%-я летальная доза ( $LD_{50}$ ) — 50 % зараженных животных; 50%-я инфицирующая доза ( $ID_{50}$ ) вызывает заболевание 50% зараженных животных.  $LD_{50}$  и  $ID_{50}$  - наиболее точные показатели, поскольку отражают чувствительность к возбудителю (токсину) большинства взятых в опыт животных, а  $D_{cl}$  показывает чувствительность наиболее устойчивых особей. Для расчета  $LD_{50}$  исследуемой культуры микроорганизма используют один из приведенных методов. Готовят суспензию бактерий с известным содержанием микробных клеток в единице объема. Затем делают последовательные (2, 5,

10-кратные) разведения суспензии на стерильном физиологическом растворе и равные объемы каждого разведения вводят (подкожно, внутрибрю-шинно и т. д.) чувствительным лабораторным животным. Если определяют летальный эффект, то учитывают количество погибших животных и рассчитывают LD<sub>50</sub>. Поскольку обычно ни одна из доз возбудителя не приводит к гибели строго 50 % зараженных животных, LD<sub>50</sub> определяют статистическими методами.

#### *Выявление ферментов патогенности микроорганизмов*

Заключение о патогенности микроорганизма делают как по результатам биопробы (прямое доказательство), так и по ряду признаков, косвенно свидетельствующих о патогенных свойствах выделенного микробы. Наиболее часто применяют следующие тесты.

**Тест на плазмокоагулазу.** Коагулаза — фермент бактерий (стафилококков), который в сочетании с некоторыми компонентами сыворотки коагулирует плазму. Благодаря коагулазе вокруг стафилококковых поражений образуется фибринозный барьер, облегчающий персистенцию бактерий в тканях, кроме того, отложения фибринна на поверхности бактериальных клеток затрудняют их фагоцитоз.

Петлю бактериальной массы исследуемой культуры, снятой с поверхности агаровой среды, смешивают с 0,5 мл плазмы крови кролика (человека), не разведенной или разведенной стерильным физиологическим раствором в соотношении 1 : 4, инкубируют при 37 °C, результаты учитывают через 4 и 24 ч. Положительная реакция — образование сгустка.

**Тест на гиалуронидазу.** Гиалуронидаза — фермент, расщепляющий гиалуроновую кислоту и, как следствие, деполимеризующий межклеточное вещество. Рассматривают как фактор инвазивности бактерий. Получение гиалуронового субстрата (из пупочных канатиков) — довольно сложная процедура. На практике удобнее использовать тест декапсуляции бактерий. В качестве субстрата в этом случае берут культуры бактерий, в капсулном веществе которых есть гиалуроновая кислота (*P. multocida* серовар A, *S. equi*). На поверхность агара в чашке Петри дробно засевают культуру *P. multocida* или *S. equi*. Затем в виде линии высевают на поверхность среды культуру микроорганизма, у которого выявляют способность к синтезу гиалуронидазы. Чашки с посевами инкубируют при 37 °C 16...24 ч. Если исследуемый микроорганизм выделяет гиалуронидазу, то она диффундирует в толщу питательной среды и разрушает капсулу тест-микробы. При анализе посевов в косопроходящем пучке света колонии *S. equi* (*P. multocida*) вблизи «штриха» исследуемой культуры меньше по размеру, сего-голубого цвета в отличие от флуоресцирующих отдаленных колоний.

**Тест на гемолизин.** Бактериальные гемолизины — обширная группа веществ-мембранотоксинов, которые вызывают нарушение целостности мембранны эритроцитов и их лизис.

Исследуемую культуру уколом или дробно засевают в чашки Петри с 5%-м кровяным агаром, посевы инкубируют при 37 °C 24 ч. Гемолизин, выделяемый растущей культурой бактерий, диффундирует в толщу агара и вызывает лизис эритроцитов, что проявляется в виде светлой (бета-гемолиз) или полупрозрачной (альфа-гемолиз) зоны вокруг колоний. Гемолитическую активность микроорганизма можно также определять его посевом в 1 ...5%-й кровяной бульон, который после культивирования выделяющего гемолизин микробы становится прозрачным за счет лизиса эритроцитов.

**Тест на фибринолизин** (стрептокиназу). Многие гемолитические стрептококки образуют стрептокиназу, которая активирует протеолитический фермент плазмы (плазминоген → плазмин), этот фермент — фибринолизин растворяет коагулированную плазму.

Исследуемую культуру микроорганизма засевают в виде «блочки» на агар с 12% цитрированной плазмы. Посевы инкубируют при 37 °C 23...24 ч. Положительный результат — появление зоны просветления вокруг колонии.

*Тест на лецитиназу.* Лецитиназа расщепляет гидролизом лецитин. Готовят желточный агар: пептон — 20 г, гидрофосфат натрия — 2,5 г, натрий — 1 г, 0,5%-й раствор сульфата магния — 0,1 мл, глюкоза — 1 г, агар — 12,5 г, вода дистиллированная — 500 мл. Устанавливают pH 7,2...7,4, стерилизуют при 121 °C 15 мин, охлаждают до 55 °C, добавляют один стерильный желток на 500 мл среды, компоненты перемешивают и смесь разливают в чашки Петри. Исследуемую культуру засевают дробно на желточный агар, культивируют при 37...38 °C 24...48 ч. Положительный результат — появление зоны помутнения вокруг колоний.

*Тест на ДНК-азу.* Исследуемую культуру бактерий засевают «штрихом» на питательный агар с ДНК и культивируют при 37 °C 24 ч. Затем на поверхность среды с бактериальной культурой наливают 1 н. раствор соляной кислоты. Положительный результат — при гидролизе ДНК вдоль «штриха» культуры видна светлая зона. Питательная среда с ДНК: в расплавленный МПА добавляют 10%-й раствор ДНК до конечной 0,2%-й концентрации, перемешивают компоненты, автоклавируют при 120 °C 15 мин и разливают в чашки Петри.

Тесты на другие ферменты. Как факторы патогенности можно рассматривать ферменты, катализирующие реакции с образованием токсических продуктов, например: уреаза гидролизует мочевину с образованием аммиака; декарбоксилаза декарбоксилирует аминокислоты с образованием аминов и т.д.

*Тест на адгезины.* В адгезии бактерий принимают участие различные компоненты оболочки. Это свойство выявляют по способности исследуемого микроорганизма сорбироваться на различных эукариотических клетках (эритроциты, энteroциты) или других частицах (латекс). Еще один метод обнаружения адгезинов связан с их использованием в качестве антигенов в серологических реакциях. У эшерихий адгезивные свойства часто определяют по их способности агглютинировать эритроциты.

В лунки планшетов вносят по 50 мкл 4%-й суспензии отмытых эритроцитов морской свинки, 1%-й раствор D-маннозы, суспензию исследуемых бактерий с концентрацией клеток 109/мл. Параллельно ставят реакцию в отсутствие маннозы. Результат учитывают через 30...60 мин. Положительная реакция — склеивание и оседание эритроцитов в виде «зонтика». Торможение агглютинации маннозой обозначают как маннозочувствительную ГА (гемагглютинация), отсутствие ингибиции — как маннозорезистентную ГА.

*Биологический метод исследования.* Методы исследования, связанные с заражением животных, называются биологическим или биопробой. Используемые для этой цели животные называются лабораторными или экспериментальными. Наиболее широко используют кроликов, морских свинок, белых мышей, крыс, голубей, цыплят. Экспериментальное заражение лабораторных животных проводится с разной целью: определение патогенности и вирулентности микробов, токсичности и токсигенности их, выделение чистой культуры из патматериала, определение активности и безвредности приготовленных вакцин и т.д.

*Способы заражения лабораторных животных.* В зависимости от цели исследования и предполагаемого возбудителя выбирают восприимчивое лабораторное животное и подбирают способ его заражения. Взвесь микробной культуры или суспензию из зараженных органов осторожно набирают в шприц, после чего конец иглы осторожно закрывают комочком ваты, смоченным 5% раствором хлорамина или спиртом. Повернув шприц иглой вверх, осторожно выпускают из него пузырьки воздуха. Загрязненную вату бросают в банку с дезраствором.

*Внутрикожный способ* применяется редко. Материал вводят тонкой иглой непосредственно в кожу области спины или живота в дозе 0,1-0,2 мл. чаще всего используют для обнаружения некротоксина (у стафилококков, у листерий и др.).

*Подкожный способ* заражения применяется при многих заболеваниях. Кожу животного захватывают пальцами и образовавшуюся складку прокалывают иглой шприца, материал вводят медленно. Затем опускают складку, на иглу накладывают вату,

смоченную дезраствором и быстро извлекают иглу. Наиболее часто подкожно заражают в область спины, крестца и живота. Доза в зависимости от вида микробы.

*Внутримышечный способ* – материал вводят в толщу мускулатуры обычно в области бедра, а птицам в грудную мышцу.

*Внутрибрюшинный способ* применяется часто. Животное фиксируют головой вниз, чтобы внутренние органы опустились к диафрагме. Материал вводят в задней части живота и прокалывают ее под острым углом, затем, повернув шприц под прямым углом, толчком прокалывают брюшную стенку при этом ощущается как бы провал иглы в полость живота.

*Внутривенное заражение* чаще всего проводят для выявления токсинов у микробов (при ботулизме, при энтеротоксемии). Кроликам материал вводят в краевую вену уха. Рукой сдавливают вену ближе у основания уха, вследствие чего вена лучше наполняется. Тонкой иглой прокалывают кожу и вену, иглу вводят по направлению к корню уха. Затем отнимают пальцы, сдавливающие вену, и медленно инъецируют материал. По окончании иглу прижимают ватой, пропитанной дезраствором, и вынимают. Мышам и крысам материал вводят в боковую вену хвоста, курам и голубям в подкрыльцовую вену. Очень редко используют заражение через дыхательные пути, в пищеварительный тракт и в переднюю камеру глаза. Место введения в организма материала во всех случаях необходимо обработать, чтобы не внести в организм микробы, имеющиеся на коже животного. Для этого выстригают шерсть на месте введения, кожу протирают дезраствором. После введения материала кожу вновь протирают дезраствором. Всех зараженных животных отмечают краской, сведения о заражении записывают в журнал. Кроликов помещают в клетки, морских свинок и мышей – в металлические биксы, наклеивают этикетки на которых указывают сведения о заражении.

### **Задания для самостоятельной работы**

1. Ознакомиться с проявлением гемолитической, плазмокоагулазной, гиалуронидазной активности микроорганизмов.

### **Контрольные вопросы**

1. Как определяется LD<sub>50</sub> &
2. Каким методом определяют плазмокоагулазу?
3. Основной фермент патогенности?

## **2.17-18 Лабораторная работа № 17-18 (4 часа)**

**Тема:** «Возбудители бактериальных инфекций, краткая характеристика. Методы лабораторной диагностики инфекционных бактериальных заболеваний животных»

**2. 17-18.1 Цель работы:** дать представление студентам об основных возбудителях бактериальных инфекций (возбудителях: туберкулеза, туберкулеза, сибирской язвы, клостридиозах), методах диагностики инфекционных заболеваний.

### **2.17-18.2 Задачи работы:**

1. Познакомить студентов с основными этапами санитарно-микробиологического исследования воздуха.
2. Познакомить студентов с основными этапами санитарно-микробиологического исследования воды.
3. Познакомить студентов с основными этапами санитарно-микробиологического исследования почвы.

### **2.17-18.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Световые микроскопы бинокулярные XSP-103Р.

2. Готовые микропрепараты с возбудителями бактериальных инфекций.
3. Оборудование для постановки ПЦР.
4. Табличный материал.

#### **2.17-18.4 Описание работы**

Лабораторная диагностика инфекционных заболеваний проводится в трех основных направлениях:

- 1) поиски возбудителя заболевания в материале, взятом у больного (испражнения, моча, мокрота, кровь, гнойное отделяемое и др.);
- 2) обнаружение специфических антител в сыворотке крови — серологическая диагностика;
- 3) выявление повышенной чувствительности организма человека к возбудителям инфекционных заболеваний — аллергический метод.

Для выявления возбудителя инфекционного заболевания и его идентификации (определения вида возбудителя) используют три метода: микроскопический, микробиологический (бактериологический), серологический, генетический и биологический.

*Микроскопический метод* позволяет обнаружить возбудителя непосредственно в материале, взятом у больного. Этот метод имеет решающее значение при диагностике, например, туберкулеза. Особенности морфологии возбудителей играют основную роль в постановке диагноза. Однако микроскопический метод не позволяет поставить диагноз при таких инфекциях, как, например, колибактериоз, сальмонеллез, потому что различить их возбудителей по морфологическим признакам невозможно (все они грамотрицательные палочки). Для того чтобы различить сходные между собой по морфологии микроорганизмы, их надо получить в чистой культуре и идентифицировать, что можно сделать с помощью микробиологического (бактериологического) метода исследования.

*Микробиологический метод* заключается в посеве исследуемого материала на питательные среды, выделении чистой культуры возбудителя и его идентификации. Определение вида и типа возбудителя производят по ряду признаков: морфологии, способности окрашиваться различными красителями (тинкториальные свойства), характеру роста на искусственных питательных средах (культуральные свойства), ферментации углеводов и белков (биохимические свойства), генетический метод (ПЦР). Окончательную принадлежность выделенной культуры к определенному виду (типу) микроорганизмов устанавливают после изучения антигенной структуры, используя различные иммунологические реакции (агглютинации, преципитации, нейтрализации и др.).

Если возбудители инфекционных заболеваний (риккетсии, вирусы, некоторые простейшие) не растут на искусственных питательных средах или необходимо выделить возбудителя из микробных ассоциаций, или выявить его патогенность и вирулентность, то используют метод заражения восприимчивых животных - биологический.

*Биологический метод* осуществляют путем выделения возбудителя заболевания или его токсина при заражении лабораторных животных, восприимчивых к данному заболеванию. Диагноз устанавливают по воспроизведению у животного типичной картины заболевания и по выделению чистой культуры возбудителя из различных органов путем посева на питательные среды в случае заражения животного микробными ассоциациями. Идентификацию выделенного возбудителя проводят до вида (типа), используя бактериологический метод

*Серологические методы* диагностики инфекционных заболеваний основаны на выявлении специфических иммунных антител в сыворотке крови больного. Серологические реакции различают по способности обнаруживать различные виды антител. Для этого используют различные серологические реакции: РА, РП, РСК, РИФ, ИФА, РН.

**Реакции агглютинации (РА).** Агглютинация представляет собой реакции склеивания корпускулярных антигенов с помощью антител. *Прямые реакции агглютинации (прямая РА)*, которые применяют, чтобы обнаружить антитела, содержащиеся в сыворотке крови. При добавлении взвеси из инактивированных микроорганизмов к сыворотке крови образуется осадок из крупных хлопьев, что в свою очередь говорит о положительной реакции склеивания микробов антителами. Данная реакция используется при определении таких заболеваний как бруцеллез, сальмонеллез, листериоз и др.

**Реакция преципитации.** Сущность реакции состоит в осаждении (преципитации) антигена, находящегося в высокодисперсном состоянии, под воздействием специфических антител в растворе электролита. Растворимый антиген, участвующий в реакции, называется преципитиногеном. Антитела, реагирующие с растворенным антигеном, обеспечивающие выпадение мелкодисперсионного осадка комплекса антиген-антитело в среде электролита, называются преципитинами.

**Методы постановки реакции кольцепреципитации.**

1. Метод насливания. В небольшие (уленгутовские) пробирки наливают около 0,3 мл преципитирующей сыворотки, затем осторожно по стенке пробирки насливают в таком же объеме исследуемый экстракт (антиген) так, чтобы была видна граница между двумя компонентами.

2. Метод подслаивания. В небольшие (уленгутовские) пробирки наливают около 0,3 мл исследуемого экстракта (антигена), затем под него подслаивают 0,3 мл преципитирующей сыворотки.

Положительная РП характеризуется появлением в первые 1-2 минуты на границе двух компонентов серо-белого кольца – преципитата, хорошо видимого на черном фоне в проходящем свете.

**Генетический метод** позволяет выявлять специфические для каждого патогенна участки ДНК. Самым востребованным методом является ПЦР.

Для того чтобы правильно поставить диагноз инфекционного заболевания, чаще всего используют комплекс всех лабораторных методов: выделение возбудителя, определение антител в крови больного и выявление повышенной чувствительности замедленного типа.

*Характеристика возбудителей некоторых заболеваний.*

Возбудителем туберкулеза является микобактерия. Второе ее название – палочка Коха. Названа она так в честь немецкого ученого Роберта Коха. Возбудитель был открыт еще в 1882 году. Микобактерии туберкулеза способны поражать не только человека, но и животных. Туберкулез – это хроническое заболевание, которое развивается и протекает очень длительно. Источником возбудителя туберкулеза являются животные и человек. *Возбудителями туберкулеза являются: M. bovis, M. tuberculosis, M. avium.* Являются представителями рода *Mycobacterium* и обладают наибольшей кислотоустойчивостью. В мазках из мокроты или органов микобактерии — небольшие тонкие палочки размером 1,5—4x0,4 мкм, грамположительны. На искусственных питательных средах могут образовывать ветвящиеся формы. Микобактерии туберкулеза обладают большой полиморфностью: встречаются палочковидные, зернистые, нитевидные, кокковые, фильтрующиеся и L-формы. Как результат изменчивости появляются кислотоподатливые формы, среди которых часто встречаются так называемые зерна Муха. Наилучший метод окраски по Цилю — Нильсену. Факторы патогенности. Микобактерии туберкулеза содержат эндотоксин. Вирулентные штаммы включают особый липид, который получил название корд-фактора. Вирулентность микробов связана также с наличием фтионовых и миколовых кислот, а также полисахаридно-миколового комплекса.

Для культивирования туберкулезных микобактерии в лабораторных условиях используют специальные питательные среды, содержащие яйца, глицерин, картофель, аспарагин, витамины, соли. Чаще всего применяют яичную среду Левенштейна-Йенсена и синтетическую среду Сотона. Размножаются микобактерии туберкулеза медленно. В оптимальных условиях время генерации составляет около 15 ч, тогда как бактерии многих

других родов делятся через каждые 20-30 мин. Рост туберкулезных микобактерии можно обнаружить через 2-3 недели и позднее- до 2-3 мес, особенно в первых генерациях. На плотных средах образуются морщинистые, сухие колонии с неровными краями; в жидких средах на поверхности образуется нежная пленка, которая утолщается и падает на дно, среда при этом остается прозрачной.

Микобактерии туберкулеза долго сохраняют жизнеспособность вне организма человека или животного. В высохшей мокроте они живут до 10 мес. Выдерживают температуру 70°C в течение 20 мин, а кипячение — 5 мин; в 5% растворе карболовой кислоты и растворе сулемы 1 : 1000 погибают через сутки, в 2% растворе лизола — через час. Из дезинфицирующих средств наиболее чувствительны к хлорной извести и хлорамину.

Сибирская язва (карбункул злокачественный, антракс) — особо опасная инфекционная болезнь сельскохозяйственных и диких животных всех видов, а также человека. Болезнь протекает молниеносно, сверхостро, остро и подостро (у овец и крупного рогатого скота), остро, подостро и ангинозно (у свиней), преимущественно в карбункулёзной форме — у человека. Характеризуется интоксикацией, развитием серозно-геморрагического воспаления кожи, лимфатических узлов и внутренних органов; протекает в кожной или септической форме (также у животных встречаются кишечная и лёгочная формы).

Возбудитель сибирской язвы — *Bacillus anthracis*. Она представляет собой крупную спорообразующую грамположительную палочку размером 5—10 × 1—1,5 мкм, неподвижную. Бациллы сибирской язвы хорошо растут на мясопептонных средах, содержат капсульный и соматический антигены и способны выделять экзотоксин. Капсула обладает антифагоцитарным действием. К питательным средам не требовательна и на них образует колонии, в виде нитей отходящих от центра, в результате этот рост часто сравнивают с «луконами» или «львиной гривой».

При попадании в организм образует капсулу. Вне организма, при действии неблагоприятных факторов внешней среды, возбудитель образует спору, что делает его чрезвычайно устойчивым. Вегетативные формы сибирской язвы обладают такой же степенью устойчивости, как и другие бесспоровые бактерии — при температуре выше 75°C гибнут через 5-10 минут, в трупах животных под влиянием продуктов жизнедеятельности гнилостных бактерий и ферментативных факторов - гибель наступает в течении 7 дней. Также возбудитель быстро гибнет под действием кипячения и дезинфицирующих растворов в течении нескольких минут. Иное дело обстоит со спорообразующей формой, которая успевает образовываться из той части возбудителей, которые попали под условия неблагоприятных факторов: в почве сохраняются десятилетиями (около 60 лет) после гибели хозяина и, при повторном попадании уже в другой организм, начинают прорастать в вегетативные формы и снова становятся активными. Устойчивы к кипячению — гибнут на протяжении 30-60 минут. При автоклавировании (действие пара 100°C) — через 40 минут. Сухой жар с температурой 140°C убивает споровые формы в течении 3 часов. Прямые УФИ уничтожают на протяжении 20 и более суток. Дезинфицирующие растворы (хлорамин, горячий формальдегид, перекись водорода) убивают споры в течении 2 часов.

Клостридиозы – возбудители клостридии, представляют собой грамположительные микробы, растущие в анаэробных условиях и образующие споры, которые часто находят в почве. Различают 4 типа этих возбудителей, патогенных для человека. Виды и места их паразитирования различны:

*C. perfringens*, *C. septicum* и некоторые другие виды инфицируют травматические и хирургические раны; вызывают анаэробный целлюлит или мионекроз (газовую гангрену), осложняют криминальные abortionы, способствуя развитию мионекроза в матке, инфицируют тонкую кишку у лиц с ишемическими явлениями или нейтропенией, вызывая тяжелый сепсис;

*C. tetani* (столбнячная палочка) паразитирует в колотых или различных загрязненных

ранах, иногда в пупочной культе у новорожденных. Палочка выделяет сильнейший экзотоксин, который называют также нейротоксином (или тетаноспазмином). Это вещество вызывает тяжелые приступы судорожных сокращений скелетных мышц (столбняк);

*C.botulinum* (палочка ботулизма) растет в неправильно стерилизуемых и неправильно консервируемых пищевых продуктах и выделяет сильный нейротоксин, способный блокировать освобождение ацетилхолина в синапсах и вызывать тяжелый паралич дыхательной и скелетной мускулатуры (ботулизм).

Клостридии продуцируют коллагеназу и гиалуронидазу, которые расщепляют белки внеклеточного матрикса и способствуют проявлению инвазивности возбудителей. Однако наиболее мощными факторами вирулентности являются разнообразные токсины.

Тетаноспазмин, вырабатываемый *C.tetani*, — единственный токсин, вызывающий столбняк. Столбнячный токсин проникает в периферические нервы и транспортируется внутри аксона к ядру, затем освобождается и воспринимается задерживающими нейронами.

Нейротоксин, продуцируемый возбудителем ботулизма (*C.Botulinum*), — самый мощный из всех известных микробных токсинов: 1 мкг этого вещества может убить 200000 лабораторных мышей. В отличие от других экзотоксинов, нейротоксин не выделяется, а освобождается при гибели или аутолизе микробы. Пораженные им нейроны теряют способность выделять ацетилхолин в зонах нервно-мышечных соединений, а также синаптических ганглиев и парасимпатических концевых пластинок вегетативной нервной системы, что сопровождается развитием паралича, нисходящего от черепных нервов к конечностям.

Бруцеллез - инфекционно-аллергическое заболевание, протекающее с лихорадкой, преимущественным поражением опорно-двигательного аппарата, нервной, урогенитальной и других систем организма со склонностью к хроническому рецидивирующему течению. Бактерии, вызывающие бруцеллез, объединены в род *Brucella*, названный в честь английского ученого Брюса, который впервые в 1886 г. выделил возбудителя из трупа человека, погибшего от этой болезни. Род *Brucella* включает несколько видов, основные виды: *Br. melitensis*, *Br. abortus*, *Br. suis*.

Морфология и биологические свойства. Бруцеллы представляют собой мелкие (0,3—2 мкм) бактерии овоидной, шарообразной или палочковидной формы. При некоторых условиях окружаются капсулой, неподвижны, спор не образуют. Грамотрицательны. По Романовскому — Гимзе окрашиваются в слабо-фиолетовый цвет. В препарате чаще всего расположены беспорядочно. Культивируются в аэробных условиях при оптимальной температуре 36°C и pH 6,8—7,2. При температуре выше 45°C и ниже 6°C роста не наблюдается. В первых генерациях, выделяемых из патологического материала, растут медленно, в течение 1—3 нед; лабораторные культуры вырастают через 24—48 ч. Растут на простых питательных средах. Элективной питательной средой являются печеночный бульон и печеночный агар. В жидких средах при росте бруцелл наблюдается помутнение, на плотных средах колонии разной величины, выпуклые, бесцветные, с перламутровым оттенком. Встречаются колонии в S- и R-формах. Для культивирования *Br. abortus* необходимо присутствие 10% углекислоты. Биохимически бруцеллы малоактивны. Бруцеллы устойчивы во внешней среде: в воде-до 2 мес и более, в брынзе - 2 мес и в сыром мясе - 3 мес, в засоленном - 1 мес, в шерсти - до 4 мес. Кипячение убивает их моментально, нагревание при 60°C - через 30 мин (благодаря чему пастеризация молока при 80°C в течение 20 мин гарантирует безопасность от заражения).

### Задания для самостоятельной работы

1. Промикроскопировать и зарисовать возбудителей: туберкулеза, сибирской язвы, бруцеллеза, столбняка, ботулизма.
2. Ответить на контрольные вопросы.

**Протокол исследования**

Название микроорганизма	Рисунок

**Контрольные вопросы**

1. Кто является возбудителем сибирской язвы?
2. Главный фактор патогенности возбудителя сибирской язвы?
3. Кто является возбудителем столбняка?
4. Кто является возбудителем ботулизма?
5. Кто является возбудителем туберкулеза?

**3. МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ  
ПО ПРОВЕДЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ (не предусмотрено РУП)**

**4. МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ  
ПО ПРОВЕДЕНИЮ СЕМИНАРСКИХ ЗАНЯТИЙ (не предусмотрено РУП)**