

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

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Б3.Б.3 МИКРОБИОЛОГИЯ

Направление подготовки: 111900.62 "Ветеринарно-санитарная экспертиза"

Профиль подготовки: "Ветеринарно-санитарная экспертиза"

Форма обучения: заочная

СОДЕРЖАНИЕ

1. Конспект лекций	3
1.1 Лекция № 1 Систематика микроорганизмов, строение бактерий.....	3
1.2 Лекция № 2 Строение бактериальной клетки	7
1.3 Лекция № 3 Физиология и генетика микроорганизмов.....	10
1.4 Лекция № 4 Действие биологических факторов на микроорганизмы.....	20
1.5 Лекция № 5 Учение об инфекции.....	27
2. Методические указания по выполнению лабораторных работ	32
2.1 Лабораторная работа № ЛР-1 Устройство микробиологической лаборатории. Техника безопасности при работе в бак.лаборатории. Устройство микроскопа. Микроскопия. Виды микроскопии.....	32
2.2 Лабораторная работа № ЛР-2 Сложный метод окраски по Граму. Не обязательные компоненты бактериальной клетки, их функции.....	36
2.3 Лабораторная работа № ЛР-3 Методы стерилизации. Питательные среды. Методы учёта численности микроорганизмов.....	40
2.4 Лабораторная работа № ЛР-4 Техника посева и методы культивирования аэробов и анаэробов. Культуральные свойства микроорганизмов.....	47
2.5 Лабораторная работа № ЛР-5 Выделение чистых культур микроорганизмов. Биохимические свойства микроорганизмов. Идентификация чистой культуры.....	53
2.6 Лабораторная работа № ЛР-6 Серологические реакции. Реакция агглютинации (РА). Реакции преципитации (РП).....	58
2.7 Лабораторная работа № ЛР-7 Методы лабораторной диагностики. Изучение морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических свойств возбудителей сибирской язвы, колибактериоза.....	64
3. Методические указания по проведению практических занятий	68
3.1 Практическое занятие № ПЗ-1 Изучение морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических свойств возбудителя туберкулеза, бруцеллеза.....	68

1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

1. 1 Лекция №1 (2 часа).

Тема: «Систематика микроорганизмов, строение бактерий»

1.1.1 Вопросы лекции:

1. Систематика и номенклатура микроорганизмов.
2. Основные морфологические группы микроорганизмов.
3. Обязательные компоненты бактериальной клетки. Клеточная стенка грамположительных и грамотрицательных бактерий.
4. Бактерии, лишённые клеточной стенки

1.1.2 Краткое содержание вопросов:

1. Систематика и номенклатура микроорганизмов.

Раздел систематики, изучающий принципы классификации, называется таксономией (от греч. *Taxis* – расположение, порядок).

Систематика микроорганизмов базируется на следующих признаках: морфологических, физиологических, биохимических, генетических, тинкториальных и т.д.

Основной таксономической категорией в микробиологии, как и в других биологических науках, является **вид** – совокупность особей, характеризующихся рядом общих морфологических, физиолого-биохимических, молекулярно-генетических признаков.

Культура микроорганизмов, состоящая из клеток одного вида, носит название **чистой культуры**.

Штамм - это чистая культура микроорганизмов, выделенная из определённого места обитания (воды, почвы, организма животного и т.д.). Разные штаммы микроорганизмов могут различаться по некоторым признакам, например, чувствительности к АБ, способности синтезировать некоторые вещества и т.д.

Первую бактериологическую классификацию разработал Фердинанд КОН. А. К. Линней предложил биноминальную номенклатуру, согласно которой каждый вид имеет название, состоящее из двух латинских слов. Первое слово означает род, а второе определяет конкретный вид этого рода и называется видовым эпитетом. Видовой эпитет может быть присвоен, исходя из клинических признаков, вызываемого заболевания, морфологии колоний, местообитания, географического места выявления. Родовое название пишется с заглавной буквы, а второе – со строчной даже в том случае, если видовой эпитет присвоен в честь учёного.

Основными классификационными понятиями помимо вида и штамма, являются следующие:

- **ВИД** – эволюционно сложившаяся совокупность особей, имеющих единий генотип, проявляющийся сходными фенотипическими признаками.
- **ПОПУЛЯЦИЯ** – совокупность особей одного вида, относительно длительно обитающих на определенной территории.
- **КУЛЬТУРА** – совокупность бактерий одного вида (чистая) или нескольких видов (смешанная), выращенная на питательной среде (жидкой или плотной).
- **КОЛОНИЯ** – видимое скопление бактерий одного вида на поверхности или в глубине питательной среды.
- **КЛОН** – культура клеток, выращенная из одного микроорганизма методом клонирования.

Ключ к определению видов дают специальные определители бактерий, предложенные рядом авторов. Наиболее широко используемым в настоящее время является определитель Д. Берджи или Д. Берги (американский микробиолог 1860-1937) в 1923 году выпустил первый международный определитель. Последующие издания определителя под названием “Bergey's Manual of Determinative Bacteriology” подготовлены Международным комитетом по систематике бактерий и переиздавались 9 раз. В них приводятся последние на время издания сведения о микроорганизмах, их таксономии, номенклатуре и принципах идентификации, дана экологическая характеристика (место обитания, ниши) и другие свойства.

Представление о месте микроорганизмов среди других живых существ изменялось с течением времени от отнесения их к животным или растениям до выделения в три отдельных домена (надцарства, империи).

Существует формальная нумерическая таксономия, где все признаки альтернативны и имеют «одинаковый вес». Это позволяет дать количественную оценку степени сходства и различия организмов путём вычисления коэффициентов сходства или соответствия. Для использования нумерической классификации необходимо как можно полнее изучить фенотипические признаки микроорганизма, так как от этого зависит точность помещения его в данную группу.

Однако в настоящее время основным является филогенетический подход к систематике микроорганизмов, который учитывает родственные связи и пути эволюции организмов. На основании исследований профессора Иллинойского университета К. Вёзе сделана попытка перехода к филогенетической классификации микроорганизмов. При этом сравнивают нуклеотидные последовательности 16S рибосомальной РНК, состоящей из 1500 нуклеотидов, из которых 900 – консервативны.

Филогения бактерий. Рибосомы – это места синтеза белка, и они имеются поэтому во всех клетках. По своим функциям они очень консервативны; в особенности это относится к рибосомным РНК (рРНК), так как на последовательность их оснований не может влиять ни вырожденность генетического кода, ни супрессорные мутации. Таким образом, рРНК отвечает требованиям, которые можно предъявить всеобщему филогенетическому маркеру. При определении последовательности нуклеотидов в 16S-рРНК у большого числа бактерий обнаружились как неожиданные различия, так и черты сходства. В результате каталогизации нуклеотидных последовательностей были установлены коэффициенты сходства, что привело к созданию дендрограммы, которую следует признать филогенетическим древом.

Этот анализ, кроме того, привел к выводу, что одна из групп бактерий очень сильно отличается от всех остальных; по-видимому, уже очень давно произошло разделение прокариот на две ветви, одну из которых составляет группа архебактерий, а другую – все остальные группы, которые объединяют под названием эубактерий.

Таким образом, можно думать, что от прокариот (прогенет) произошли, с одной стороны архебактерии, а с другой – эубактерии. Имеются также данные, позволяющие предполагать тесные связи между архебактериями и эукариотами.

В настоящее время все живые существа на основании анализа нуклеотидной последовательности 16S рибосомальной РНК разделены на три домена (надцарства): Bacteria, Archaea и Eukarya.

В домен Eukarya вошли все эукариотические организмы как одноклеточные так и многоклеточные, включая человека.

К домену Archaea относятся микроорганизмы, разделённые на три филума: Euryarchaeota, Crenarchaeota и Korarchaeota. Первый филум объединяет повсеместно распространенные микроорганизмы. Это *метаногены* — строгие анаэробы, обитающие в донных осадках пресноводных зон, богатых органикой, или в рубце жвачных. Широко распространены также *экстремальные галофилы*, растущие при высоких концентрациях соли и способные

осуществлять особый тип фотосинтеза с помощью бактериородопсина, который на свету работает как протонная помпа.

Ко второму филуму относятся микроорганизмы, имеющие очень узкие и специфические места обитания. Это *экстремофилы*, зависящие от серных соединений, оптимумы pH и температуры роста которых отличаются экстремальными значениями.

Третий филум зарезервирован за представителями до настоящего времени некультивируемых прокариот, для которых, однако, известны последовательности генов, кодирующих молекулу 16S рРНК.

Кроме нуклеотидной последовательности 16S рРНК, археи отличаются от бактерий и эукариот рядом существенных признаков:

■ **строением мембран и липидов мембран.** В обычных липидах глицерол связан сложноэфирной связью с жирными кислотами, а у архей — простой эфирной связью с спиртом — фитанолом. Археи могут иметь как обычные бислойные, так и ригидные монослойные мембранны, но чем экстремальнее условия, тем больше монослоистых областей находится в мембране. Археи содержат в мембранных 7—30 % изопреноидов (в частности, сквалена). Такие же соединения находят в нефтяных отложениях, что свидетельствует о древности этих микроорганизмов;

■ **строением клеточных стенок.** У архей не найдены типичные для бактерий пептидогликановые (муреиновые) клеточные стенки. Они представлены либо псевдомуреином, либо белковым S-слоем (структурированным белком, содержащим кислые аминокислоты, за счет чего на поверхности клетки создается тонкий слой воды, отталкивающий ионы солей). Еще один вариант организации архей — отсутствие клеточной стенки, когда мембрана почти полностью представлена ригидным монослоем из тетрамеров, усиленным большим количеством пятачленных колец, например, как у *Thermoplasma*;

■ **особенностями метаболизма.** У архей ДНК связана с гистонами и имеет инtronные участки, подобно эукариотам. В тРНК архей не найдено рибосомина. РНК-полимеразы этих организмов больше похожи на эукариотические по субъединичному составу. Трансляция белка не чувствительна к хлорамфениколу (как у бактерий), зато чувствительна к дифтерийному токсину (как у эукариот).

■ Археи обычно существуют в экстремальных условиях и дают скучный рост. Однако в таких местообитаниях у них мало конкурентов, что позволило им сохраниться до настоящего времени.

Домен *Bacteria* включает прокариотические микроорганизмы, имеющие типичные признаки бактерий, в частности клеточные оболочки, содержащие пептидогликан. В зависимости от микроскопически различаемой формы (кокки, палочки, спирillлы), от окраски по Грамму и отношению к молекуларному азоту (аэробы, анаэробы) домен *Bacteria* разделён на 19 групп, цианобактерии выделены в виде 20-ой группы.

2. Основные морфологические группы микроорганизмов.

Формы клеток бактерий не отличаются большим разнообразием. Различают:

Кокки — это бактерии шаровидной формы. В зависимости от взаимного расположения различают:

микрококки — отдельно лежащие кокки;

диплококки — парно расположенные кокки;

стрептококки — цепочки кокков;

стафилококки — скопление кокков в виде виноградной грозди;

тетракокки — структуры из четырёх кокков;

сарцины — многослойные структуры из 8...16 кокков.

Палочковидные бактерии.

Клетки цилиндрической формы могут располагаться одиночно;

диплобактерии — парами;

стрептобактерии – цепочками.

Палочковидные бактерии, образующие в неблагоприятных условиях специфическую форму существования – спору, диаметр которой не превышает диаметр клетки, называют *бациллами*. Если диаметр споры в клетке существенно превышает её поперечный диаметр, то такие спорообразующие бактерии называют *клюстридиями*.

Извитые (спиралевидные) бактерии. К ним относят вибрионы, спириллы и спирохеты.

Вибрионы – клетки в форме слегка изогнутых палочек;

спириллы – бактерии, образующие до 6 завитков;

спирохеты – бактерии со множеством (свыше 6) мелких завитков и в отличие от спирилл без жгутиков.

Ветвящиеся бактерии. Выраженная способность к ветвлению отмечена у прокариот из группы актиномицет; тенденцию к ветвлению проявляют и другие бактерии.

Бактерии без постоянной формы. Микоплазмы лишены клеточной стенки, поэтому их форма легко изменяется.

Существуют микроорганизмы необычной формы (квадратные, прямоугольные, бобовидные, звездчатые, тарелкообразные), ветвящиеся и образующие мицелий (актинобактерии), имеющие гифы с почками, стебельки. Существуют также бактерии, меняющие свою морфологию в течение жизненного цикла (каринобактерии, мукобактерии, нокардии) и обладающие полиморфизмом – свойство некоторых бактерий в процессе роста на питательных средах образовывать формы, отличающиеся от типичной.

Несмотря на то, что термин «микроорганизм» подразумевает малые размеры, этот признак варьирует в довольно широких пределах.

Размеры клеток большинства прокариот находятся в пределах 0,2-10,0 мкм. Однако среди них есть «карлики» (трепонемы, микоплазмы и нанобактерии размерами примерно 0,05-0,1 мкм) и «гиганты» (ахроматиум и макромонас длиною до 100 мкм).

Размеры известных в настоящее время прокариотических микроорганизмов находятся в пределах от 0,05 до 600 мкм.

3. Обязательные компоненты бактериальной клетки. Клеточная стенка грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Все структуры бактериальной клетки подразделяются на обязательные и необязательные. К обязательным относятся: клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана, нуклеоид, мезосомы, рибосомы. Не обязательные: капсула, слизистый чехол, пили, жгутики и эндоспоры.

Клеточная стенка. Большинство прокариот имеет ригидную клеточную стенку, под которой расположена ЦПМ. Состав и строение клеточной стенки – важный систематический признак, по которому все прокариоты подразделяются на следующие группы: грамположительные, грамотрицательные и не имеющие клеточной стенки.

Клеточная стенка выполняет следующие функции:

1. Защищает от осмотического шока и других повреждающих факторов.
2. Определяет форму бактерий.
3. Участвует в обмене веществ.
4. У многих микроорганизмов токсична и содержит поверхностный антиген.
5. Участвует в транспорте экзотоксинов.

Грамположительные бактерии имеют мощную клеточную стенку, состоящую из 5-6 слоев пептидогликана (на его долю приходится до 90% сухой массы клеточной стенки), включающих полимеры тейхоевых кислот, которые являются производными рибитола или глицерина. Они пронизывают пептидогликан насквозь или находятся на его поверхности. Выделено 2 типа кислот: *рибитйтейхоевые* и *глицеринтайхоевые* (клетки каждого вида содержат только один тип тейхоевой кислоты). Липотейхоевые кислоты

закреплены в цитоплазматической мемbrane, они пронизывают пептидогликан или располагаются между ним и мембраной.

Клеточная стенка у грамотрицательных бактерий тонкая, имеют однослойный пептидогликан, на долю которого приходится до 5-10% сухого веса стенки и не содержит тейхоевой кислоты. Пептидогликан покрыт наружной мембраной с мозаичным строением, в ее состав входит липопротеин, фосфолипиды, липополисахарид (ЛПС) и белки. ЛПС обладает иммуногенными свойствами и называется О-Аг.

На особенностях строения и химического состава Г+и Г- бактерий основан метод окраски по Граму. В результате Г+ микроорганизмы окрашиваются в фиолетовый цвет, а Г- - в красный.

4. Бактерии, лишённые клеточной стенки

Из любой бактериальной клетки можно получить формы, полностью или частично лишенные клеточной стенки. Они называются соответственно *протопластами* и *сферопластами* и независимо от исходного морфологического типа бактерии из-за отсутствия клеточной стенки принимают шарообразную или грушевидную форму. Кроме того, существуют L-формы бактерий, которые, в отличие от протопластов и сферопластов, способны к размножению, являясь вполне полноценными микробными клетками данного вида бактерий.

L-формы разных видов бактерий морфологически неразличимы. Независимо от формы исходной клетки (кокки, палочки, вибрионы) они представляют собой сферические образования разных размеров. Имеются L-формы:

стабильные — не реверсирующие в исходный морфотип;

неустойчивые — реверсирующие в исходный морфотип при устраниении причины, вызвавшей их образование.

В процессе реверсии восстанавливается способность бактерий синтезировать пептидогликан муреин клеточной стенки. L-формы различных бактерий играют существенную роль в патогенезе многих хронических и рецидивирующих инфекционных заболеваний: бруцеллеза, туберкулеза, сифилиса, хронической гонореи и т. д.

1. 2 Лекция №2 (2 часа).

Тема: «Строение бактериальной клетки»

1.2.1 Вопросы лекции:

1. Цитоплазма и мембранны.
2. Рибосомы.
3. Необязательные компоненты бактериальной клетки. Капсула и слизь.
4. Жгутики и механизмы движения.
5. Эндоспоры.

1.2.2 Краткое содержание вопросов:

1. Цитоплазма и мембранны.

Цитоплазматическая мембрана. Состоит из простых фосфолипидов, образующих мембранный бислой, куда погружены многочисленные белки. Цитоплазматическая мембрана имеет сложную трехслойную структуру, для нее характерна избирательная проницаемость. На долю ЦМ приходится около 10% сухого веса бактерий.

Белки цитоплазматической мембраны разделяют на *структурные* и *функциональные* (включают ферменты, участвующие в синтетических реакциях на поверхности мембраны, окислительно-восстановительных процессах, а также некоторые специализированные энзимы (например, пермеазы)).

В ЦМ расположена система электронного транспорта бактерий, обеспечивающая энергетические потребности.

ЦПМ выполняет ряд функций:

1. Служит осмотическим барьером.
2. Контролирует поступление питательных веществ в клетку и выход метаболитов.
3. Содержит ферменты, участвующие в переносе веществ.
4. В мембране локализуются ферменты, отвечающие за дыхательную активность.
5. Образует инвагинаты – мезосомы.
6. С ЦПМ связаны жгутики и аппарат регуляции их движения.

Между ЦМ и внутренним слоем пептидогликана находится перiplазматическое пространство, которое играет существенную роль во взаимодействии ЦМ и клеточной стенки, в нем содержатся различные ферменты (фосфатазы), олигосахариды и другие вещества.

Мезосомы. Прокариоты характеризуются простой внутриклеточной организацией и не содержат автономных органелл, хотя имеют включения. Среди них следует отметить мезосомы – Это инвагинация ЦПМ в форме везикул, трубочек и ламелл. Функции:

1. Энергетический метаболизм.
2. Участие в делении клетки, спорообразовании.
3. Обеспечивают транспортировку экзотоксинов у патогенных бактерий.

Однако некоторые исследователи считают, что мезосома – это артефакт, возникающий при фиксации клеток для электронной микроскопии.

Цитоплазма – это сложная коллоидная система, неподвижна. В ней располагается ядерный аппарат – генофор (нуклеоид), который не отделен от нее мембранами; плазмиды, которые связаны со специфическими рецепторами на ЦПМ; рибосомы. Помимо этих основных структурных элементов, в цитоплазме содержатся различные макромолекулы (аминокислоты, тРНК), мезосомы, различные включения, которые образуются в процессе жизнедеятельности: капельки нейтральных липидов, воска, серы, гранулезы (у бактерий рода *Clostridium*), волютина (*Spirillum volutans*, *Corynebacterium diphtheriae*). Гранулеза, гликоген, зерна волютина служат для бактерий запасным источником энергии. У некоторых бактерий (*Bacillus thuringiensis*) в цитоплазме находятся кристаллы белковой природы, обладающие ядовитым действием для насекомых.

Функции включений: продукты обмена бактериальной клетки, запас питательных веществ.

2. Рибосомы.

Рибосомы - Рибонуклеопротеиновые частицы размером около 20 нм, состоящие из двух субъединиц с коэффициентом седиментации 30S для одной и 50S для другой. Объединение субъединиц происходит перед началом синтеза белка в одну, коэффициент седиментации 70S (единиц Сведберга). В зависимости от интенсивности роста бактериальная клетка может содержать от 5 000 до 50 000 рибосом.

Функция: синтез белка.

3. Необязательные компоненты бактериальной клетки. Капсула и слизь.

Капсулы. На поверхности клеточных стенок многих прокариот можно обнаружить слизистые капсулы разной толщины, поверхность колоний с клетками выглядит гладкой, влажной и блестящей. Капсула представляет собой слизистый слой, который сохраняет связь с клеточной стенкой, служит внешним покровом бактерий, толщина ее не более 0,2 мкм, в образовании капсул принимает участие ЦПМ. По химической природе – капсула чаще всего полисахаридной природы, но бывают гликопротеидной и полипептидной природы.

Основная роль капсул для патогенных видов – предохранение клетки от неблагоприятных условий среды обитания. Капсулы содержат запасные питательные вещества, выполняют адгезивную функцию, способствуя прилипанию к поверхности

клетки хозяина. Являются важными факторами патогенности: либо маскируют их от фагоцитоза, либо подавляют фагоцитоз.

4. Жгутики и механизмы движения.

бактерий жгутики правовращающие, у архей – левовращающие.

Жгутик состоит из базального тела, включающего четыре (у Г-) или два (у Г+) кольца, стержень и моторные белки, а также из крючка и филамента. Базальное тело закреплено в ЦПМ двумя кольцами М и С, которые часто рассматриваются как одно целое. MS-кольцо окружено несколькими белками, которые называют моторными и от которых вращающий момент передаётся на филамент. В пептидогликановом слое периплазмы у Г- бактерий находится кольцо Р, а во внешней мембране – кольцо L. Оба эти кольца выполняют роль втулки, дополнительно удерживающей механизм жгутика. Все кольца пронизаны жестким стержнем, который передаёт крутящий момент. Механизм жгутика имеет крючок, переходящий затем в филамент, который заканчивается «шапочкой». Филамент состоит из белка флагеллина.

Пили. Это нитеобразные полимерные органеллы белковой природы, локализованные на поверхности клеток. Термином «пили» обозначают все типы нежгутиковых образований на поверхности клетки, синоним «фимбрии». Тонкие полые нити белковой природы длиной 0,3-10 мкм, толщиной 10 нм, покрывающие поверхность бактериальных клеток. Пили состоят из одного или нескольких типов белковых субъединиц, называемых пилины или фимбринами, которые организованы в спиральные структуры. Пили часто расположены перитрихиально по поверхности клеток, но иногда могут быть локализованы на одном конце клетки.

Пили подразделяются на 2 типа: пили 1 типа обусловливают прикрепление или адгезию бактерий к определенным клеткам организма хозяина. На одну бактериальную клетку приходится от нескольких сотен до нескольких тысяч таких пилей.

Пили 2 типа (коньюгативные или половые – sex pili) участвуют в коньюгации бактерий, обеспечивающей перенос части генетического материала от донора к реципиенту. Они имеются только у бактерий-доноров в ограниченном количестве (1-4 на клетку).

Функции пилей: адгезия, питание, водно-солевой обмен (пили общего типа), передача генетической информации (коньюгативные или половые пили, F-пили), а некоторые — могут принимать участие в движении.

5. Эндоспоры.

Споры. Грамположительные бактерии образуют устойчивые к внешним воздействиям покоящиеся структуры, называемые эндоспорами. Они формируются внутри вегетативных клеток бактерий, принадлежащих к родам *Bacillus*, *Clostridium* и др. Все эти микроорганизмы образуют толстую клеточную стенку грамположительного типа, что, по-видимому, является необходимым для спорообразования. Эндоспоры чрезвычайно устойчивы к действию таких факторов как нагревание, УФ-облучение, действие химических дезинфектантов, растворителей, к высушиванию. В природе образование спор помогает клеткам избегать гибели при истощении субстрата или высушивании, воздействии радиации или химических веществ. Обычно спора в клетке закладывается одна, однако известны случаи формирования до пяти спор в одной бактериальной клетке.

Некоторые эндоспоры остаются жизнеспособными в течение 500 лет (напр. споры бацилл сибирской язвы в скотомогильниках), но совершенно уникальным является случай проращивания спор *Bacillus cereus*, обнаруженных в кишечнике пчелы, найденной в кусочке янтаря, насчитывающего 25-30 млн. лет. Из-за высокой резистентности и того факта, что многие спорообразующие бактерии являются опасными патогенами, борьба со спорами играет важную роль в пищевой, медицинской и промышленной микробиологии.

Эндоспоры хорошо просматриваются в клетках с помощью светового или электронного микроскопа. Поскольку споры практически непроницаемы для многих видов красителей, они наблюдаются как неокрашенные тельца на фоне прокрашенного остального содержимого клетки. Но есть специальные методы дифференциальной окраски спор.

Электронно-микроскопические исследования показали, что их структура довольно сложна. Споры большинства клеток гладкие и оvoidные, хотя встречаются и круглые, а также с характерными поверхностями. Спора окружена тонким экзоспориумом, за ним (по направлению к центру споры) лежит оболочка споры, состоящая из нескольких белковых слоёв, имеющая, как правило, значительную толщину. Оболочка практически не проницаема для химических веществ, вследствие чего спора обладает существенной устойчивостью к дезинфектантам. За оболочкой располагается кортекс, который может занимать до половины объёма споры. Кортекс состоит из пептидогликана, менее поперечношитого, чем пептидогликан вегетативной клетки.

Клеточная стенка споры (или стенка ядра споры) расположена внутри кортекса и окружает протопласт (или ядро споры). Ядро споры содержит нормальные клеточные структуры, такие как нуклеоид и рибосомы. Ядро несёт в себе всё необходимое для начала роста, запасённое в стабильной форме. Ядро лишено компонентов вегетативной клетки, которые либо нестойки, либо могут быть легко восполнены при начале прорастания споры.

Споруляция обычно начинается при истощении питательных веществ в среде. Образование споры – сложный процесс, который можно подразделить на 7 стадий. На стадии 1 в материнской клетке формируется второй полноценный нуклеоид, отделяющийся от остального содержимого клетки ЦПМ, которая втягивается внутрь цитоплазмы, образуя септу периспоры (стадия 2). Мембрана продолжает нарастать и окружает незрелую спору двойным слоем (стадия 3). Далее между двумя слоями мембранны начинается формирование кортекса, на этой стадии (4) начинается накопление в споре Са-дипиколината (кальцевая соль дипиколиновой кислоты играет роль в терморезистентности спор). На стадии 5 вокруг кортекса образуются белковые оболочки и экзоспориум. На стадии 6 синтез оболочек завершается, спора превращается в зрелую, увеличивается её светопреломление, термоустойчивость. На стадии 7 происходит лизис спорангия и выход споры. Длительность цикла спорообразования составляет обычно от 7 до 10 часов.

Прорастание спящей споры в активную вегетативную клетку происходит в три стадии: 1. активация; 2) созревание; 3) прорастание. Часто споры не прорастают даже в богатой среде без активации, которая может заключаться в слабом нагреве. Процесс активации заканчивается созреванием, т.е. нарушением состояния покоя споры. Процесс характеризуется набуханием споры, разрывом или поглощением экзоспориума, потерей устойчивости к нагреву и стрессам, утратой способности преломлять свет, увеличением метаболической активности. В период прорастания протопласт споры образует новые компоненты, выходит из остатков споровых оболочек и формирует новую активную клетку бактерий.

1. 3 Лекция №3 (2 часа).

Тема: «Физиология и генетика микроорганизмов»

1.3.1 Вопросы лекции:

1. Химический состав микробных клеток.
2. Метabolизм (питание и дыхание) микроорганизмов.
3. Рост и размножение. Основные принципы культивирования.
4. Материальные основы наследственности.

5. Фенотипическая изменчивость и генотипическая изменчивость (мутации и рекомбинации).

1.3.2 Краткое содержание вопросов:

1. Химический состав микробных клеток.

Бактериальные клетки содержат от 70 до 85 % воды. Следовательно, сухая биомасса составляет 15... 30 % общей клеточной массы.

Вода имеет огромное значение в жизни микроорганизмов, питательные вещества могут попасть в клетку только в растворенном до отдельных молекул состоянии. Часть воды в клетке находится в связанном состоянии с белками, углеводами и другими веществами и входит в клеточные структуры. Остальная вода находится в свободном состоянии и служит дисперсной средой для коллоидов и растворителем различных органических и минеральных соединений, образующихся в клетке при обмене веществ.

Сухая биомасса клетки — это в основном полимеры.

Белки. Содержание белков в клетке составляет около 50%. У разных микроорганизмов содержание белков в процентах следующее: у бактерий 40...80, у дрожжей 40...60, у грибов 15...40. Белки бывают простые — альбумины, глобулины; и сложные, в состав которых входит белковая и небелковая части (липопротеиды).

Белки выполняют две основные функции:

1. входят в состав всех мембран клетки;

2. играют роль ферментов — биохимических катализаторов, которые обусловливают, направляют и ускоряют почти все химические реакции, происходящие в живой клетке.

Среди белков есть и такие, которые убивают жизнь, — токсины. Бактериальные токсины наиболее ядовитые.

Некоторые микроорганизмы синтезируют большое количество белков в клетке — до 80%. Такие микроорганизмы рассматриваются как возможные продуценты кормового и пищевого белка. Промышленное производство таких белков рентабельно, так как микроорганизмы быстро растут независимо от времени года и погоды. В качестве сырья для их роста используются отходы пищевой и других отраслей промышленности. Продуцентами могут быть дрожжи, бактерии и водоросли, особенно цианобактерии.

К настоящему времени выделено и изучено около 1000 ферментов в чистом виде. Все они подразделены по правилам номенклатуры ферментов на шесть классов:

1-й класс — оксидоредуктазы — катализируют окислительно-восстановительные реакции;

2-й класс — трансферазы, которые переносят группы атомов с помощью специфических переносчиков, действующих как коферменты;

3-й класс — лиазы - катализируют отщепление отдельных химических групп.

4-й класс — изомеразы, которые катализируют превращения химических соединений в их изомеры;

5-й класс — лигазы - катализируют реакции синтеза сложных органических соединений из более простых; реакции идут с затратой энергии, получаемой из АТФ;

6-й класс — гидролазы, которые катализируют гидролитическое расщепление.

Применение ферментов. Применение в пищевой и легкой промышленности ферментов, полученных из микроорганизмов, позволяет значительно интенсифицировать технологический процесс, повышает выход и улучшает качество готовой продукции.

Углеводы составляют от 12 до 28%. Основная функция — источник энергии.

Нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК). В клетке содержится от 3 до 4 % ДНК и от 10 до 20 % РНК. В молекуле ДНК закодирована вся наследственная информация вида. ДНК сосредоточена в нуклеоиде прокариотной клетки. Часть ДНК находится в плазмidaх. РНК сосредоточена главным образом в рибосомах (до 80 %), синтезирующих белок, и в цитоплазме.

Липиды. В клетке образуется до 10 % липидов. Некоторые дрожжи и плесневые грибы синтезируют до 40...60 % липидов. Липиды входят в состав цитоплазматической мембраны и в состав всех других мембран. Могут находиться в цитоплазме в виде гранул. Функция – запас резервных веществ, поддерживают структуру микробных клеток, придают устойчивость.

2. Метаболизм (питание и дыхание) микроорганизмов.

Питание - физико-химические эндотермические процессы, связанные с поступлением внутрь клетки питательных субстратов и обеспечивающие синтез компонентов, необходимых для метаболизма, роста и размножения бактерий. Метаболизм - обмен веществ в микробной клетке - включает два взаимосвязанных процесса: ассимиляцию (анаболизм - питание) и диссимиляцию (катализм – дыхание и брожение).

По типам питания все живые существа подразделяются на несколько групп в зависимости от природы источников углерода и энергии, а также донора электронов. У микроорганизмов представлены все типы метаболизма, к тому же они могут переключаться с одного типа питания на другой в зависимости от условий.

Организмы, использующие в качестве источника углерода в процессе анаболизма CO₂ – автотрофы (самопитающиеся), а использующие готовые органические вещества – гетеротрофы. Гетеротрофные микроорганизмы могут быть паразитами – используют в качестве источника органических соединений субстраты живого организма и сапрофитами - не зависят от других организмов, но нуждаются в готовых органических соединениях.

В зависимости от источника используемой энергии автотрофы подразделяются на фотоавтотрофы – использующие энергию Солнца и хемоавтотрофы - микроорганизмы, которые питаются неорганическими веществами путем использования энергии химических реакций. Они окисляют аммиак, сероводород и другие вещества, содержащиеся в воде, почве, других средах. Так, серобактерии ассимилируют неорганические соединения за счет энергии, высвобождающейся при окислении сероводорода и превращении его в чистую серу.

По отношению к источнику азота микроорганизмы делятся на прототрофные - способны синтезировать все необходимые им органические соединения (углеводы, аминокислоты и др.) из глюкозы и солей аммония и ауксотрофные, не способны синтезировать какое-либо из указанных соединений, ассимилируют их из окружающей среды или организма хозяина.

Некоторые микроорганизмы, не синтезирующие какие-либо вещества, должны получать их в готовом виде. Эти вещества, относящиеся к различным классам химических соединений, получили название факторов роста, ими могут быть аминокислоты, пурины, пиримидины и их производные, витамины, липиды и т. д.

Потребность того или другого микроорганизма в определенных ростовых факторах является стабильным признаком, который используется для дифференциации и идентификации бактерий, а также при изготовлении питательных сред для лабораторных и биотехнологических целей.

Первой стадией метаболизма того или иного вещества является его проникновение в клетку. У большинства микроорганизмов в клетку проникают вещества, растворённые в воде. Для микроорганизмов характерен голофитный тип питания: клеточная стенка микроорганизмов, ЦПМ являются существенным препятствием для проникновения в клетку высокомолекулярных веществ. Поэтому такие соединения сначала расщепляются вне клетки на олиго- и мономеры соответствующими гидrolазами. У Г- м/о эти ферменты расположены либо на наружной стороне ЦПМ, либо в перiplазматическом пространстве. Высокомолекулярные вещества проникают в их периплазму с помощью белков-поринов в наружной мембране.

Существует несколько принципиально различных способов поступления веществ в клетку:

1. Путём пассивной диффузии – все незаряженные молекулы по градиенту концентрации, не требует затрат энергии.

2. Путём облегчённой диффузии – при участии специфических белков-переносчиков по градиенту концентрации.

3. Путём активного транспорта – против градиента концентрации, с затратой метаболической энергии. Так в клетку поступает большинство питательных веществ.

Дыхание – физико-химические экзотермические процессы, связанные с биологическим окислением субстрата кислородом или путём дегидрирования.

Под дыханием понимается цепь последовательных ОВР, сопровождающихся переносом электронов от окисляющейся системы к восстанавливающейся. Энергия аккумулируется в молекулах АДФ и АТФ, в макроэргических связях. Эти молекулы концентрируются в мезосомах.

По своему отношению к кислороду все микроорганизмы подразделяются на аэробы, растущие в присутствии O_2 , и анаэробы, способные расти в его отсутствие.

Аэробное дыхание – это процесс, при котором последним акцептором электронов, протонов, H^+ является молекулярный кислород.

Анаэробное дыхание – осуществляется без участия кислорода. Подразделяется на собственно анаэробное дыхание и брожение.

При собственно анаэробном дыхании акцептом H^+ являются неорганические вещества. При брожении – органические вещества. Брожение открыл Л. Пастер.

По типу дыхания различают следующие группы микроорганизмов:

1. Облигатные (безусловные) аэробы.
2. Микроаэрофилы.
3. Факультативные анаэробы.
4. Облигатные.

При культивировании анаэробов от кислорода воздуха избавляются несколькими путями:

1. Механический – культивирование в анаэростате или эксикаторе. Анаэростат – это металлическая ёмкость, снабжённая манометром и краном для окачивания воздуха. Удаляют кислород путём отсасывания воздуха из анаэростата, заменяя сжатым оксидом углерода из баллона.

Для культивирования микроаэрофилов используют эксикатор, в который помещают пробирки или чашки Петри с посевами и свечу. Свечу зажигают, закрывают крышку эксикатора. Пламя затухает по мере выгорания кислорода, и снижение его содержания достаточно для роста микроаэрофилов.

2. Химический способ удаления кислорода предполагает использование смесей химических веществ, например смесь пироголола и 10% NaOH.

3. Биологический – чашки Петри заливаются плотной питательной средой, После застывания узкую полоску среды убирают по диаметру чашки. На одну часть питательной среды засевают аэробы, на другую – анаэробы. Чашку плотно закрывают, а щели заливают парафином или воском.

3. Рост и размножение. Основные принципы культивирования.

Рост – синтез компонентов клетки и увеличение её размеров. Размножение – увеличение количества бактериальных клеток в популяции. Достигнув определённых размеров, микробная клетка начинает делиться. Делится простым поперечным делением. Процесс деления состоит из ряда этапов: сначала формируется в средней части клетки поперечная перегородка, которая состоит в начале из ЦПМ. Нити ДНК расплетаются и фиксируются на ЦПМ и мезосомах. По мере роста ЦПМ эти нити растягиваются и формируют 2 клетки. Каждая нить достраивает комплементарную. Скорость размножения

у разных микроорганизмов разная. Например, *E. coli* делится каждые 20-30 минут, но скорость деления микробной клетки в 100 раз больше, чем у соматической.

Общую закономерность роста и размножения бактериальных популяций принято изображать графически в виде кривой, которая отражает логарифм числа живых клеток от времени. На этой кривой 5 фаз:

1. Лаг-фаза или фаза покоя (lag - запаздывание) – в этот период роста и размножения не происходит, а происходит адаптация к окружающей среде, выработка нужного набора ферментов. В среднем длится 4-5 часов.

2. Логарифмическая фаза – фаза активного роста и размножения клеток. Размножение идет в геометрической прогрессии. Продолжительность фазы – 5-6 ч.

3. Стационарная фаза – количество вновь образующихся клеток равно количеству отмирающих. Длится около 2 часов.

4. Фаза отмирания развивается, так как истощается питательная среда, pH становится меньше 7, накапливаются продукты метаболизма.

5. Фаза сохранения популяции – в эту стадию у спорообразующих микроорганизмов происходит активное спорообразование, образуются покоящиеся формы бактерий.

4. Материальные основы наследственности.

Генетика (от греч.— происходящий от кого-то) — наука о законах и механизмах наследственности и изменчивости. Генетика бактерий имеет также и прикладной интерес, поскольку позволяет установить механизмы передачи патогенных свойств и возникновения устойчивости к лекарственным препаратам. Генетические исследования базируются на изучении бактерий, поскольку последних отличает относительная простота строения генома, позволяющая выявлять мутанты; гаплоидный набор генов, исключающий явление доминантности; половая дифференциация в виде донорских и реципиентных клеток; наличие обособленных и интегрированных фрагментов ДНК (плазиды, транспозоны); легкость культивирования и возможность получения популяций, содержащих большое количество микробных клеток.

Генетический материал бактерий представлен нуклеоидом. Нуклеоид— компартмент неправильной формы внутри клетки прокариот, в котором находится генетический материал. ДНК нуклеоида имеет замкнутую кольцевую форму. ДНК составляет примерно 60 % от массы нуклеоида, а также содержит РНК и белки. Последние два компонента представляют собой в основном матричную РНК и белки, регулирующие экспрессию генов бактериального генома. В состав нуклеоида входят также структурные белки, которые способствуют компактизации ДНК, то есть несут функцию, схожую с функцией гистонов в эукариотических клетках.

Поскольку ДНК содержит генетическую информацию клетки, удвоение хромосомы всегда предшествует делению клетки. Удвоение происходит по полуконсервативному механизму.

При этом родительская двойная спираль раскручивается, и на каждой полинуклеотидной цепи образуется новая комплементарная цепь. Таким образом, новая двойная спираль оказывается «гибридом» старой и вновь синтезированной цепей.

В этом процессе участвуют ДНК-полимеразы. Функция их проста: они связывают между собой нуклеотиды, расположившиеся путем спаривания оснований в правильном порядке, и таким образом синтезируют новую полинуклеотидную цепь.

Оказалось, однако, что синтез обеих новых цепей может идти не только в одном направлении, но и сразу в обе стороны от точки инициации. Такой механизм предполагает раскручивание двойной спирали сразу в двух местах - с образованием двух разветвлений репликационных вилок на одной молекуле ДНК.

В результате, в растущих бактериальных клетках количество нуклеоидов иногда достигает 2-4.

Размеры генома и число геномов. Величина генома у бактерий варьирует от вида к виду в пределах от 0,8 до $8 * 10^6$ пар оснований. Число текут. (Для сравнения приведем размеры геномов эукариот: у *Neurospora crassa* 19 106, у *Aspergillus niger* $40 * 10^6$, у человека $2,9 * 10^9$ и у *Zea mays* $7 * 10^9$ пар оснований.)

Многие бактерии наряду с хромосомной ДНК содержат и внекромосомную ДНК, тоже представленную двойными спиралями, замкнутыми в кольцо. Эти автономно реплицирующиеся элементы ДНК называют плазмидами

Плазмиды представляют собой замкнутые в кольцо двухцепочечные молекулы ДНК, несущие до 50 генов. Выделяют автономные и интегрированные плазмиды. Автономные существуют в цитоплазме бактерий и способны самостоятельно репродуцироваться. В клетке может содержаться несколько копий таких плазмид. Интегрированные (интегративные, эпизомы) плазмиды встроены в бактериальную хромосому, репродуцируются вместе с ней. Интеграция происходит при наличии гомологичных последовательностей ДНК, при которых возможна рекомбинация хромосомной и плазмидной ДНК.

Трансмиссивные (конъюгативные) плазмиды передаются при конъюгации, в отличие от нетрансмиссивных.

Регуляторные плазмиды участвуют в компенсировании дефектов метаболизма посредством встраивания в поврежденный геном и восстановления его функций.

Кодирующие плазмиды привносят в бактериальную клетку новую генетическую информацию, кодирующую новые, необычные свойства (например, устойчивость к антибиотикам).

В соответствии с определенными признаками, кодируемыми плазмидными генами, выделяют группы плазмид:

F-плазмиды контролируют синтез F-пилей, способствующих спариванию бактерий-доноров с бактериями-реципиентами. Сам термин «плазмиды» был предложен для обозначения «полового» фактора бактерий Джошуа Ледербергом в 1952 г. Такие плазмиды могут быть автономными или интегрированными.

R-плазмиды.

Факторы резистентности (R-факторы). Бактерии, устойчивые (резистентные) к некоторым антибиотикам, были впервые открыты в 50-е годы в Японии. Речь идет о штаммах возбудителя дизентерии *Shigella*, выделенных от больных, которых лечили антибиотиками. Характерно то, что бактерии обнаруживали множественную устойчивость и что эта устойчивость могла передаваться другим бактериям, таким как *Escherichia coli*. R-плазмиды несут две группы генов: 1) гены, ответственные за передачу плазмиды путем конъюгации (гены *tra*), они образуют так называемый «фактор переноса устойчивости» (RTF, resistance transfer factor); 2) гены, обусловливающие собственно резистентность (они составляют лишь небольшую часть плазмиды)

Бактериоцины. Многие бактерии синтезируют белки, убивающие родственные виды или штаммы или тормозящие их рост. Эти белки с весьма специфическим действием, **бактериоцины**, кодируются особыми плазмидами, **бактериоциногенными факторами**. Бактериоцины были выделены из *Escherichia coli* (колицины), *Pseudomonas aeruginosa* (пиоцины), *Bacillus megaterium* (мегацины) и других бактерий.

Такие плазмиды содержатся в количестве 1-2 копий на клетку, передаются при конъюгации, репликация связана с репликацией бактериальной хромосомы.

Неконъюгативные плазмиды имеют небольшие размеры, могут образовывать до 30 копий в клетке, что позволяет им проникать в дочерние клетки. Также могут передаваться с конъюгативными плазмидами.

Плазмиды патогенности кодируют вирулентные свойства многих микроорганизмов.

Скрытые плазмиды не содержат генов, позволяющих обнаружить их по фенотипическим проявлениям.

Плазмиды биодеградации кодируют ферменты, необходимые для деградации природных (мочевина) и неприродных (камфора, нафталин) соединений - источников углерода и энергии для некоторых видов бактерий.

Плазмиды, вероятно, играли очень важную роль в эволюции прокариот.

Несовместимость. Многие бактерии содержат плазмиды различной величины. Существование разных плазмид в одной бактериальной клетке говорит о том, что такие плазмиды совместимы между собой. Однако две родственные плазмиды не могут существовать в одной клетке - они несовместимы. Все плазмиды подразделяются на группы несовместимости: плазмиды, относящиеся к одной и той же группе, несовместимы друг с другом.

В составе бактериального генома (как в бактериальной хромосоме, так и в плазмidaх) также обнаруживают подвижные (мигрирующие) генетические элементы. К таким элементам относят вставочные последовательности и транспозоны.

Вставочные (инсерционные) последовательности, IS-элементы — это участки ДНК, способные как целое перемещаться из одного участка репликона в другой, а также между репликонами. Величина их не превышает 1500 п.о., самостоятельно не реплицируются и не кодируют распознаваемых фенотипических признаков. Они содержат лишь те гены, которые необходимы для их собственного перемещения — транспозиции: ген, кодирующий фермент транспозазу, обеспечивающую процесс исключения IS-элемента из ДНК и его интеграцию в новый локус, и ген, детерминирующий синтез репрессора, который регулирует весь процесс перемещения.

Отличительной особенностью IS-элементов является наличие на концах вставочной последовательности инвертированных повторов. Эти инвертированные повторы узнает фермент транспозаза. Транспозаза осуществляет одноцепочечные разрывы цепей ДНК, расположенных по обе стороны от подвижного элемента. Оригинальная копия IS-элемента остается на прежнем месте, а ее реплицированный дупликат перемещается на новый участок.

Перемещение подвижных генетических элементов принято называть ре-плактивной или незаконной рекомбинацией. Однако, в отличие от бактериальной хромосомы и плазмид, подвижные генетические элементы не являются самостоятельными репликонами, так как их репликация — составной элемент репликации ДНК репликона, в составе которого они находятся.

Транспозоны (Tn) представляют собой короткие двойные цепи ДНК, которые состоят из более чем 2000 пар оснований и обычно обусловливают устойчивость к одному антибиотику, в исключительных случаях - к нескольким. Транспозоны способны «перепрыгивать» из одного участка генома в другой, в частности из бактериальной хромосомы в плазмиду и обратно; таким образом, они могут включаться в различные участки генома. В случае внедрения транспозона в какой-либо структурный ген хромосомы нуклеотидная последовательность этого гена будет нарушена и генетическая информация не сможет транслироваться в функционально полноценный полипептид. Возникнет **инсерционный мутант**.

Поскольку транспозоны не способны к автономной репликации, для переноса их из одной бактериальной клетки в другую необходим так называемый вектор (пеоносчик). Векторами могут служить плазмиды или бактериофаги.

В некоторых ситуациях факторами изменчивости могут быть умеренные бактериофаги, поскольку они обладают способностью встраиваться в бактериальную хромосому (профаг) и выходить из нее, захватывая иногда и гены хромосомы клетки-хозяина. Профаг, помимо этого, способен придавать клетке-хозяину новые свойства.

Перемещаясь по репликону или между репликонами, подвижные генетические элементы вызывают:

1. Инактивацию генов тех участков ДНК, куда они, переместившись, встраиваются.

2. Образование повреждений генетического материала.
3. Слияние репликонов, т. е. встраивание плазмида в хромосому.
4. Распространение генов в популяции бактерий, что может приводить к изменению биологических свойств популяции, смене возбудителей инфекционных заболеваний, а также способствует эволюционным процессам среди микробов.

Помимо плазмид и подвижных генетических элементов, у бактерий существует еще одна система, способствующая распространению генов, - система интегронов.

Интегронами называют специфические генетические элементы, содержащие в своем составе интеграционный модуль — ген интегразы *intI*, правосторонний промотор и сайт интеграции *attI*. Благодаря модулю они способны захватывать, экспрессировать и перемещать генные кассеты. Последние представляют собой, как правило, беспромоторные гены устойчивости к антибиотикам, содержащие рекомбинационный сайт RHS (recombination hot spot). Такие гены обнаружены в плазмidaх многих клинических изолятов грамотрицательных бактерий. Интегроны могут располагаться как на хромосоме, так и на плазмиде. Возможно перемещение кассет с одного интегрона на другой в пределах одной бактериальной клетки и в популяции бактерий. Один интегрон может захватывать несколько кассет антибиотикорезистентности.

В геноме патогенных бактерий имеются участки ДНК протяженностью не менее 10000 п.о., которые отличаются от основного генома составом Г-Ц пар н.о. Эти участки ответственны за синтез факторов патогенности микроорганизмов, поэтому названы «островками патогенности». Острова патогенности по флангам обычно имеют прямые повторы последовательностей ДНК или IS-элементы. Большинство островов патогенности локализовано в хромосоме (*Salmonella*), но также они могут находиться в составе плазмид (*Shigella*) и фаговых ДНК (*V. cholerae* O1, 0139).

5. Фенотипическая изменчивость и генотипическая изменчивость (мутации и рекомбинации).

В основе изменчивости лежит либо изменение реакции генотипа на факторы окружающей среды, либо изменение самого генотипа в результате мутации генов или их рекомбинации. В связи с этим фенотипическую изменчивость подразделяют на наследственную и ненаследственную.

Ненаследственная (средовая, модификационная) изменчивость обусловлена влиянием внутри- и внеклеточных факторов на проявление генотипа. При устраниении фактора, вызвавшего модификацию, данные изменения исчезают.

Наследственная (генотипическая) изменчивость, связанная с мутациями, — мутационная изменчивость. Основу мутации составляют изменения последовательности нуклеотидов в ДНК, полная или частичная их потеря, т. е. происходит структурная перестройка генов, проявляющаяся фенотипически в виде измененного признака.

Изменения бактериального генома, а, следовательно, и свойств бактерий могут происходить в результате мутаций и рекомбинаций.

Термин **мутация** введен Де Фризом, изучавшим изменчивость и наследственность у растений и определившим мутацию как «скачкообразное изменение наследственного признака». Это понятие Бейеринк позднее распространил и на бактерии.

Мутация - изменение первичной структуры ДНК, проявляющееся наследственно закрепленной утратой или изменением какого-либо признака или группы признаков.

В популяции бактерий без всякого экспериментального вмешательства регулярно возникают мутации; такие мутации называют *спонтанными мутациями*, а клетки, в которых они возникли, - *спонтанными мутантами*.

Обрабатывая клетки мутагенными (вызывающими мутации) веществами, можно повысить частоту мутаций. В этом случае говорят об индукции мутаций, а полученные при этом клетки называют индуцированными мутантами. Мутагенами могут быть

химические, физические или биологические агенты. Механизм их действия будет пояснен на ряде примеров.

Типы мутаций. Как спонтанные, так и индуцированные мутации являются результатом нарушения нуклеотидной последовательности в ДНК. Они могут затрагивать либо только один ген (генные мутации), либо большее количество генов (хромосомные мутации).

Если изменения происходят в одном нуклеотиде, мутации называются точковыми. Точковые мутации по характеру изменений в ДНК можно разделить на транзиции, трансверсии, мутации со сдвигом рамки (вставка лишнего нуклеотида или выпадение - делеции).

Как указывалось выше, простые замены, или транзиции, заключаются в замещении одной пары пурин-пиrimидин на другую пару пурин-пиrimидин, т. е. происходит замещение АТ на ГЦ или ГЦ на АТ. Это значит, что пурин в одной из цепей замещается другим пурином, а пиrimидин в комплементарной цепи - другим пиrimидином.

При *трансверсиях* (перекрестные замены) пара пурин-пиrimидин замещается парой пиrimидин-пурин. Трансверсии, как и транзиции, часто возникают спонтанно.

Мутации со сдвигом рамки, обусловленные вставкой или выпадением нуклеотида, нарушают нормальную последовательность «считывания» нуклеотидных триплетов. В процессе репликации ДНК в новообразованную комплементарную цепь «напротив» вставленного нуклеотида также включается лишний нуклеотид. При последующей репликации продолжают синтезироваться цепи с лишним основанием.

Делеции относятся также к мутациям со сдвигом рамки, но в отличие от последних обусловлены выпадением одного основания. Делеции могут возникать в результате гидролитического отщепления пуринового основания (например, при повышении температуры), а также под действием алкилирующих или дезаминирующих веществ, которые приводят к образованию азотистых оснований, неспособных к комплементарному спариванию.

На жизнеспособности клетки точковые мутации сказываются по-разному. Транзиции и трансверсии - сравнительно «мягкие» мутации, поскольку в худшем случае обусловливают замену только одной аминокислоты в соответствующей полипептидной цепи (а иногда в силу вырожденности генетического кода вообще не происходит аминокислотной замены). Дефектный белок с одной замененной аминокислотой функционально не отличается от нормального белка.

В этом случае говорят о «молчащих» мутациях (не вызывают изменения аминокислотной последовательности белка), также различают миссенс-мутации - появление в полипептиде новой аминокислоты, нонсенс-мутации - образование кодонов-терминаторов, вызывающих преждевременное прекращение синтеза полипептидной цепи.

Теоретически, мутации могли бы привести к вымиранию бактериальной популяции. Этого не происходит, поскольку в клетке существуют механизмы, обеспечивающие полное или частичное восстановление исходной структуры ДНК. Совокупность ферментов, катализирующих коррекцию повреждений ДНК, объединяют в системы репарации.

Длительное время считалось, что изменчивость бактерий обусловлена только мутациями. Однако в 40х гг 20 века было установлено, что бактерии способны обмениваться генетическим материалом между собой, давая начало потомству с новыми свойствами. Взаимодействие между двумя ДНК, обладающими различными генотипами, которое приводит к образованию рекомбинантной ДНК, сочетающей гены обоих родителей, получило название генетической рекомбинации.

Особенность рекомбинации бактерий в том, что у них гаплоидный набор генов, отсутствует половое размножение. В процессе рекомбинации бактерии условно делятся на клетки-доноры, которые передают генетический материал, и клетки-реципиенты, которые его воспринимают.

В настоящее время известны по меньшей мере три разных механизма рекомбинации попавшей в бактериальную клетку чужеродной ДНК с бактериальной хромосомой (или с плазмидой) *in vivo*: 1) общая гомологичная рекомбинация, 2) сайт-специфическая рекомбинация и 3) негомологичная рекомбинация.

Общая гомологичная рекомбинация. В этом случае поступившая извне ДНК рекомбинируется с клеточной ДНК путем реципрокного обмена соответствующими участками. Если не считать различий, обусловленных мутациями, партнеры по рекомбинации должны иметь одинаковую нуклеотидную последовательность, т. е. быть максимально гомологичными. Гомологичная рекомбинация находится под контролем гена *ges A*; мутанты с дефектом этого гена (*ges⁻*) не способны к гомологичной рекомбинации.

Сайт-специфическая рекомбинация. Этот процесс осуществляется независимо от гомологичной рекомбинации, т.е. возможен и у мутантов *ges⁻*. Он состоит в том, что короткая двухцепочечная ДНК встраивается в определенном месте в длинную двойную спираль; при этом меньший партнер теряет свою автономность. Типичным примером сайт-специфической рекомбинации может служить интеграция бактериофага

Негомологичная рекомбинация. Рекомбинационные процессы, в которых участвуют сегменты ДНК, не обнаруживающие заметной генетической гомологии, называют негомологичной рекомбинацией. Так же как и сайт-специфическая рекомбинация, она представляет собой интеграционную форму рекомбинации, т.е. не обмен, а соединение ДНК.

Передача генетического материала от клетки-донора к клетке-реципиенту может осуществляться с помощью конъюгации, трансформации и трансдукции.

Конъюгация бактерий состоит в переходе генетического материала (ДНК) из клетки-донора («мужской») в клетку-реципиент («женскую») при контакте клеток между собой.

«Мужская» клетка содержит F-фактор, или половой фактор, который контролирует синтез так называемых половых пилей, или F-пилей. Клетки, не содержащие F-фактора, являются «женскими»; при получении F-фактора они превращаются в «мужские» и сами становятся донорами. F-фактор располагается в цитоплазме в виде кольцевой двунитчатой молекулы ДНК, т. е. является плазмидой. Молекула F-фактора значительно меньше хромосомы и содержит гены, контролирующие процесс конъюгации, в том числе синтез F-пилей. При конъюгации F-пили соединяют «мужскую» и «женскую» клетки, обеспечивая переход ДНК через конъюгационный мостик или F-пили. Клетки, содержащие F-фактор в цитоплазме, обозначаются F^+ ; они передают F-фактор клеткам, обозначаемым F^- («женским»), не утрачивая донорской способности, так как оставляют копии F-фактора. Если F-фактор включается в хромосому, то бактерии приобретают способность передавать фрагменты хромосомной ДНК и называются Hfr-клетками (от англ. *high frequency of recombination* — высокая частота рекомбинаций), т.е. бактериями с высокой частотой рекомбинаций. При конъюгации клеток Hfr и клеток F^- хромосома разрывается и передается с определенного участка (начальной точки) в клетку F^- , продолжая реплицироваться. Перенос всей хромосомы может длиться до 100 мин.

Переносимая ДНК взаимодействует с ДНК реципиента — происходит гомологичная рекомбинация. Прерывая процесс конъюгации бактерий, можно определять последовательность расположения генов в хромосоме. Иногда F-фактор может при выходе из хромосомы захватывать небольшую ее часть, образуя так называемый замещенный фактор — F' .

При конъюгации происходит только частичный перенос генетического материала, поэтому ее не следует отождествлять полностью с половым процессом у других организмов.

Трансдукция — передача ДНК от бактерии-донора к бактерии-реципиенту при участии бактериофага. Различают неспецифическую (общую) трансдукцию, при которой возможен перенос любого фрагмента ДНК донора, и специфическую — перенос

определенного фрагмента ДНК донора только в определенные участки ДНК реципиента. Неспецифическая трансдукция обусловлена включением ДНК донора в головку фага дополнительно к геному фага или вместо генома фага (дефектные фаги). Специфическая трансдукция обусловлена замещением некоторых генов фага генами хромосомы клетки-донора. Фаговая ДНК, несущая фрагменты хромосомы клетки-донора, включается в строго определенные участки хромосомы клетки-реципиента. Таким образом, привносятся новые гены, и ДНК фага в виде профага репродуцируется вместе с хромосомой, т.е. этот процесс сопровождается лизогенией. Если фрагмент ДНК, переносимый фагом, не вступает в рекомбинацию с хромосомой реципиента и не реплицируется, но с него считывается информация о синтезе соответствующего продукта, такая трансдукция называется abortивной.

Трансформация заключается в том, что ДНК, выделенная из бактерий в свободной растворимой форме, передается бактерии-реципиенту. Впервые явление трансформации описал Ф. Гриффит (1928). Он вводил мышам живой невирулентный бескапсульный R-штамм пневмококка и одновременно убитый вирулентный капсульный S-штамм пневмококка. Из крови погибших мышей был выделен вирулентный пневмококк, имеющий капсулу убитого S-штамма пневмококка. Таким образом, убитый S-штамм пневмококка передал наследственную способность капсулобразования R-штамму пневмококка. О. Эвери, К. Мак-Леод и М. Мак-Карти (1944) доказали, что трансформирующим агентом в этом случае является ДНК. Путем трансформации могут быть перенесены различные признаки: капсулобразование, устойчивость к антибиотикам, синтез ферментов.

Трансформирующей активностью обладает лишь высокомолекулярная ($M \geq 10^5$) двухцепочечная ДНК, хотя в геноме реципиента включается только одна цепь, а другая разрушается ДНК-азой реципиентной клетки.

Оптимальное физиологическое состояние клеток, в котором они способны к поглощению чужеродной ДНК, называется компетентностью. Компетентность обусловлена появлением на поверхности клетки особого антигена - фактора компетентности, который является низкомолекулярным белком и играет роль специфического ДНК-связывающего рецептора. Инициируют компетентность три белка: автолизин, ДНК-связывающий белок и эндонуклеаза I. В период развития компетентности происходят изменения структуры клеточной стенки, в результате чего стенка становится более пористой и проницаемой для ДНК.

Процесс трансформации разделяют на несколько стадий: 1) присоединение ДНК к поверхностным рецепторам реципиентной клетки; 2) проникновение ДНК в клетку; 3) превращение проникшей двухцепочечной ДНК в одноцепочечную; 4) рекомбинация проникшей ДНК с ДНК реципиента; 5) фенотипическое выражение поглощенного гена (или генов). На первой стадии трансформирующая Знания о генетике микроорганизмов применяются для обнаружения микробы в исследуемом материале без выделения чистой культуры, так и для определения таксономического положения, внутривидовой идентификации.

1. 4 Лекция №4 (2 часа).

Тема: «Действие биологических факторов на микроорганизмы»

1.4.1 Вопросы лекции:

1. Антибиотики
2. Бактериофаги
3. Бактериоцины

1.4.2 Краткое содержание вопросов:

1. Антибиотики.

В настоящее время антибиотиками считают химические вещества биологического происхождения (природные), а также их полусинтетические производные и синтетические аналоги, которые избирательно тормозят рост и размножение или губительно действуют на микроорганизмы и опухоли.

Антибиотики классифицируют по способу получения, по происхождению, по химической структуре, по механизму антимикробного действия.

По способу получения выделяют

- биосинтетические антибиотики (природные). В условиях специальных производств культивируют микроорганизмы-продуценты, которые выделяют антибиотики в процессе жизнедеятельности.

- полусинтетические антибиотики. Получают путем биосинтеза с последующей химической модификацией (например присоединение радикалов). В результате улучшаются антимикробные и фармакологические свойства препарата.

- синтетические антибиотики (аналоги природных). Имеют структуру природных, но синтезированы химически.

По происхождению среди природных антибиотиков выделяют растительные (фитонциды), животной природы, микробные (синтезируемые грибами, актиномицетами (80% антибиотиков), бактериями). Первые две группы природных антибиотиков не получили широкого применения в медицине.

Антибиотики оказывают на микробные клетки воздействия, результатом которых может явиться бактерицидный, бактериостатический, бактериолитический, либо антибиотикозависимый эффект.

По химической структуре выделяют:

- β -Лактамы (пенициллины, цефалоспорины, монобактамы, карбапенемы);
- Гликопептиды;
- Липопептиды;
- Аминогликозиды;
- Тетрациклины;
- Макролиды;
- Линкозамиды;
- Стрептограмины;
- Хлорамфеникол/левомицетин;
- Рифамицины;
- Полипептиды;
- Полиены.

- β -Лактамы. К данной группе относятся антибиотики, характерной чертой которых является наличие β -лактамного кольца, при разрушении которого препараты теряют свою активность.

Пенициллин Цефалоспорины природный в основе содержит молекулу 6-аминопенициллановой кислоты, которая состоит из двух колец – тиазолидонового и бета-лактамного. Препарат - бензилпенициллин и его соли. Активен в отношении грамположительных микроорганизмов. Быстро выводится из организма, разрушается под действием желудочного сока, инактивируется пенициллиназами.

Полусинтетические получают при присоединении к БАПК радикалов.

обладают бактерицидным действием, низкой токсичностью, с широким спектром действия (более активны в отношении грамотрицательных микроорганизмов). Получены на основе 7-аминоцефалоспориновой кислоты и содержащие цефемовое (также бета-лактамное) кольцо. По последовательности внедрения различают 4 поколения препаратов, которые отличаются по спектру активности, устойчивости к β -лактамазам, фармакологическим свойствам. Препараты разных поколений не заменяют друг друга, а дополняют.

Гликопептиды (ванкомицин, тейкопланин) препараты этой группы в своей молекуле содержат замещенные пептидные соединения. Активны в отношении грамположительных бактерий. Используют при лечении тяжелых инфекций.

Аминогликозиды (стрептомицин, канамицин, гентамицин, тобрамицин) - соединения, в молекулу которых входят аминосахара, соединенные гликозидной связью с остальной частью (агликоновым фрагментом) молекулы. Обладают бактерицидной активностью в отношении грамотрицательных аэробных бактерий, стафилококков, некоторых простейших.

Тетрациклины – семейство крупномолекулярных препаратов, имеющих в составе четыре циклических соединения основу молекулы составляет полифункциональное гидроафтаценовое соединение с родовым название тетрациклин. Тип действия – статический. Спектр действия широкий, в отношении многих грамположительных и грамотрицательных бактерий, внутриклеточных паразитов. Полусинтетический препарат – доксициклин.

Новые препараты полусинтетические – глицилциклины (тигекциклин). Широкий спектр, более прочная связь с рибосомами.

Макролиды – семейство макроциклических молекул содержат в своей молекуле макроциклическое лактоновое кольцо, связанное с одним или несколькими углеводными остатками. (эритромицин, кларитромицин, азитромицин). Широкий спектр действия, бактериостатический эффект.

По механизму действия среди антибиотиков выделяют:

1. Ингибиторы синтеза клеточной стенки (муреина):

– *Бета-лактамные антибиотики* (пенициллины, цефалоспорины, монобактамы и карбопенемы).

Блокируют образование гетерополимерных цепей на внешней поверхности ЦПМ за счет ингибирования пенициллин-связывающих белков (белков-ферментов – транспептидаз), участвующих в образовании поперечных швивок. Ингибирование ПСБ приводит к накоплению в бактериальной клетке предшественников ПГ и запуску системы аутолиза. В результате действия аутолитических ферментов и увеличения осмотического давления цитоплазмы происходит бактериолизис.

– *Гликопептиды* (ванкомицин, клиндамицин).

Блокируют объединение предшественников пептидогликана в гликопептидные цепи, связывая D-аланин. Поскольку пептидогликана нет в стенках животных клеток, то эти антибиотики обладают очень низкой токсичностью для макроорганизма, и их можно применять в высоких дозах (*мегатерапия*);

– Липопептиды формируют каналы в КС при необратимом соединении гидрофобной части молекулы липопептида с клеточной мембраной грамположительных бактерий. В результате происходит деполяризация клеточной мембранны из-за выхода калия, что приводит к гибели бактериальной клетки.

2. Вызывающие повреждение цитоплазматической мембранны

Полиеновые антибиотики обладают ярко выраженной противогрибковой активностью, изменяя проницаемость клеточной мембранны путем взаимодействия (блокирования) со стероидными компонентами, входящими в ее состав именно у грибов, а не бактерий;

Полипептидные антибиотики лизируют фосфолипидные компоненты ЦПМ. Только местное применение.

3. Подавляющие белковый синтез

— нарушение синтеза белка может происходить на всех уровнях, начиная с процесса считывания информации с ДНК и кончая взаимодействием с рибосомами – (аминогликозиды), с 50S субъединицами рибосом (макролиды) или с информационной и РНК (на 30S субъединице рибосом – тетрациклины). Эта группа антибиотиков – самая многочисленная, в нее входят

4. Ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот — эти антибиотики обладают не только антимикробной, но и цитостатической активностью, и поэтому используются как противоопухолевые средства. Один из антибиотиков относящихся к этой группе — рифампицин, ингибирует ДНК-зависимую РНК-полимеразу, и тем самым блокирует синтез белка на уровне транскрипции (блокирует синтез мРНК).

Хинолоны оказывают бактерицидный эффект. Ингибируя два жизненно важных фермента микробной клетки - ДНК-гиразу и топоизомеразу IV, нарушают синтез ДНК.

Все основные осложнения при химиотерапии можно разделить на 2 группы:

- осложнения терапии со стороны микроорганизма;
- осложнения со стороны макроорганизма:

– *аллергические реакции* Наличие аллергической реакции на один из препаратов той или иной группы, является абсолютным противопоказанием для использования и других препаратов этой группы, так как возможна перекрестная гиперчувствительность;

– *прямое токсическое (органотоксическое) действие химиопрепаратов* – так, противоопухолевые антибиотики обладают гемато-, гепато- и кардиотоксичностью, а все аминогликозиды – ототоксичностью и нефротоксичностью.

– *побочное токсическое (органотропные) эффекты* — эти осложнения связаны не с прямым, а опосредованным действием химиопрепаратов на различные системы макроорганизма. Хлорамфеникол (левомицетин) может подавлять синтез белков не только в микробной клетке, но и в клетках костного мозга, вызывая у части больных развитие стойкой лейкопении

– оценивая влияние антибиотиков на *функциональную активность иммунной системы*, следует помнить, что все антимикробные агенты снижают напряженность иммунитета. Однако, ряд бета-лактамных антибиотиков, например, цефалоспорин 4-го поколения – цефпиром, а также макролиды, фторхинолоны усиливают фагоцитарную активность нейтрофилов и макрофагов, а цефтазидим при системном применении и биопарокс – при местном – обладают истинной иммуностимулирующей активностью.

– *реакции обострения* — применение бактерицидных антибиотиков в первые дни заболевания при общем тяжелом состоянии больного нередко приводит к резкому ухудшению его состояния. Вплоть до развития *инфекционно-токсического шока*. В основе этого явления лежит массовая гибель возбудителей, сопровождающаяся освобождением большого количества эндотоксина и других токсических продуктов распада бактериальных клеток. Такие выраженные реакции обострения чаще развиваются у детей, так как процессы детоксикации у них развиты слабее, чем у взрослых;

– *развитие дисбактериоза* — нарушения качественного и количественного состава нормальной микрофлоры – также одно из частых осложнений химиотерапии. Оно чаще возникает на фоне использования антибиотиков широкого спектра действия. Одним из наиболее тяжелых клинических проявлений дисбиоза является кандидоз полости рта, гениталий или кишечника.

1. Осложнение химиотерапии со стороны микроорганизмов

Осложнение химиотерапии со стороны микроорганизмов проявляется развитием лекарственной устойчивости.

В настоящее время лекарственная устойчивость *микроорганизмов-возбудителей* различных заболеваний – не только чисто микробиологическая, но и огромная государственная проблема (например, смертность детей от *стафилококкового сепсиса* находится в настоящее время примерно на том же высоком уровне, что и до появления антибиотиков). Это связано с тем, что среди стафилококков – возбудителей различных гнойно-воспалительных заболеваний, – довольно часто выделяются штаммы, одновременно устойчивые ко многим препаратам (5–10 и более). Среди *микроорганизмов-возбудителей* острых кишечных инфекций до 80 % выделяемых возбудителей дизентерии устойчивы ко многим используемым антибиотикам.

В основе развития лекарственной устойчивости к антибиотикам и другим химиотерапевтическим препаратам лежат мутации хромосомных генов или приобретение плазмид лекарственной устойчивости. Прежде всего, необходимо отметить, что существуют роды и семейства микроорганизмов, природно-устойчивые к отдельным антибиотикам; в их геноме есть гены, контролирующие этот признак. Полирезистентны к антибиотикам и многие представители псевдомонад, неклостридиальных анаэробов и другие микроорганизмы. Такие бактерии являются природными банками (хранилищами) генов лекарственной устойчивости.

Плазмидная устойчивость приобретается микробными клетками в результате процессов генетического обмена. Сравнительно высокая частота передачи R-плазмид обеспечивает широкое и достаточно быстрое распространение устойчивых бактерий в популяции. Плазмидная устойчивость может быть множественной, т. е. к нескольким лекарственным препаратам, и при этом достигать достаточно высокого уровня.

Биохимическую основу резистентности обеспечивают разные механизмы:

- энзиматическая инактивация антибиотиков – этот процесс осуществляется с помощью синтезируемых бактериями ферментов, разрушающих активную часть антибиотиков.
- изменение проницаемости клеточной стенки для антибиотика или подавление его транспорта в бактериальные клетки. Этот механизм лежит в основе устойчивости к тетрациклину;
- изменение структуры компонентов микробной клетки, например, изменение структуры бактериальных рибосом сопровождается повышением устойчивости к аминогликозидам и макролидам, а изменение структуры РНК-синтетаз – к рифампицину.

У бактерий одного и того же вида могут реализовываться несколько механизмов резистентности.

2. Борьба с лекарственной устойчивостью

Для борьбы с лекарственной устойчивостью, т. е. преодоления резистентности микроорганизмов к химиопрепаратам, существует несколько путей:

- создание новых химиотерапевтических средств, отличающихся механизмом антимикробного действия (например, созданная в последнее время группа химиопрепаратов – фторхинолоны) и мишениями,
- постоянная ротация (замена) используемых в данном лечебном учреждении или на определенной территории химиопрепаратов (антибиотиков),
- комбинированное применение бета-лактамных антибиотиков в комбинации с ингибиторами бета-лактамаз (claveулановая кислота, сульбактам, тазобактам),
- и главное – соблюдение принципов рациональной химиотерапии.

Выбор препарата для химиотерапии должен основываться на показателях антибиотикочувствительности соответствующих микроорганизмов – наиболее вероятных возбудителей данной нозологической формы заболевания по данным литературы, или при ориентации на данные о региональной чувствительности тех или иных инфекционных агентов-возбудителей данного заболевания.

2. Бактериофаги.

Бактериофаги (*фаги*) (от др.-греч. φάγω — «пожираю») — вирусы, избирательно поражающие бактериальные клетки.

Был открыт в 1915 году английским бактериологом Фредериком Туортом, который описал способность фильтрата стафилококков растворять свежую культуру этих же бактерий. Канадский микробиолог Феликс Д'Эрель в 1917 году выдвинул предположение, что бактериофаги имеют корпскулярную природу, выделив фильтрующийся литический агент из испражнений больных дизентерией. Добавление литического агента к культуре в бульоне и на плотной питательной среде приводило к лизису. Д'Эрель предположил, что это вирус и назвал его бактериофагом – пожирателем бактерий.

Бактериофаги широко распространены в природе, выявлены у большинства бактерий. В настоящее время обнаружены вирусы грибов, поэтому в широком смысле слова бактериофаги часто называют просто фагами.

БФ состоят из ДНК или РНК и белковой оболочки – капсида. Могут иметь нитевидную форму, икосаэдрический капсид (головка фага), сложную форму сперматозоида (головка и хвостовой отросток). Некоторые фаги в хвостовой части содержат лизоцим.

По результату взаимодействия с бактериальной клеткой выделяют вирулентные и умеренные бактериофаги.

Вирулентные бактериофаги взаимодействуют с бактерией по продуктивному типу. Проникнув в бактерию, они репродуцируются с образованием 200-300 новых фаговых частиц и вызывают лизис бактерий.

Вирулентные бактериофаги имеют следующий жизненный цикл:

1. Фаг приближается к бактерии, и хвостовые нити связываются с рецепторными участками на поверхности бактериальной клетки.

2. Хвостовые нити изгибаются и «заякоривают» шипы и базальную пластинку на поверхности клетки; хвостовой чехол сокращается, заставляя полый стержень входить в клетку; этому способствует фермент лизоцим, который находится в базальной пластинке; таким образом, нуклеиновая кислота фага вводится внутрь клетки.

3. Нуклеиновая кислота фага направляет синтез ферментов фага, используя для этого белоксинтезирующий аппарат бактерии.

4. Фаг тем или иным способом инактивирует ДНК и РНК хозяина, а ферменты фага совсем расщепляют её; РНК фага «подчиняет» себе клеточный аппарат синтеза белка.

5. Нуклеиновая кислота фага реплицируется, и направляет синтез новых белков оболочки.

6. Образуются новые частицы фага в результате спонтанной самосборки белковой оболочки вокруг фаговой нуклеиновой кислоты; под контролем РНК фага синтезируется лизоцим.

7. Лизис клетки: клетка лопается под воздействием лизоцима; высвобождается около 200–1000 новых фагов; фаги инфицируют другие бактерии.

Стадии 1–7 по времени занимают около 30 минут; этот период называется латентным периодом.

Умеренные бактериофаги могут взаимодействовать с бактерией по интегративному типу. В данном случае ДНК умеренного фага встраивается в хромосому бактерии, не вызывая ее лизиса. ДНК бактериофага, встроенная в хромосому бактерии называется профагом, а культура бактерий, содержащих профаг – лизогенной. Само же явление существования бактерии и умеренного бактериофага носит название лизогении. Профаг, ставший частью хромосомы передается по наследству от клетки к клетке неограниченному числу потомков. Спонтанно или направленно профаги могут переходить в вегетативное состояние и лизировать клетку хозяина. Феномен воздействия, приводящий к инактивации репрессора, называется индукцией профага. Геном профага может придавать бактерии новые свойства (фаговая конверсия).

Бактериофаги используют в лабораторной диагностике при внутривидовой идентификации бактерий, при обнаружении микроорганизма в исследуемом материале, для лечения и профилактики ряда заболеваний, чаще всего кишечных. У таких лекарственных препаратов отсутствует побочный эффект, но и терапевтический эффект умеренный. В генетической инженерии бактериофаги используются в качестве векторов для получения рекомбинантных ДНК.

3. Бактериоцины.

Бактериоцины – антибактериальные вещества белковой природы, вырабатываемые бактериями и подавляющие жизнедеятельность других штаммов того же вида или

родственных видов. Бактериоцины обозначаются в соответствии с видовым или родовым латинским названием продуцента. Спектр активности бактериоцинов в отличие от антибиотиков узок и определяется наличием у бактерий специальных рецепторов для адсорбции.

Молочнокислые бактерии образуют широкий спектр бактериоцинов: курвацин, диацетин, лактококцин, ацидоцин, лактоцин, плантацин, плантарицин и др. (табл. 1). Бактериоцины из молочнокислых бактерий разделяют на две группы. Представители первой группы характеризуются узким спектром антбиактериального действия - вызывают гибель организмов, близких к организму-продуценту. В эту группу входят лактоцин В и F-27, амиловорин, педиоцин N5P, термофилин А, курвацин А, амиловорин L471, энтерококцин.

Бактериоцины, относящиеся ко второй группе, ингибируют рост многих видов грамположительных микроорганизмов, в том числе *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium sporogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pediococcus acidilactici*, *Bacillus spp.*, *Enterococcus faecalis*. Перечисленные бактерии вызывают порчу пищевых продуктов, среди них есть и патогенные виды. Показано, что большая часть этих бактериоцинов не токсична и не иммуногенна.

Перспективно применение ряда бактериоцинов, продуцируемых группой молочнокислых бактерий, в пищевой промышленности. Продуценты этих бактериоцинов используются в качестве заквасочной культуры при различных пищевых производствах. Образующийся бактериоцин обеспечивает доминирование нужной микрофлоры и подавление посторонней микрофлоры, что обеспечивает безопасное протекание микробиологических процессов.

Например, при производстве сухой колбасы в качестве заквасочной культуры используется *Lactobacillus curvatus*, образующий курвацин, который ингибирует рост близкородственных лактобацилл и условно-патогенных бактерий и обеспечивает этим безопасное протекание биохимических процессов при созревании сухой колбасы. Бактериоцины осуществляют естественное предохранение пищевых продуктов, в том числе полученных путем ферментации.

Продуцирующие бактериоцины штаммы микроорганизмов, в частности молочнокислые бактерии, или сами бактериоцины могут быть использованы как природные консерванты пищевых продуктов. Задача состоит в том, чтобы оптимизировать производство бактериоцинов бактериями, повысить активность и стабильность этих соединений, направленно получать бактериоцины с заданными свойствами. Однако появление и селекция вариантов бактерий, устойчивых к бактериоцинам, осложняет использование этих веществ в качестве пищевых консервантов.

Большое количество разнообразных по свойствам бактериоцинов образуется представителями семейства энтеробактерий. Это многочисленная группа грамотрицательных бактерий, факультативных анаэробов, использующих для своего развития разнообразные органические соединения.

Среди бактериоцинов, образуемых энтеробактериями, наиболее полно изучены колицины из *E.coli*, клоацины из *Enterobacter cloacae*; наряду с колицинами выделены альвецины из *Hafnia alvei*, аэроцины из *Aerobacter aerogenes*, марцесцины из *Serratia marcescens*.

Однако применение в настоящее время в медицине колицинов и других бактериоцинов из грамотрицательных бактерий невозможно из-за ряда их отрицательных свойств - быстрой инактивации протеазами, иммуногенности, обусловленной белковым компонентом.

Предполагают, что механизм биологического действия ряда бактериоцинов связан с нарушением проницаемости цитоплазматических мембран.

В настоящее время с применением методов генной инженерии проводятся исследования, направленные на получение штаммов-продуцентов бактериоцинов с заданными свойствами.

В естественных условиях бактериоциногеня может быть одним из факторов, влияющих на формирование микробного ценоза. Поэтому большой интерес представляет выяснение значения этого явления для развития популяции. У бактериоциногенных популяций суммарная защитная активность проявляется в подавлении развития других бактерий, обладающих сходными пищевыми потребностями (родственные виды микроорганизмов). Это подавление обеспечивается бактериоцином, который продуцируют отдельные клетки этой популяции. Эти клетки погибают, но остальные клетки популяции не чувствительны к бактериоцину, который вытесняет другие микроорганизмы, чувствительные к данному веществу. Таким образом, бактериоциногенные бактерии обладают важным селективным преимуществом в условиях микробных ассоциаций, естественно складывающихся в процессе эволюции.

Штаммы – продуценты бактериоцинов, а также сами бактериоцины широко применяются в качестве компонента пробиотических и синбиотических препаратов, в пищевой промышленности могут использоваться в качестве заквасочных культур, подавляя рост патогенных микроорганизмов и обеспечивая созревание молочнокислых и мясных продуктов, а в последующем – их хранение.

1. 5 Лекция №5 (2 часа).

Тема: «Учение об инфекции»

1.5.1 Вопросы лекции:

1. Понятие инфекции, инфекционного процесса, болезни.
2. Свойства возбудителя, способствующие возникновению инфекционной болезни.
- Патогенность и вирулентность.
3. Виды инфекции.

1.5.2 Краткое содержание вопросов:

1. Понятие инфекции, инфекционного процесса, болезни.

Среди многочисленных заболеваний, которым подвержены человек и животные, инфекционные болезни занимают особое место, так как появление их обязано встрече с болезнетворными микробами. На современном этапе развития науки под инфекцией понимают взаимодействие патогенного микроорганизма и восприимчивого хозяина в определённых условиях внешней среды.

Состояние инфекции, как всякого биологического процесса, динамично. Динамику реакций взаимодействия между микро- и макроорганизмами называют инфекционным процессом.

Инфекционный процесс, с одной стороны, включает внедрение, размножение и распространение патогенного микробы в организме, а с другой — реакцию организма на это действие. Эти реакции выражаются в биохимических, морфологических, функциональных и иммунологических изменениях, направленных на сохранение постоянства внутренней среды организма.

Крайней степенью проявления инфекционного процесса является инфекционная болезнь, которая обусловлена патологическими процессами, вызванными действием возбудителя и характеризуется определенной клинической картиной.

Инфекционная болезнь имеет ряд особенностей, отличающих ее от болезней неинфекционного характера

1. Инфекционная болезнь вызывается определенным специфическим возбудителем.

2. Заболевший организм сам становится источником возбудителя инфекции, который выделяется из больного организма и заражает здоровых животных, т.е. инфекционной болезни присуща заразность, микробоносительство.

3. В больном организме происходят процессы образования специфических антител, в результате этого организм после выздоровления становится в большинстве случаев иммунным, т.е. невосприимчивым к повторному заражению тем же возбудителем.

Для возникновения инфекционной болезни требуется несколько условий:

1. микроб должен быть достаточно вирулентным;
2. необходимо внедрение определенного количества микробов;
3. они должны проникнуть в организм через наиболее благоприятные для них ворота инфекции и достичь восприимчивых тканей. Место проникновения патогенных микробов в организм называется входными воротами инфекции;
4. организм хозяина, должен быть восприимчив к данному возбудителю болезни;
5. необходимы определенные условия среды, при которых происходит взаимодействие между микробом и организмом.

Инфекционный процесс характеризуется цикличным развитием и включает в себя следующие периоды: инкубационный, продромальный, клинический (разгар болезни), исход болезни

Инкубационный период — определенный промежуток времени от момента проникновения микробы до появления первых признаков болезни. В этот период возбудитель адгезируется на чувствительные клетки организма в месте входных ворот (например, верхние дыхательные пути, слизистая ЖКТ и т.д.). При разных инфекционных болезнях он неодинаков: от нескольких дней, месяцев до нескольких лет.

Продромальный период (период предвестников болезни) характеризуется первыми, не всегда специфическими для данной болезни, симптомами: повышением температуры тела, слабостью, угнетением, потерей аппетита. В этот период возбудитель колонизирует чувствительные клетки, происходит расселение микроорганизмов в биотопе хозяина. Продолжительность периода — от нескольких часов до 4 суток.

Период развития основных клинических признаков (период разгара болезни), когда проявляются основные характерные для данной инфекционной болезни признаки (при язве — афты, при бешенстве — параличи, при ботулизме — расслабление мышц), угнетение, высокая температура, нарушение дыхания, пищеварения и др. В этот период возбудитель интенсивно размножается в организме хозяина. В этот период больной заразен, так как возбудитель выделяется во внешнюю среду.

Исход болезни. После прекращения размножения возбудителя и по мере его выведения наступает период реконвалесценции (выздоровления), когда постепенно восстанавливаются физиологические функции организма. Клиническое выздоровление при многих инфекционных болезнях не совпадает по времени с освобождением организма от возбудителя. В некоторых случаях возможно формирование бактерионосительства с длительным пребыванием возбудителя в организме хозяина, перенесшего инфекцию (сальмонеллез, пастереллез, туберкулез и др.). Эти животные представляют опасность как источник возбудителя инфекции. При неблагоприятном исходе животное может погибнуть.

2. Свойства возбудителя, способствующие возникновению инфекционной болезни. Патогенность и вирулентность.

Возбудитель как участник инфекционного процесса характеризуется двумя основными качествами: патогенностью и вирулентностью. Потенциальную способность микроорганизма паразитировать в организме животных и вызывать инфекцию (инфекционный процесс) называют патогенностью, болезнетворностью.

Патогенность — качественная характеристика вида, определяемая его генотипом, это потенциальная способность возбудителя вызывать инфекционный процесс. Факторы

патогенности связаны со структурными элементами микробной клетки, ее метаболизмом. Они позволяют патогенному микроорганизму не только проникнуть и сохраниться, но и размножаться, распространяться в тканях и органах животного, активно воздействовать на его функции.

Каждый вид болезнетворных микробов характеризуется специфическим набором факторов патогенности. Этот набор определяет характер патогенного действия, т.е. способность вызывать определенный инфекционный процесс. Например, ящуром болеют парнокопытные, а сапом – однокопытные, кошачьи; инфекционной анемией – лошади, чумой свиней – свиньи. Однако в пределах вида патогенность микроорганизмов может колебаться.

Степень патогенности, индивидуальная особенность каждого варианта и штамма микроорганизмов называется вирулентностью. Вирулентность – это индивидуальный, штаммовый признак: степень реализации патогенности вида каждым конкретным штаммом по отношению к конкретному хозяину.

Степень вирулентности конкретного штамма патогенного вида микроорганизма можно оценивать по:

- а) клиническому течению инфекционного процесса;
- б) на модели *in vivo* – путём воспроизведения экспериментальной инфекции на животных;
- в) на модели *in vitro* – путём качественного и количественного изучения факторов вирулентности конкретного штамма.

На модели экспериментальной инфекции проводят количественную оценку вирулентности штамма, используя условно-принятые единицы измерения вирулентности: LD₅₀, т.е. количеством микроорганизмов или микрограммов токсина, вызывающим гибель 50% подопытных особей и DLM – наименьшее кол-во микробных клеток, способное вызвать гибель 95% животных восприимчивого вида при определённом способе заражения и в течение заданного времени.

Вирулентность возбудителя можно регулировать как в сторону её снижения так и повышения (Кальметт и Жерен, картофельно-глицериновые среды с жёлчью, 13 лет, 230). Снижение вирулентности называется аттенуацией – ослаблением.

ФАКТОРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ

Классификация зависит от их структуры, происхождения, механизма действия и назначения.

1. Структурные компоненты бактериальной клетки

1.1. *Капсула* образуется вирулентными штаммами как фактор защиты бактериальной клетки от воздействия фагоцитов и антител организма, капсула выполняет функцию экрана для возбудителя в отношении иммунной системы организма. Она тормозит фагоцитарный процесс (*B. anthracis*), в ряде случаев вызывает гибель фагоцитов (*S. aureus*).

1.2. *Пили* - (ворсинки, фимбрии) образуются вирулентными штаммами бактерий. Пили белковой природы являются факторами адгезии, обеспечивая прикрепление возбудителя к чувствительным клеткам хозяина.

Адгезивность хорошо выражена у эшерихий, которые продуцируют соответствующие белковые вещества, позволяющие бактериям прикрепляться к слизистой тонких кишок, накапливаться здесь в больших количествах, продуцировать токсины и поражать организм. Протеины наружной мембранны *E. coli* обеспечивают ей устойчивость к бактерицидному действию сыворотки крови.

1.3. *Пептидогликан* (муреин, мукопептид) - основной полимер клеточной стенки грамположительных и грамнегативных бактерий. В химическом отношении это гетерополимер, состоящий из гликановых цепей, перекрестно связанных посредством коротких пептидов.

Пептидогликан (*S. aureus*) выполняет функцию фактора микробной вирулентности, подавляя иммунные реакции хозяина, так как резко тормозит миграцию лейкоцитов, вызывает лизис тромбоцитов и пирогенное действие (подъем температуры).

1.4. *Липополисахариды* (ЛПС) содержатся в клеточной стенке грамотрицательных бактерий (эшерихий, шигелл, сальмонелл, бруцелл и др.). ЛПС являются эндотоксинами, так как становятся активными после разрушения бактериальной клетки. Обладают пирогенным действием, угнетают фагоцитоз, вызывают гипотонию. Большое количество поступившего в кровь эндотоксина приводит к токсико-септическому шоку. Гликолипид является основным фактором вирулентности туберкулезной палочки (корд-фактор). Корд-фактор оказывает токсическое действие, разрушая митохондрии клеток организма.

2. Секретируемые факторы

Известна группа микробных секретируемых факторов вирулентности, участвующих в инфекционном процессе: бактериоцины, экзотоксины, ферменты «защиты и агрессии», секретируемые факторы персистенции.

2.1. *Бактериоцины* - белки, медиаторы межмикробного взаимодействия, секретируются бактериальной клеткой в качестве антагонистически активных веществ. Бактериоцины выделяются в условиях близкородственного антагонизма внутри вида, рода бактерий. Бактериоцины обеспечивают колонизацию вирулентным штаммом определенного биотопа, подавляя нормальную микрофлору: колицины *Shigella flexneri* подавляют *E. coli*.

2.2. *Экзотоксины* - вещества белковой природы, секретируемые вирулентными штаммами микроорганизмов в качестве продуктов обмена в окружающую среду (организм животного, пробирка с питательной средой) и оказывающие токсическое действие на клетки и ткани организма хозяина.

Сравнительная характеристика бактериальных экзотоксинов и эндотоксинов представлена в таблице. Экзотоксины секретируются живой бактериальной клеткой в основном грамположительными, являются белками, полностью инактивируются под действием высокой температуры (90-100°C). Они обезвреживаются формалином в концентрации 0,3-0,4 % при 37 °C в течение 3-4 недель, при этом сохраняют свою антигенную специфичность и иммуногенность, т. е. переходят в вакцину-анатоксин (столбнячный, дифтерийный, ботулиновый, стафилококковый и др.).

2.2.1. Гемолизины – экзотоксины, разрушающие эритроциты крови.

2.2.2. Лейкоцидин – парализует активность лейкоцитов и разрушает их.

2.2.3. Нейротоксин – поражаенервную систему. Например, тетанолизин столбнячного микробы, ботулинический нейротоксин.

2.2.4. Энтеротоксины – вызывают расстройство ЖКТ, диарею.

2.2.5. Некротоксин – вызывает омертвение ткани, тормозит теплорегуляцию, понижает температуру тела.

2.3. *Эндотоксины* – образуются в результате распада микробной клетки (ЛПС, пептидогликан, тейхоевые и липотеихоевые кислоты). Хорошо изучены эндотоксины энтеробактерий (эшерихии, сальмонеллы, бруцеллы). Некоторые бактерии одновременно образуют как экзо-, так и эндотоксины (холерный вибрион, кишечная палочка и др.).

Как и вирулентность, сила действия токсинов измеряется величиной летальных доз DLM, LD₅₀, определяемые на животных.

Эндотоксины в отличие от экзотоксинов, характеризуются меньшей специфичностью действия и менее ядовиты по сравнению с экзотоксинами. Эндотоксины всех грамотрицательных бактерий угнетают фагоцитоз, вызывают падение сердечной деятельности, гипотонию, повышение температуры, гипогликемию.

2.4. *Ферменты*. Ферменты вирулентности образно делят на две группы: «защиты и агрессии».

2.4.1. Ферменты защиты обеспечивают устойчивость патогена к иммунитету хозяина:

- фермент коагулаза свертывает плазму крови, вследствие чего вокруг бактериальной клетки образуется защитная капсула (кишечная палочка, *S. aureus*);
- протеазы иммуноглобулинов разрушают антитела.

2.4.2. Ферменты агрессии обеспечивают распространение патогена по организму, разрушают структуры клеток и тканей организма:

- гиалуронидаза разрушает соединительную ткань, способствуя проникновению вглубьлежащие ткани патогена (*S. aureus*, бруцеллы, клостридии),
- нейраминидаза расщепляет сиаловые кислоты оболочек клеток, разжижает носовой секрет (пастереллы, вибрионы),
- фибринолизин растворяет сгустки фибринина (иерсинии, гемолитические стрептококки и стафилококки),
- ДНК-аза разрушает нуклеиновые кислоты,
- эластаза расщепляет лизоцим клеток организма.

Ферменты метаболизма бактерий, вызывающие образование токсических веществ при расщеплении субстратов организма, также рассматривают в качестве ферментов вирулентности:

- микробная уреаза - при гидролизе мочевины образует токсические вещества;
- декарбоксилаза - при разрушении белка способствует накоплению биогенных аминов.

2.5. Секретируемые субстанции. По химической природе в основном протеазы, расщепляющие специфический субстрат хозяина, который в норме обеспечивает защиту от патогена. Например, способность патогена инактивировать лизоцим определена как антилизоцимная активность. Этот фактор встречается у большого количества микроорганизмов от 88 до 100%.

Таким образом, факторы вирулентности приводят основные системы организма к дисфункции, в силу чего он погибает. Вирулентный штамм может обладать одним-двумя факторами вирулентности и этого окажется достаточно, чтобы ослабить резистентность организма и вызвать его гибель.

3. Виды инфекции.

Классифицируют различные формы инфекционного процесса.

1. По происхождению инфекции делят на **экзогенные** и **эндогенные**, или **аутоинфекции**.

Экзогенная инфекция возникает при попадании возбудителя в организм извне.

Эндогенная (оппортунистическая) инфекция вызывается ассоциативными представителями нормальной микрофлоры при снижении защитных сил организма (иммунодефицитные состояния). Возбудители эндогенной инфекции относятся к условно-патогенным видам микроорганизмов. Эндогенная инфекция может развиться и при перемещении микроорганизмов из одного биотопа человека в другой за счет искусственного переноса руками, инструментами либо естественного перехода микроорганизма - его транслокации (миграции).

2. По локализации патогена в организме различают **местную** и **генерализованную** формы инфекции.

Местная, или очаговая, инфекция имеет место, когда возбудитель локализуется в определенном органе либо ткани и не распространяется по организму, например возбудитель туберкулеза в легочной ткани.

При генерализованной инфекции патоген распространяется по организму, преодолевая различные защитные барьеры. Кровь является одним из частых путей распространения патогена это - гематогенный путь. Если возбудитель, распространяясь по крови, не размножается в ней, то такое явление называют **бактериемией**. В случае, когда бактерии размножаются в крови, развивается одна из тяжелых форм генерализованной инфекции – *сепсис* (при сибирской язве, роже свиней, колибактериозе и др). Сепсис может

перейти в *септикопиему*, когда патоген размножается во внутренних органах, вызывая в них образование гнойных очагов воспаления (при мыте лошадей, вызываемом стрептококком). При высокой концентрации бактерий и их токсинов в крови может развиться токсико-септический шок за счет массивного поступления токсинов.

3. Инфекционный процесс классифицируется в зависимости от числа проникших в организм видов патогена.

- **МоноИнфекция** вызывается патогеном одного вида (туберкулез, дифтерия).

- **Смешанная (микст) инфекция** - одновременное заражение двумя и более видами возбудителей и развитие сразу нескольких заболеваний.

- **Реинфекция** - повторное заражение тем же видом возбудителя после выздоровления. Реинфекция возможна при заболеваниях, после которых не возникает стойкий иммунитет

- Если повторное заражение происходит тем же возбудителем до выздоровления, то возникает **суперинфекция**.

- **Вторичная инфекция** возникает на фоне развивающегося первичного заболевания и вызывается другим видом возбудителя. Вторичная инфекция может быть экзогенной или эндогенной (чаще).

4. По длительности течения различают **острые и хронические** инфекции. **Острые** инфекции протекают непродолжительное время, их срок исчисляется днями, неделями (грипп, корь, холера, чума). Хронические инфекции протекают в течение нескольких месяцев, лет (брucеллез, туберкулез). При определенных условиях (неэффективное лечение) острые инфекции могут переходить в хронические () .

Хронические инфекции протекают в виде **ремиссии и рецидива**, которые сменяют друг друга. Ремиссия – временное улучшение состояния больного. Рецидив – возврат болезни. При хроническом инфекционном процессе возбудитель персистирует в организме хозяина, т.е. длительно паразитирует в его тканях и клетках.

5. По механизму передачи инфекционные болезни делятся на кишечные (кишечный колибактериоз, сальмонеллез), респираторные (туберкулез, оспа), кровяные (Кулихорадка, туляремия), инфекции кожных покровов и слизистых оболочек (столбняк, сибирская язва, ящур).

Возбудители *кишечных инфекций* передаются алиментарным путем (корма, вода, предметы ухода). *Инфекции дыхательных путей* распространяются воздушно-капельным, реже воздушно-пылевым путем. Для *кровяных инфекций* характерен трансмиссивный путь передачи через кровососущих насекомых (вши, клещи, комары, блохи и пр.).

Возбудители инфекций кожных покровов и слизистых оболочек передаются через предметы обихода, прямым контактом, например посредством укуса (бешенство) или половым путем (кампилобактериоз).

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

2.1 Лабораторная работа №1 (2 часа).

Тема: «Устройство микробиологической лаборатории. Техника безопасности при работе в бак.лаборатории. Устройство микроскопа. Микроскопия. Виды микроскопии»

2.1.1 Цель работы: Изучить правила работы в микробиологической лаборатории.

Ознакомиться с методами изучения морфологии микроорганизмов.

2.1.2 Задачи работы:

1. Изучить правила работы в микробиологической лаборатории.
2. Познакомиться с оборудованием, посудой и инструментами для работы с культурами микроорганизмов.
3. Освоить правила работы с культурами микроорганизмов.
4. Ознакомиться с методами изучения морфологии микроорганизмов.
5. Ознакомиться с устройством светового микроскопа и правилами работы с ним.

2.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Бактериологические боксы, термостат, холодильник, шпатели Дригальского, бактериологическая петля, микологические крючки, колбы, чашки Петри, пипетки Пастера, бинокулярные микроскопы, микропрепараты из микроорганизмов, иммерсионное масло.

2.1.4 Описание (ход) работы:

Правила работы в микробиологической лаборатории

Работа в микробиологической лаборатории требует строгого соблюдения чистоты и порядка для обеспечения стерильности исследований и во избежание загрязнений культур микроорганизмов.

В микробиологической лаборатории ежедневно проводят влажную уборку, производят дезинфекцию воздуха путем проветривания (30-60 мин.) и облучения ультрафиолетовыми лучами от 30 минут до нескольких часов в зависимости от степени загрязненности воздуха. Пол, стены и мебель в микробиологической лаборатории протирают растворами различных дезинфицирующих веществ (2-3 % раствором соды, 3-5 % раствором фенола, 0,3 % водным раствором хлорамина).

Рабочее место, где непосредственно проводится работа с культурами микроорганизмов, требует особенно тщательной обработки. Рабочий стол следует дезинфицировать до начала и после окончания работы (70 % раствором этилового спирта, 0,5-3 % водным раствором хлорамина).

При работе в микробиологической лаборатории необходимо соблюдать следующие правила:

1. Работу производить только в халатах и сменной обуви.
2. В лаборатории запрещается курение, прием пищи.
3. На рабочем месте не должно быть посторонних предметов; все реактивы, растворы, микробиологическая посуда с питательными средами и культурами микроорганизмов должны быть подписаны.
4. Все предметы, использованные при работе с живыми микроорганизмами, должны быть обеззаражены, либо обжиганием в пламени (петли, крючки, пинцеты), либо погружением в дезинфицирующий раствор (3-5 % водный раствор фенола или 2 % раствор хлорамина) (стеклянные пипетки, шпатели).
5. В конце занятия студент должен привести в порядок рабочее место, тщательно вымыть руки.

Оборудование, посуда и инструменты для работы с культурами микроорганизмов

В микробиологической лаборатории используется следующее оборудование: термостат, где с помощью терморегуляторов поддерживается постоянная для роста микроорганизмов температура; качалки и ферментеры для культивирования микроорганизмов; сушильные шкафы и автоклавы для стерилизации питательных сред, посуды и инструментов; бактерицидные лампы для дезинфекции помещений, ламинарные боксы, микроскопы и т.д.

Для культивирования микроорганизмов используется следующая стеклянная посуда: качалочные колбы, конические колбы, чашки Петри, пробирки, матрацы (рис. 1).

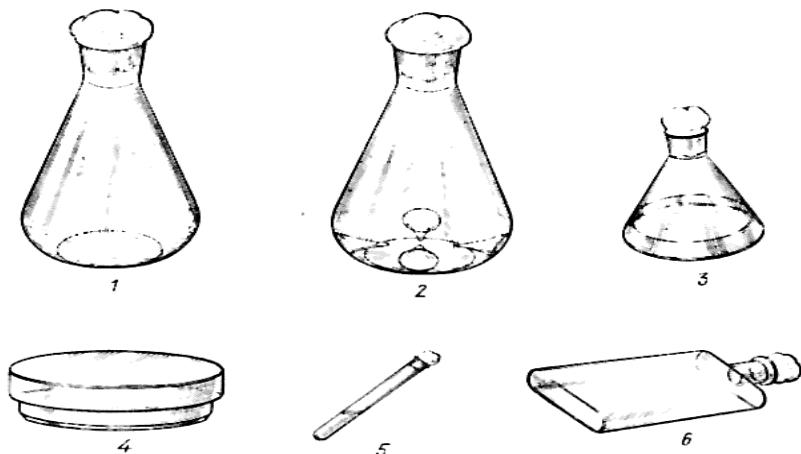


Рис 1. Посуда для культивирования микроорганизмов: 1- качалочная колба; 2- качалочная колба с отбойниками; 3- коническая колба; 4- чашка Петри; 5- пробирка; 6- матрац.

В качестве инструментов для посева и приготовления препаратов используют бактериологические петли, иглы, крючки, стеклянные пипетки, шпатели Дригальского.

Правила работы с культурами микроорганизмов

В лаборатории микроорганизмы выращивают на жидких и плотных питательных средах, которые разливают в пробирки, колбы, чашки Петри. Посуду и питательные среды предварительно стерилизуют. Процесс выращивания микроорганизмов в искусственных условиях в питательной среде называется культивированием. При этом выращенные клетки определенного вида микроорганизмов называются культурой микроорганизмов.

Все действия следует проводить около пламени горелки (но не в пламени) и по возможности быстро, чтобы не загрязнить культуру посторонними микроорганизмами. Не рекомендуется делать резких движений и ходить около работающего с чистой культурой, т.к. движение воздуха увеличивает вероятность случайного ее загрязнения. Для разлива питательной среды в чашки Петри сосуд со средой берут в правую руку, вынимают из него пробку, зажимая ее мизинцем и безымянным пальцем левой руки, обжигают горло сосуда в пламени горелки и, приоткрыв большим и указательным пальцами левой руки крышку чашки Петри, быстро наливают в чашку расплавленную среду в таком количестве (около 20 мл), чтобы дно чашки было полностью покрыто. Крышку тотчас закрывают и чашку оставляют на горизонтальной поверхности до тех пор, пока не застынет среда.

Внесение клеток микроорганизмов в стерильную среду называется посевом. Распределение микроорганизмов по поверхности питательной среды называют рассевом. Перенос уже выращенных микроорганизмов из одной среды в другую – пересевом. Клетки микроорганизмов для посева или приготовления препаратов берут бактериологической петлей (если микроорганизмы выращены на плотной питательной среде) или стерильной пипеткой (если микроорганизмы выращены в жидкой среде). Перед взятием клеток микроорганизмов петлю стерилизуют, обжигая саму петлю и часть держателя в пламени спиртовки. Сразу же после стерилизации петлю вводят в сосуд с микроорганизмами. Чтобы не повредить клетки микроорганизмов, петлю вначале охлаждают, прикасаясь ею к внутренней поверхности сосуда или к питательной среде, свободной от клеток микроорганизмов, и только после этого захватывают небольшое количество микробной массы.

Работа 1.

Задание.

1. Ознакомиться с устройством светового микроскопа и правилами работы с ним.
Разобрать и нарисовать в тетради схему образования изображения в световом микроскопе (рис. 4), рисунок 5 и таблицу 1.

2. Вычислить предел разрешения для разных объективов микроскопа при $\lambda = 0,55 \text{ мкм}$.

Работа 2.

Задание. Рассмотреть демонстрационный препарат: «раздавленная» капля из дрожжей, при иммерсионной и фазово-контрастной микроскопии. Рассмотреть окрашенный флюорохромом препарат из дрожжей под люминесцентным микроскопом. Необходимо обратить внимание на качество изображения объектов. Сравнить способы микроскопии.

Заполнить таблицу.

Таблица

Исследуемый материал	Микроскопический метод исследования		
	Иммерсионная микроскопия (рис.)	Фазово-контрастная микроскопия (рис.)	Флуоресцентная микроскопия (рис.)

Контрольные вопросы: 1. Какие преимущества имеет метод флуоресцентной микроскопии? 2. Какой принцип лежит в основе фазово-контрастной микроскопии?

Работа 3.

Задание. Рассмотреть два демонстрационных препарата: 1. Смесь эритроцитов и палочек. Окраска фуксином. 2. Смесь дрожжей и кокков. Окраска метиленовым синим.

Подготовка микроскопа для работы: поднять конденсор до уровня предметного столика, полностью открыть диафрагму, поставить плоское (при естественном освещении) или вогнутое (при искусственном освещении) зеркало.

Осветить поле зрения под контролем объектива х8. Нанести на препарат каплю масла, положить препарат на столик микроскопа и закрепить. Установить иммерсионный объектив. Под наблюдением медленно опустить объектив макровинтом до погружения в масло. Затем, глядя в окуляр, медленно поднимать объектив до появления объекта. Провести окончательную фокусировку препарата микрометрическим винтом, вращая его только в пределах одного оборота.

Заполнить таблицу.

Таблица

Исследуемый материал	Иммерсионная микроскопия	
	Рисунок	Метод окраски

Контрольные вопросы: 1. Устройство светового микроскопа. 2. Правила работы с иммерсионным объективом. 3. Основные характеристики светового микроскопа. Разрешающая способность микроскопа. Общее увеличение микроскопа. Полезное увеличение микроскопа. 4. Контраст в световом микроскопе и его повышение (фазово-контрастная микроскопия, микроскопия в темном поле). 5. Люминесцентная микроскопия. 6. Электронная микроскопия.

2.2 Лабораторная работа №2 (2 часа).

Тема: «Сложный метод окраски по Граму. Не обязательные компоненты бактериальной клетки, их функции»

2.2.1 Цель работы: Изучить метод и сущность сложного метода окраски по Граму.

2.2.2 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Культуры бактерий, бактериологические петли, предметные стекла, фильтровальная бумага, спиртовки, микроскопы, красители генциановый фиолетовый и фуксин, раствор Люголя, этиловый спирт 96%, щелочная синька Леффлера, малахитовый зеленый, 0,5% водный р-р сафранина, стёкла с лунками, покровные стёкла, вазелин иммерсионное масло, дистиллированная вода.

2.2.3 Описание (ход) работы:

Сложные методы окраски бактерий

Окраска микроорганизмов по Граму.

В зависимости от химического состава и строения клеточной стенки прокариоты делятся на грамположительные и грамотрицательные бактерии.

Основные отличия в строении клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий схематически изображены на рисунке 5.

Такое деление связано со способностью бактерий окрашиваться по Граму. 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.

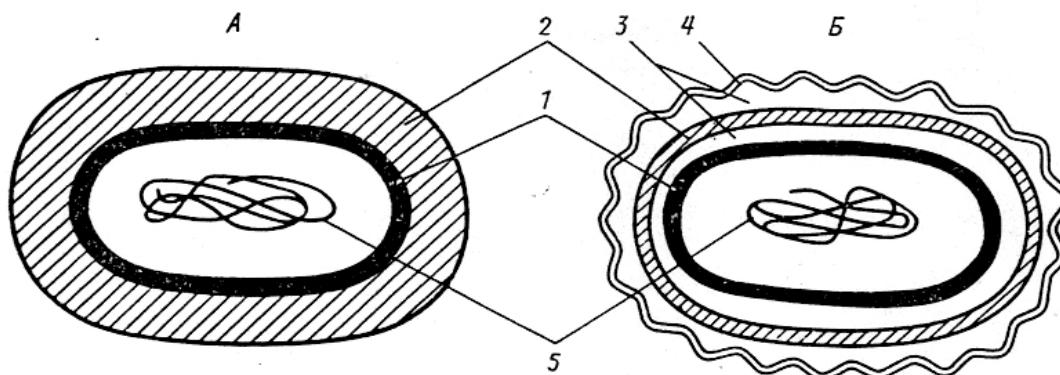


Рис. 5. Схематическое изображение клеточной стенки грамположительных (А) и грамотрицательных (Б) бактерий. 1- цитоплазматическая мембрана; 2- пептидогликан; 3-периплазматическое пространство; 4- наружная мембрана; 5-ДНК.

Приготовление препаратов бактерий, окрашенных 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.

Работа

Задание. Приготовить препарат из смеси грамположительных кокков и грамотрицательных палочек. Окрасить по методу Грама. Рассмотреть окрашенный препарат под микроскопом с иммерсией.

Заполнить таблицу.

Таблица

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

Контрольные вопросы: 1. Строение и химический состав клеточной стенки бактерий. 2. Основные отличия грамположительных и грамотрицательных бактерий. 3. Сущность окраски по Граму.

Выявление эндоспор в клетках микроорганизмов

Спорообразующие бактерии широко используются в биотехнологии. Например, с помощью аэробных бактерий рода *Bacillus* получают ферменты, антибиотики, энтомопатогенные препараты и т. д. Анаэробные бактерии рода *Clostridium* используются для получения ацетона, бутанола, масляной кислоты. При этом спорообразующие прокариоты могут быть и вредителями биотехнологических процессов.

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 Ожешки:

1. На высушенный нефиксированный препарат наливают несколько капель 0,5% раствора соляной кислоты и подогревают 1 - 2 минуты над пламенем горелки до закипания, после чего остатки кислоты сливают.

2. Остывший препарат промывают водой.

3. Окрашивают карболовым фуксином Циля (фуксин наливают на фильтровальную бумагку) с подогреванием до появления паров. По мере испарения, краситель периодически подливают.

4. Препарат вновь промывают и обесцвечивают 1% раствором серной кислоты в течение 2 минут.

5. Препарат промывают водой и докрашивают раствором метиленового синего (1: 40) в течение 10 - 20 минут.

6. Краситель смывают водой, высушивают. Препараты микроскопируют с иммерсионным объективом.

Наблюдаемая микрокартина: споры, окрашенные фуксином, имеют рубиново красный цвет, вегетативные тела микробных клеток при докрашивании метиленовым синим - синий цвет.

Работа 1.

Задание.

Приготовить фиксированные препараты бактерий рода *Bacillus* и окрасить их метиленовым синим. Промикроскопировать с иммерсионным объективом. Зарисовать.

Работа 2.

Задание.

Приготовить фиксированные препараты спорообразующих бактерий и окрасить их по методу Ожешки. Промикроскопировать с иммерсионным объективом. Зарисовать микропрепарат.

Выявление капсул микроорганизмов

Клетки многих микроорганизмов, особенно при росте на средах, богатых углеводами, образуют слизистый внешний слой – капсулу. Капсулы разных видов бактерий имеют неодинаковый химический состав и могут состоять из гомо- и гетерополисахаридов, полипептидов, нуклеиновых кислот. Капсула не является обязательным структурным элементом клетки, но может выполнять ряд полезных функций: защищать клетку от неблагоприятных условий (высушивания, ультрафиолетовых лучей, химических агентов), от бактериофагов и простейших. Слизистые покрытия многих бактерий определяют их вирулентность и патогенность, обеспечивают прикрепление к различным поверхностям и связь между соседними клетками. Слизеобразующие бактерии широко используются в биотехнологии. Например, с помощью бактерий *Leuconostoc mesenteroides* и *Leuconostoc dextranicum* получают гомополисахарид декстран, который используется при изготовлении заменителей плазмы крови, различных лекарственных форм, косметических средств, сефадексов и т.д. Фитопатогенные бактерии *Xanthomonas campestris* образуют гетерополисахарид ксантан. Благодаря способности сгущать водные растворы, служить в качестве диспергирующего агента, стабилизировать эмульсии и суспензии он нашел применение в пищевой, фармацевтической, нефтяной, горнодобывающей, текстильной и других областях промышленности.

Капсулы часто имеют консистенцию геля и плохо видны при микроскопировании живых клеток, поэтому для их выявления применяют способ негативного контрастирования с помощью жидкой туши.

Выявление капсул по методу Бури.

На предметное стекло наносят каплю туши, и петлю с исследуемым материалом. Смесь перемешивают тщательно петлей. Второе предметное или покровное стекло ставят на первое под углом 45° и подводят к капле туши до соприкосновения с ней. После того, как тушь растечется пошлифованному краю, стеклом делают скользящее движение справа налево, равномерно распределяя тушь по всей поверхности стекла тонким слоем (рис.24). Толщина мазка зависит от величины угла между стеклами: чем острей угол, тем тоньше мазок. Правильно приготовленный мазок имеет одинаковую толщину на всем своем протяжении. Препарат высушивают на воздухе и, не фиксируя, микроскопируют с

иммерсионной системой. Фон препарата окрашивается в темно-дымчатый цвет, микробные тела и их капсулы не окрашиваются тушью и остаются бесцветными.

Окраска капсул по методу Гинса.

1. Готовят негативно окрашенный препарат по способу Бурри.
2. Фиксируют любым химическим способом: метиловым спиртом, смесью Никифорова или другими смесями.

3. Промывают водой.
4. Окрашивают карболовым фуксином Циля, рвенным 1:3, в течение 3-5 мин.
5. Препарат промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой.

При микроскопировании на темном фоне препарата контрастно выделяются неокрашенные капсулы, внутри которых находятся бактерии ярко-малинового цвета.

Работа.

Задание.

Выявить капсулы бактерий *Leuconostoc mesenteroides*, *Xanthomonas campestris* и *Azotobacter vinelandii* по методам Бурри и Гинса. Результаты микроскопии оформить в виде рисунка.

Контрольные вопросы: 1. Капсулы: их строение и биологическое значение. 2. Методы выявления капсул бактерий.

Выявление включений в клетках микроорганизмов.

В цитоплазме микроорганизмов могут присутствовать твердые, жидкые и газообразные включения. Запасные вещества представлены полисахаридами, липидами, полипептидами, полифосфатами и т. д. Из полисахаридов в клетке откладываются гликоген, крахмал и крахмалоподобное вещество - гранулеза (специфический запасной полисахарид анаэробных споровых бактерий группы клостридий). Гликоген при окраске раствором Люголя легко выявляется у дрожжей. Здоровые дрожжи, осуществляющие интенсивное брожение должны содержать не менее 70 % клеток с гликогеном. Липиды накапливаются в виде гранул и капелек жира, резко преломляющих свет и потому хорошо различимых в световой микроскоп. Полифосфаты содержатся в гранулах, называемых волютиновыми или метахроматиновыми зернами, и выявляются после окрашивания специальными красителями. В клетках прокариот волютин локализован в цитоплазме, в клетках эукариот – в вакуолях.

Для выявления полисахаридов клетки обрабатывают раствором Люголя. Для этого к капле суспензии клеток на предметном стекле добавляют каплю раствора Люголя. Препаратор накрывают покровным стеклом и микроскопируют. Гранулы крахмалоподобных веществ – гранулезы – окрашиваются в синий, а гранулы гликогеноподобных полисахаридов – в красновато-коричневатый цвет. Перед выявлением в клетках гликогена среду культивирования микроорганизмов необходимо подкислить.

Одним из методов выявления полифосфатов в клетках микроорганизмов является окраска волютина по методу Омелянского:

1. Приготовить мазок, высушить и зафиксировать его.
2. Окрасить карболовым фуксином Циля в течение 30- 60 минут.
3. Препарат промыть водой и обесцветить 1% -ным раствором серной кислоты в течение 20- 30 секунд.
4. Промыть препарат водой.
5. Дополнительно окрасить препарат метиленовым синим (1:40) в течение 1 минуты.
6. Препарат промыть водой, высушить и промикроскопировать с помощью иммерсионной системы. Гранулы волютина будут иметь красный цвет на фоне синей цитоплазмы.

Работа 1.

Задание. Выявить гликоген в клетках дрожжей. Результаты микроскопии оформить в виде рисунка.

Работа 2.

Задание. Выявить волютин в молодых клетках бактерий. Зарисовать результаты.

Контрольные вопросы: 1. Внутрицитоплазматические включения и их назначение. 2. Запасные вещества микроорганизмов и способы их выявления.

2.3 Лабораторная работа №3 (2 часа).

Тема: «Методы стерилизации. Питательные среды. Методы учёта численности микроорганизмов»

2.3.1 Цель работы: Изучить физические и химические методы стерилизации.

Изучить разнообразие питательных сред.

2.3.2 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Шпатели Дригальского, петли, крючки, стеклянные пипетки, колбы, пробирки, чашки Петри, вата, марля, пергаментная бумага, нитки, ножницы, сухожаровой шкаф, автоклав, стерильные биологические пробирки с ватными пробками, стерильные чашки Петри, стеклянные емкости для приготовления питательных сред, компоненты питательных сред: пептон, дрожжевой экстракт, глюкоза, овсяная мука (или хлопья), сахароза, NaNO_3 , K_2HPO_4 , MgSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$, KCl , FeSO_4 , агар, дистиллированная вода, технические и аналитические весы, водяная баня, потенциометр, спиртовки.

2.3.3 Описание (ход) работы:

Стерилизация (лат. *sterilis* — бесплодный) — обеспложивание; уничтожение в каком-либо материале патогенных и непатогенных микроорганизмов в вегетативной и споровой формах. Для стерилизации используют физические и химические методы. Механизмы их действия неодинаковы, но при выборе любого из методов должны быть соблюдены два основных требования: достижение полного обеспложивания и сохранение физико-химических свойств стерилизуемого материала.

Физические методы стерилизации. Методы заключаются в уничтожении микроорганизмов с помощью физических средств. К ним относят: стерилизацию сухим жаром, влажным жаром, фильтрованием, ультрафиолетовыми лучами, ультразвуком.

Микробиологи стерилизуют питательные среды, посуду, инструменты с целью не допустить развития посторонних микроорганизмов в исследуемых культурах. Различают термическую и холодную стерилизацию. Существуют следующие способы термической стерилизации: прокаливание в пламени и обжигание, сухожаровая стерилизация (горячим воздухом), стерилизация насыщенным паром под давлением (автоклавирование), дробная стерилизация (тиндализация), кипячение. К методам холодной стерилизации относят стерилизацию фильтрованием (пропускание жидкостей через специальные мелкопористые фильтры, называемые бактериальными), ультрафиолетовыми лучами, ионизирующим излучением, растворами и газообразными средствами. Дробная стерилизация применяется для стерилизации сред, портящихся под действием температур выше 100°C , она заключается в многократном прогревании сред без избыточного давления. Пастеризация- однократный прогрев материала при температуре ниже 100°C (15-30 минут при $60-70^\circ\text{C}$, 10-15 минут при 80°C).

Для стерилизации посуды обычно используются сухожаровые шкаф, а для стерилизации питательных сред автоклавы, которые отличаются объемом внутренней камеры и способом загрузки (вертикальная и горизонтальная). Современное

оборудование может работать в автоматическом режиме и снабжено микропроцессорным управлением.

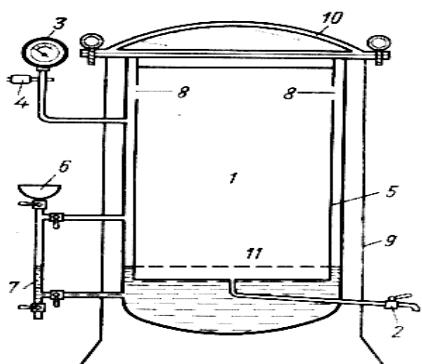
Химические методы стерилизации. Сводятся в лабораторной практике к консервированию питательных сред, вакцин, а также лечебных и диагностических сывороток различными химическими соединениями (соли металлов, щелочи, антибиотики и др.) с целью предупреждения бактериального загрязнения. Питательные среды консервируют хлороформом, толуолом, иногда эфиром (для освобождения от консерванта среду нагревают до 56 °C). Вакцины и лечебные сыворотки консервируют 0,25...0,5%-м раствором фенола, 0,5%-м раствором хлороформа, 0,5%-м раствором формалина или раствором мертиолата (в конечном разведении 1 : 5000 - 1:10 000).

Работа 1.

Задание

1. Познакомиться с устройством и принципом работы автоклава (рис. 6).

Рис. 6. Схема автоклава



1. стерилизационная камера; 2. кран для выхода воздуха; 3.манометр; 4. предохранительный клапан; 5. водопаровая камера; 6. воронка для заполнения автоклава водой; 7. водомерная трубка; 8. отверстие для поступления пара в стерилизационную камеру; 9. защитный кожух; 10. крышка автоклава; 11. подставка для размещения посуды.

Работа 2.

Задание. Подготовить для стерилизации пробирки и колбы с ватно-марлевыми пробками. Для приготовления пробок плоский кусок ваты, взятый вдоль волокна, скатать валиком, обернуть марлевой салфеткой. Длина обычной пробки должна быть около 4 см. Пробка должна входить в пробирку на 1,5-2 см. Для сохранения формы, пробку вынимают из горлышка, слегка вращая. Перед стерилизацией пробки прикрыть бумажными колпачками.

Работа 3.

Задание. Простерилизовать подготовленную посуду и инструменты в сухожаровом шкафу при 160°C 2 часа. По окончании стерилизации шкаф на открывать до тех пор, пока температура в нем не упадет до 80°C, так как при резком охлаждении может нарушиться стерильность материала, а сильно нагретое стекло может потрескаться.

Контрольные вопросы: 1. Стерилизация питательных сред. 2. Подготовка сред к стерилизации. 3. Методы стерилизации питательных сред. 4. Устройство и принцип работы автоклава. 5. Выбор режима автоклавирования в зависимости от состава и pH среды, от объема стерилизуемого субстрата, от толщины стенок и формы емкостей. 6. Дроб-ная стерилизация. 7. Пастеризация. 8. Стерилизация фильтрованием. 9. Стерилизация стеклянной посуды, стерилизация инструментов и приборов.

Питательные среды

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 RH_2 . 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 жидкые (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 составу 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.

Оптимальные среды предложил А.А. Имшенецкий для целлюлозоразрушающих микроорганизмов, В.С. Буткевич – для продуцента лимонной кислоты *Aspergillus niger*. Основной принцип оптимальных сред заключается в создании наиболее благоприятных условий для выбранных микроорганизмов внесением в среду различных стимулирующих рост добавок (витаминов, ростовых веществ, микроэлементов).

Каждый сосуд со средой должен иметь этикетку с обозначением названия среды и времени ее приготовления.

Работа 1.

Задание.

1. Приготовить натуральную агариованную среду для культивирования актиномицетов следующего состава (г / л): овсяная мука (или хлопья) -20,0; агар- 20,0; pH 7,0- 7,2. Для приготовления среды овсяную муку (или хлопья) варят в 1 л водопроводной воды 20 мин, фильтруют и доводят объем до 1л.

2. Приготовить синтетическую среду Чапека-Докса для культивирования мицелиальных грибов следующего состава (г / л): сахароза- 30, 0; NaNO₃ – 3,0; K₂HPO₄ – 1,0; MgSO₄ • 7H₂O – 0,5; KCl- 0,5; FeSO₄• 7H₂O-0,01; агар- 15,0; вода дистиллированная- 1000мл; pH 6,0.

3. Разлить среды в стеклянные емкости не более чем на половину их высоты, закрыть ватными пробками и отдать на стерилизацию.

4. Готовую стерильную агариованную среду расплавить на кипящей водяной бане. Разлить ее в асептических условиях в чашки Петри по 20- 25 мл и в биологические пробирки не более чем на 1/ 3 их высоты. Пробирки установить в наклонном положении так, чтобы среда не доходила до ватной пробки на 4-6 см.

Работа 2.

Задание. Изучить виды питательных сред для культивирования микроорганизмов. Заполнить таблицу.

Таблица

Виды питательных сред	Характеристика
1. элективные или избирательные	
2. дифференциально-диагностические	
3. накопительные	
4. оптимальные	
5. естественные	
6. синтетические	

7. полусинтетические	
8. плотные	
9. жидкие	

Работа 3.

Задание.

Изучить состав элективных и дифференциально-диагностических сред для культивирования микроорганизмов разных таксономических групп. Используя аннотации к питательным средам, внести в протокол описание сред.

Таблица

Название среды	Назначение	Вещества, придающие элективные и дифференциально-диагностические свойства

Работа 4.

Задание. Изучить особенности роста микроорганизмов разных видов на дифференциально-диагностических средах: среда Эндо, желточно-солевой агар, хламидоспор-агар, кровяной агар. Результаты зарисовать.

Контрольные вопросы: 1. Виды питательных сред и их назначение. 2. Основные требования к питательным средам, используемым для культивирования микроорганизмов. 3. Компоненты питательных сред: источники углерода, источники азота, минеральные соли, микроэлементы, факторы роста, предшественники метаболитов и другие вещества, необходимые для роста микроорганизмов и биосинтеза целевых продуктов. 4. Сыре, используемое для приготовления питательных сред (меласса, гидрол, барда, кукурузный экстракт, молочная сыворотка и т.д.).

Прямые и косвенные методы учёта численности микроорганизмов

Подсчет клеток микроорганизмов под микроскопом. Подсчитать клетки микроорганизмов под микроскопом можно, используя счетные камеры, капилляры Перфильева, препараты фиксированных и окрашенных клеток. Основное ограничение большинства указанных методов — необходимость довольно высоких концентраций клеток в единице исследуемого субстрата.

Подсчет клеток в счетных камерах. Этот метод рекомендуется использовать для подсчета крупных объектов — дрожжей, одноклеточных водорослей, конидий грибов и некоторых относительно крупных бактерий. Обычно используют камеру Горяева — Тома.

Подсчет клеток на фиксированных окрашенных мазках (метод Виноградского—Брида). Метод широко используется для определения численности микроорганизмов в различных естественных субстратах — почве, загрязненных водах, молоке, в оптически непрозрачных питательных средах, содержащих нерастворимые в воде компоненты, например, крахмал, соевую муку. Преимущество метода заключается также в том, что фиксированные окрашенные препараты хорошо сохраняются, поэтому подсчет можно проводить в удобное для исследователя время.

Подсчет клеток на мембранных фильтрах. Этот метод рекомендуется использовать для определения численности микроорганизмов в субстратах с низкой плотностью клеток. Его применяют при определении количества микроорганизмов в различных водоемах, при санитарно-бактериологических и некоторых других исследованиях. Фильтрование пробы определенного объема позволяет сконцентрировать на поверхности фильтра содержащиеся в пробе клетки микроорганизмов. Затем их окрашивают и подсчитывают.

При выявлении и количественном учете микроорганизмов широко применяют люминесцентную микроскопию. Препараты микроорганизмов готовят непосредственно из

исследуемой суспензии и ее разведений либо концентрируют клетки на специально обработанных не флуоресцирующих фильтрах. Препараты и фильтры с микроорганизмами обрабатывают акридином оранжевым или другими красителями. Принципы подсчета при люминесцентной и светлопольной микроскопии одинаковы, однако окрашенные флуорохромами клетки более четко видны на темном фоне препарата и хорошо отличимы от небиологических объектов.

При характеристике развития микробной популяции, санитарной оценке кормов, продуктов питания, при вычислении показателя вирулентности микроорганизма необходимо устанавливать количество микробных клеток в единице объема того или иного материала.

Косвенные методы определения численности микроорганизмов основаны на измерении величины параметров, значения которых зависят от количества микроорганизмов: биомасса, светорассеяние, подсчет колониеобразующих единиц (метод Коха).

Метод измерения светорассеяния. Количество света, рассеиваемого суспензией бактерий, пропорционально их концентрации. Этот показатель достаточно точно можно измерить при помощи фотоэлектроколориметра. Зависимость между оптической плотностью и концентрацией клеток различна для бактерий разных видов. Поэтому при работе с таким прибором для каждого вида бактерий необходимо строить свою калибровочную кривую зависимости.

На практике широко используют простой субъективный метод, основанный на визуальном сравнении мутности исследуемой бактериальной суспензии с так называемым «стандартом мутности», выпускаемым Государственным научно-исследовательским институтом стандартизации и контроля биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича. Стандарт представляет собой взвешенные в воде частицы стекла «Пирекс» и состоит из трех запаянных пробирок-эталонов (5, 10 и 20 международных единиц). Мутность стандарта на 10 ед. соответствует следующим концентрациям: для бактерий кишечной группы — $0,93 \cdot 10^9$ кл/мл; коклюшной группы — $11 \cdot 10^9$ кл/мл; для бруцеллезных бактерий — $1,7 \cdot 10^9$ кл/мл; туляремийных микробов — $5 \cdot 10^9$ кл/мл.

Мерной пипеткой вносят 0,1-0,5 мл исследуемой бактериальной суспензии в пустую пробирку, соответствующую по диаметру и толщине стенок пробирке «стандарта мутности». К суспензии добавляют физиологический раствор до оптической плотности стандарта на 10 ед. Физиологический раствор вносят небольшими мерными порциями, записывая его количество и сравнивая мутность опытной и стандартной пробирок невооруженным глазом на фоне специальной шрифтовой таблицы. Зная, во сколько раз развели исследуемую бактериальную суспензию, чтобы уравнять ее оптическую плотность со стандартом, можно рассчитать содержание микробных клеток в 1 мл исходной суспензии.

Например, в пробирку поместили 0,1 мл суспензии бактерий, содержащей неизвестное количество клеток. Для уравнивания оптической плотности исследуемой суспензии со стандартом мутности 10 ед. в пробирку добавили 0,9 мл физиологического раствора, т. е. исходную суспензию развели в 10 раз. Известно, что суспензия данного вида бактерий при оптической плотности 10 ед. содержит $1,3 \cdot 10^9$ кл/мл. Следовательно, концентрация исследуемой суспензии составляет $1,3 \cdot 10^{10}$ кл/мл.

При работе с бактериями, для которых нет данных о содержании микробных клеток в 1 мл относительно «стандарта мутности», необходимо предварительно методом прямого счета определить их количество в суспензии, например, оптической плотностью 10 ед.

Определение количества живых микроорганизмов. Метод основан на принципе Коха, что бактериальная колония — это результат деления единичной клетки на плотной питательной среде (исключение составляют бактерии, образующие цепочки из клеток). Метод включает три этапа: приготовление разведения, посев на плотные питательные

среды определённого объёма бактериальной взвеси, учёт количества колоний, выросших после инкубации на плотной питательной среде.

Определение биомассы взвешиванием. Этот метод широко применяют для оценки роста микроорганизмов в жидкых питательных средах. Можно использовать его и для определения массы клеток, выращенных на плотной питательной среде, однако в этом случае микроорганизмы необходимо предварительно тщательно смыть с поверхности среды физиологическим раствором или водой и перевести в суспензию. Метод не может быть использован при культивировании микроорганизмов на средах, в состав которых входят соединения, не растворимые в воде.

Определение биомассы состоит из трех последовательных операций: доведения массы центрифужных пробирок или фильтров до постоянного значения, отделения клеток микроорганизмов от культуральной жидкости, определения их массы. Чаще всего определяют массу сухих клеток, хотя иногда можно ограничиться определением сырой биомассы. Биомассу обычно выражают в граммах или миллиграммах на литр культуральной жидкости.

Доведение массы центрифужных пробирок или фильтров до постоянного значения. Фильтры помещают в сушильный шкаф и высушивают в течение 1—2 ч при температуре 80—85° и 90—100°. Затем фильтры вынимают и переносят в эксикатор с безводным хлористым кальцием (CaСl) или концентрированной серной кислотой. Эксикатор ставят около аналитических весов, на которых будет проводиться взвешивание. Через час фильтры взвешивают с точностью до 0,0001 г. Высушивание и взвешивание повторяют, соблюдая указанную последовательность операций, пока масса не достигнет постоянного значения.

Мицелий актиномицетов и грибов отделяют фильтрованием. Бумажный фильтр помещают в стеклянную воронку и фильтруют через него точно измеренный объем культуры, от 5 до 10 мл. Осадок на фильтре многократно промывают подкисленной дистиллированной водой.

Для отделения бактерий используют мембранные фильтры. Размеры пор мембранных фильтров должны быть меньше величины клеток, биомассу которых определяют. Мембранный фильтр помещают на пористую пластинку специального держателя, вставленного в колбу. Чтобы ускорить фильтрование, колбу подключают к водоструйному насосу. Осадок несколько раз промывают подкисленной дистиллированной водой. Подробно порядок работы с мембранными фильтрами.

Определение биомассы. Чтобы определить массу сухих клеток, центрифужную пробирку или фильтр с осадком клеток микроорганизмов помещают в сушильный шкаф, высушивают и взвешивают. Режим высушивания и взвешивания тот же, который использовали и при определении массы пробирок или фильтров. Сухую биомассу определяют по формуле:

$$M = (A - B) * 1000 / V,$$

где M — сухая биомасса в г/л; A — масса центрифужной пробирки (фильтра) с осадком в г; B — масса центрифужной пробирки (фильтра) без осадка в г; V — объем культуральной жидкости, взятый для центрифугирования (фильтрования) в мл. Точность метода определяется полнотой отмывания клеток от компонентов среды и тщательностью взвешивания.

Работа

Задание. Определить количество микроорганизмов в бактериальной суспензии методом Коха.

Мерной пипеткой объемом 1 мл добавляют 1 мл культуры E. coli в бактериологическую пробирку с 9 мл стерильного физиологического раствора, подогретого до 37...38 °C (разведение 10-1). Далее аналогичным способом готовят разведения культуры от 10⁻² до 10⁻⁸. Для каждого разведения используют новую пипетку того же объема и класса. Из пяти последних пробирок суспензию бактерий по 0,1 мл

наносят на поверхность подсушенного МПА в две чашки Петри. Внесенный материал стерильным шпателем распределяют по поверхности питательной среды. Посевы инкубируют при 37...38 °C 24 ч.

Учет результатов: в чашках Петри, где выросло более 150...300 и менее 10 колоний, результаты не учитывают. Выбирают чашки Петри с параллельными посевами (из одного разведения), содержащими 10... 150 колоний. Подсчитывают колонии на чашках из одного разведения, суммируют, определяют среднее число колоний и с учетом степени разведения рассчитывают содержание жизнеспособных клеток (колониеобразующих единиц) в 1 мл исходной суспензии бактерий.

Контрольные вопросы: 1. Определение количества жизнеспособных микроорганизмов методом Коха. 2. Определение количества микроорганизмов с помощью стандарта мутности. 3. Использование показателя светорассеивания для определения численности микроорганизмов.

2.4 Лабораторная работа №4 (2 часа).

Тема: «Техника посева и методы культивирования аэробов и анаэробов.

Культуральные свойства микроорганизмов»

2.4.1 Цель работы: Ознакомиться с техникой посева микроорганизмов. Изучить особенности роста микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах.

2.4.2 Задачи работы:

- 1.Ознакомиться с техникой посева микроорганизмов.
2. Изучить условия культивирования аэробных и анаэробных микроорганизмов.
3. Ознакомиться с питательными средами для культивирования анаэробов.

2.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Чашки Петри со стерильными плотными питательными средами, пробирки со стерильным МПА, МПБ, бактериологические петли, спиртовки, чашки Петри с изолированными колониями бактерий, линейки, петли, спиртовки.

2.4.4 Описание (ход) работы:

При изучении свойств микроорганизмов, для получения биомассы необходимо размножать и выращивать их в условиях лаборатории. Культивирование, или выращивание, микроорганизмов возможно лишь при создании определенных условий для их жизнедеятельности. Большинство бактерий, дрожжи, плесени и часть простейших культивируются на искусственных питательных средах. Вирусы, риккетсии и некоторые простейшие способны размножаться только в живых клетках, культуре тканей, курином эмбрионе или в организме животного.

Искусственные питательные среды, применяющиеся для культивирования микроорганизмов, должны содержать все питательные вещества — белки, жиры, углеводы; вещества, необходимые для роста и размножения микробов. Источниками азота могут быть различные неорганические и органические соединений, источником углерода — углеводы, спирты, определенные кислоты. Для культивирования некоторых микроорганизмов необходимо добавление жиров, парафина, воска. Большинство гетеротрофов, особенно патогенных, культивируют в средах, содержащих кровь, сыворотку, сложные органические вещества, витамины, ионы металлов.

Питательные среды должны содержать также достаточное количество воды, быть по возможности прозрачными обязательно стерильными, т. е. до посева в них не должны находиться микроорганизмы.

Температура выращивания должна быть оптимальной для данного вида микроорганизмов. Большинство возбудителей инфекционных заболеваний размножается при 37°C. Однако для отдельных видов оптимальная температура культивирования несколько ниже: для возбудителя чумы 28°C, для спирохет и некоторых простейших — лейшманий 28—29°C. Грибы можно выращивать и при более низких температурах. Выращивание микроорганизмов на питательных средах производят в специальных аппаратах — термостатах, в которых и поддерживают оптимальную температуру.

Чистой культурой называют популяцию бактерий одного вида, выращенную на питательной среде. Культуры микробов одного вида, выделенные из различных источников - штаммы. Чистые культуры бактерий получают из изолированных колоний. Выделяют микроорганизмы из исследуемого материала путем посева на плотные или жидкые питательные среды с помощью микробиологической петли или шпателя. Выделение неприхотливых бактерий проводят на простых средах, прихотливых видов - на средах с дополнительными питательными веществами. Колония - изолированное скопление бактерий одного вида, выросших на плотной питательной среде в результате размножения одной бактериальной клетки. Колонии бактерий разных видов отличаются друг от друга по своей морфологии, цвету. Для получения изолированных колоний на практике наиболее часто используют модификацию рассева по Дригальскому: материал наносят на поверхность плотной питательной среды ближе к краю и делают «бляшку», затем из неё материал распределяют по четырём квадратам, проводя петлей штирихи, обжигая петлю после засева каждого квадрата.

Температура культивирования. Патогенные бактерии вариабельны в отношении температур, оптимальных для их роста, но большинство из них мезофиллы, исключение составляют некоторые атипичные микобактерии, возбудители чумы, листерии и лептоспиры (t - 20-30 °C), а также *Campylobacter jejuni* (t - 42 °C). **Состав газовой среды.** Бактерии четко разделяются по отношению к содержанию кислорода в атмосфере культивирования. Аэробы. Посевы аэробных бактерий культивируют в термостатах. Некоторые факультативно анаэробные виды можно культивировать при атмосферном воздухе, но оптимально помещение посевов в эксикаторы, куда вносят горящую свечу; после её выгорания в атмосфере снижается содержание кислорода и повышается содержание CO₂. **Методы культивирования.** При выращивании бактерий применяют стационарный способ, способ глубинного культивирования с аэрацией и метод проточных питательных сред. Стационарный способ — состав сред остается постоянным, микроорганизмы выращивают на поверхности плотной или в тонком слое жидкой среды, и кислород поступает к ним непосредственно из воздуха.

Работа 1

Задание. Осуществить культивирование аэробных микроорганизмов в термостате.

На чистую чашку Петри с плотной питательной средой осуществить посев исследуемого материала, чашку с посевом убрать в термостат.

Контрольные вопросы: 1. Условия культивирования аэробных микроорганизмов. 2. Понятия «колония», «штамм», «чистая культура», «посев», «рассев».

Материалы и оборудование: стерильные биологические пробирки с ватными пробками, засеянные культурой микроорганизмов, стерильные чашки Петри с МПА, бактериологические петли, термостат, спиртовки.

Для культивирования анаэробных микроорганизмов необходимо создание бескислородных условий, достигаемое различными методами.

Физические методы основаны на создании вакуума в специальных аппаратах - анаэростатах. Иногда воздух в них заменяют каким-либо другим газом, например CO₂. Доступ кислорода в питательную среду можно затруднить, если культивировать анаэробов в глубине столбика сахарного агара или среды Вильсона — Блера, налитых в пробирки в расплавленном состоянии и остуженных до 43°C. По методу Вейона-Виньяля расплавленный и остуженный агар с посевным материалом набирают в стеклянные трубочки, которые запаивают с двух концов.

Химические методы заключаются в том, что при культивировании исследуемого материала на плотных средах в эксикатор помещают химические вещества, например пирогаллол и щелочь, реакция между которыми идет с поглощением кислорода. В жидкие питательные среды можно добавлять различные редуцирующие вещества: аскорбиновую или тиогликоловую кислоту.

Биологический метод основан на одновременном культивировании аэробов и анаэробов на плотных питательных средах в чашках Петри, герметически закупоренных. Вначале кислород поглощается растущими аэробами, посевянными на одной половине среды, а затем начинается рост анаэробов, посев которых сделан на другой половине. Наиболее удобна для культивирования анаэробов специальная среда Кита-Тароцци. В нее входят сахарный МПБ, который наливают в пробирки в количестве 10-12 мл, и кусочки вареных паренхиматозных органов. Перед употреблением среду Кита-Тароцци кипятят на водяной бане для удаления растворенного в ней кислорода. Среду заливают сверху стерильным вазелиновым маслом. Заметный рост анаэробов (помутнение) может наблюдаться через 48 ч и более в зависимости от количества посевного материала.

Рост изолированных колоний анаэробов можно получить при рассеве исследуемого материала по поверхности кровяно-сахарного агара, разлитого в чашки Петри. После посева чашки помещают в анаэростат. Исследуемый материал в убывающей концентрации можно засевать в высокий столбик агара. Образовавшиеся отдельные колонии анаэробов выделяют, распилив пробирку в месте роста. Колонии анаэробов для получения значительного количества биомассы отсевают затем на среду Кита-Тароцци. В качестве источника энергии для анаэробов используют глюкозу, добавление которой в питательную среду обязательно.

При культивировании анаэробов посевы исследуемого материала выращивают на специальных средах в анаэробных условиях, исключающих доступ к ним свободного кислорода. Питательные среды, используемые для культивирования анаэробов: Шедлер-агар, Шедлер-бульон. Среда Кита-Тароции — питательный бульон с глюкозой и кусочками свежих органов животных, которые обладают редуцирующей способностью. Сверху среду заливают слоем стерильного масла. Среда контроля стерильности (СКС) — 0,3% агар с добавлением тиогликоловой кислоты (редуцент кислорода), посев уколом. Среда Вильсона — Блер — высокий столбик питательного агара с добавлением солей натрия и железа, посев уколом. Анаэробы образуют черные колонии в глубине столбика за счет химической реакции с солями металлов.

Анаэробиоз создают, используя анаэростат или эксикатор. Анаэростат представляет собой толстостенную металлическую емкость, куда помещают чашки Петри или пробирки с засеванными микроорганизмами. Система газоотводных трубок и вакуумметр позволяют откачивать из емкости воздушную смесь, одновременно замещая ее инертным газом (гелием), и замерять давление. Современные анаэростаты представляют собой пластиковую емкость с плотно притертой крышкой, в которую для удаления воздуха помещают

газорегенераторные пакеты. Эксикатор – толстостенная стеклянная емкость с притертой крышкой и подставкой для чашек Петри. На дно эксикатора ставится горящая свеча либо наливается тиогликолевая кислота (химический редуцент кислорода), затем крышка притирается.

Работа 2

Задание. Приготовить специальные среды для культивирования анаэробов.

Вильсона-Блера среда - железосульфитный агар для выделения анаэробов.

К 100 мл стерильного расплавленного и охлажденного до 80°C щелочного 3% МПА доливают 10 мл 20% свежеприготовленного стерильного р-ра натрия сульфита и 1 мл 8% р-ра железа хлорида, приготовленного на стерильной воде. Среду разливают в пробирки высоким столбиком и без стерилизации ставят в термостат при 37°C на сутки для проверки стерильности. Материал засевают уколом в столбик или в расплавленную и охлажденную среду. Патогенные и условно-патогенные анаэробы образуют в среде колонии черного цвета или дают сплошное почернение среды.

Среда Китт-Тароцци с углекислым кальцием. В пробирки или флаконы, предназначенные для среды Тароцци, добавляют на дно щепотку углекислого кальция, стерилизуют горячим воздухом по [ГОСТ 26668-85](#), закладывают в них кусочки мяса или печени и заливают мясо-пептонным бульоном с глюкозой, приготавливая среду. Применяют для анаэробных микроорганизмов, для посева кислотных консервированных продуктов.

Среда Китт-Тароцци с углекислым кальцием, дрожжевым экстрактом и аскорбиновой кислотой.

Готовят среду Китт-Тароцци с углекислым кальцием, но в мясо-пептонный бульон перед фасовкой вносят 2 г дрожжевого экстракта или 10 см³ раствора дрожжевого экстракта. Перед анализом в регенерированную среду Китт-Тароцци с углекислым кальцием и дрожжевым экстрактом асептически вносят аскорбиновую кислоту из расчета 100 мкг на 1 дм³ среды. Применяют для мезофильных и термофильных анаэробных микроорганизмов. Для внесения аскорбиновой кислоты в среду раствор разводят в стерильной дистиллированной воде в 100 раз и 0,2 см³ приготовленного раствора вносят на 1 дм³ среды.

Работа 3.

Задание: проанализировать различные методы создания анаэробных условий. Заполнить таблицу.

Таблица

Методы создания анаэробных условий

Метод, среда	Условия создания анаэробиоза
Физический	
Химический	
Биологический	
Специальные среды: Китта-Тароцци	
Вильсона-Блер	
СКС (среда контроля стерильности)	

Контрольные вопросы: 1. Методы создания анаэробных условий для культивирования бактерий. 2. Состав элективных питательных сред для анаэробных бактерий.

Изучение морфологии колоний бактерий и дрожжей

На поверхности плотных питательных сред микроорганизмы могут расти в виде колонии, штриха и сплошного газона. Колонией называют изолированное скопление клеток одного вида, выросшее в большинстве случаев из одной клетки. При описании колонии отмечают следующие её признаки: форму, величину, цвет, поверхность, профиль, край, консистенцию.

По форме колонии бывают округлые, амёбовидные, неправильные, ризоидные и т.д. (рис. 7).

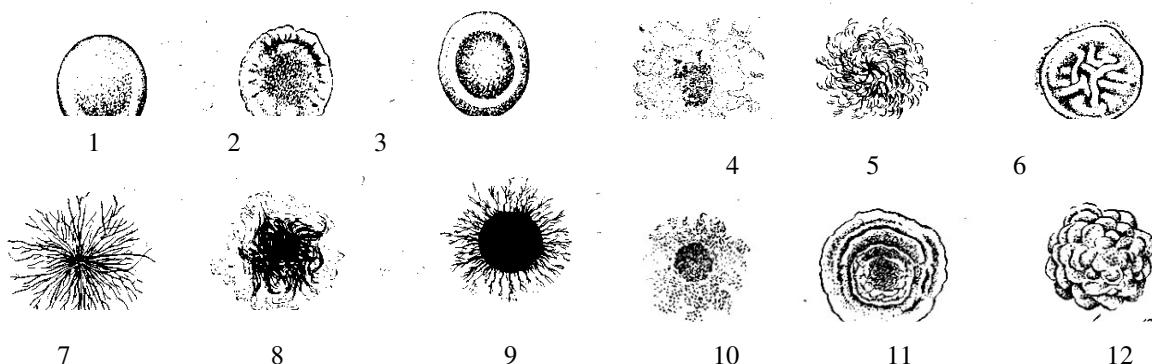


Рис. 7. Форма колоний: 1- круглая; 2- круглая с фестончатым краем; 3- круглая с валиком по краю; 4, 5- ризоидные; 6- с ризоидным краем; 7- амебовидная; 8- нитевидная; 9- складчатая; 10- неправильная; 11- концентрическая; 12- сложная. м, конусовидным и т. д. (рис. 8).

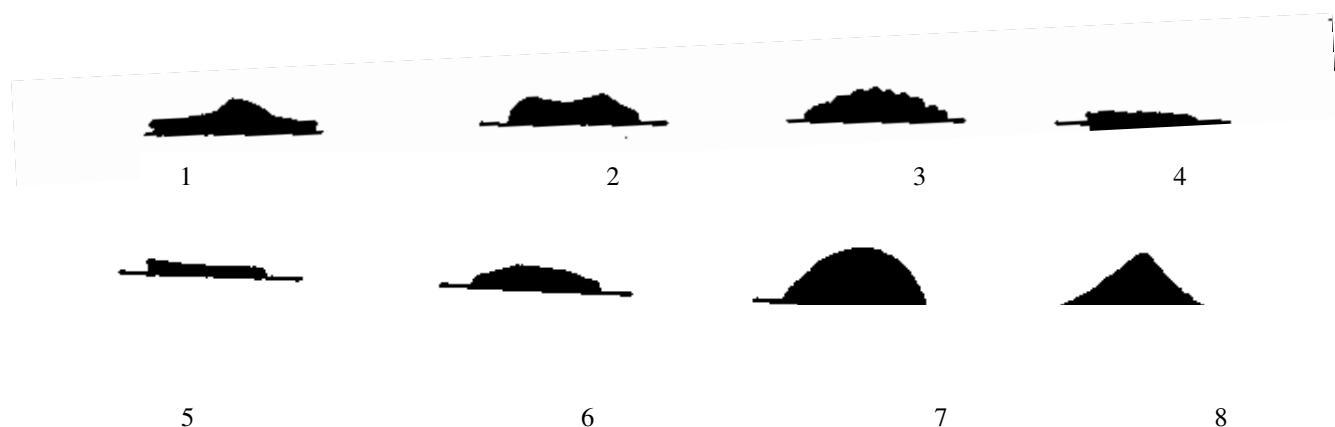


Рис. 8. Профиль колонии: 1- изогнутый; 2- кратерообразный; 3- бугристый; 4- вратающий в субстрат; 5- плоский; 6- выпуклый; 7- каплевидный; 8- конусовидный.

Структура колонии может быть однородной, мелкозернистой, крупнозернистой и т.д (рис. 9).

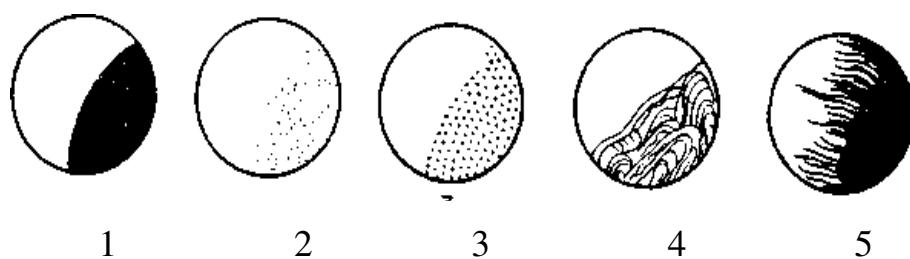


Рис. 9. Структура колонии: 1- однородная; 2- мелкозернистая; 3- крупнозернистая; 4- струйчатая; 5- волокнистая.

Характер края колонии определяют при рассмотрении её под лупой или под микроскопом при малом увеличении. Он может быть ровным, волнистым, зубчатым, бахромчатым и т.д. (рис.10).

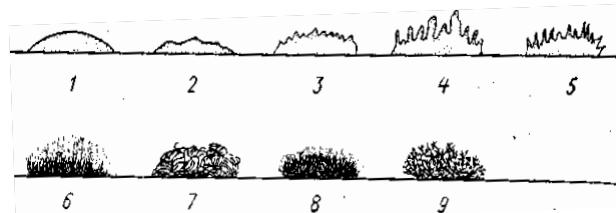


Рис. 10. Край колонии: 1- гладкий; 2- волнистый; 3- зубчатый; 4- лопастной; 5- неправильный; 6- реснитчатый; 7- нитчатый; 8- ворсинчатый; 9- ветвистый.

Величина колонии определяется её диаметром в мм. Мелкие колонии имеют диаметр 1-2 мм, средние 2-4 мм, крупные – более 4 мм. Колонии менее 1 мм в диаметре называют точечными. Размер (диаметр) колонии измеряют с помощью обычной линейки или окулярного микрометра при малом увеличении микроскопа. Чашки при этом помещают на столик микроскопа крышками вниз.

Цвет колонии зависит от выработки определённого пигмента. Например, колонии бактерий *Xanthomonas campestris* обычно имеют желтый цвет благодаря образованию пигментов «ксантомонадинов», которые имеют уникальное строение и представляют собой бромзамещенные арильные полиены. Особо отмечают выделение пигмента в субстрат.

Поверхность колонии изучают с помощью лупы или под микроскопом при малом увеличении. Поверхность колонии бывает гладкой, шероховатой, складчатой, морщинистой, с концентрическими кругами и т. д.

Консистенцию колонии определяют, прикасаясь к её поверхности пальцем. По консистенции различают следующие колонии:

- пастообразные, легко снимающиеся и размазывающиеся по поверхности питательной среды, наподобие сливочного масла;
- вязкие или слизистые, снимающиеся и тянущиеся за пальцем;
- волокнистые, снимающиеся с поверхности питательной среды в виде упругой пленки;
- хрупкие, сухие, распадающиеся от прикосновения пальцев.

Колонии продуцентов ксантана обычно округлые, 3-4 мм в диаметре, гладкие, маслянистые или клейкие, выпуклые с четко очерченным ровным краем, желтого цвета. Морфология колоний в значительной степени зависит от используемого штамма и среды культивирования.

Колонии актиномицетов часто имеют более сложную форму, мучнистую или бархатистую поверхность и волокнистую консистенцию.

Колонии дрожжей на первый взгляд мало отличаются от бактериальных: они не опущены воздушным мицелием как у актиномицетов и грибов и чаще всего бывают гладкими, густыми и плотными или реже - слизистыми, растекающимися. По цвету они могут быть чисто- белыми, буровато- бежевыми, коричневыми или яркими, окрашенными во все тона желто- оранжево- красного цвета. Колонии дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* пастообразные, кремовые или коричневато- кремовые, обычно с довольно ровной, гладкой, иногда пузырчатой поверхностью, край колоний ровный, иногда лопастной. Форма колоний дрожжей может быть различной.

Работа

Задание. Отобрать 2-3 изолированных колонии, описать их и зарисовать. Результаты занести в следующую таблицу:

Таблица

Морфология колоний исследуемых бактерий и грибов

	Форма	диаметр, мм	внеш	Поверхность	Профиль	рай	Структура	Консистенция	Рисунок

Контрольные вопросы: 1. Признаки, используемые для описания колоний бактерий. 1.1.Форма колоний. 1.2.Профиль колоний. 1.3.Структура колонии. 1.4.Край колонии. 1.5.Поверхность колонии. 1.6.Консистенция колоний.

Изучение характера роста микроорганизмов в жидкой среде

Микроорганизмы при росте в жидких средах могут вызывать помутнение среды, образование пленок или осадка. Обычно указывают степень помутнения среды — слабая, умеренная или сильная. Мутность среды может быть постоянной или временной, однородной, хлопьевидной, с шелковистой волнистостью и т. д. Если образуется пленка, то отмечают ее характер — тонкая, плотная или рыхлая, гладкая, морщинистая или складчатая. При образовании осадка следует отметить его количество (скучный, обильный и т. д.) и консистенцию (плотный, рыхлый, слизистый). Отмечают возраст культуры, состав среды, условия культивирования. В ряде случаев рост микроорганизмов сопровождается появлением запаха, изменением цвета среды, газообразованием. Чтобы установить способность микроорганизмов к газообразованию, в пробирку помещают так называемый «поплавок» — маленькую, запаянную с одного конца трубку. Поплавок помещают в пробирку запаянным концом вверх перед стерилизацией среды, и следят, чтобы он полностью был заполнен средой. Если рост микроорганизмов сопровождается газообразованием, то образующиеся газы скапливаются в поплавке в виде пузырька.

Рост мицелиальных грибов в глубинной культуре происходит в виде мицелиальных агломератов или «шариков» более или менее правильной округлой формы, гладких или пушистых, плотных или полых. Может наблюдаться также дисперсный рост в виде отдельных гиф.

Для актиномицетов характерны два типа роста в условиях глубинного культивирования: хлопьевидный (рыхлые колонии с торчащими во все стороны гифами) и зернистый (несвязанные микроколонии в виде уплотненных шариков).

Работа 1.

Задание. Описать характер роста в жидкой среде бактерий, актиномицетов, дрожжей и мицелиальных грибов.

Контрольные вопросы: 1. Характер роста бактерий и дрожжей в жидкой питательной среде. 2. Характер роста актиномицетов и мицелиальных грибов в жидкой питательной среде.

2.5 Лабораторная работа №5 (2 часа).

Тема: «Выделение чистых культур микроорганизмов. Биохимические свойства микроорганизмов. Идентификация чистой культуры.»

2.5.1 Цель работы: Изучить методы выделения чистой культуры микроорганизмов.

Ознакомиться с методами изучения ферментативной активности микроорганизмов.

2.5.2 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Микроскопы, чашки Петри с МПА, взвесь микроорганизмов в стерильном физ. растворе, среды Гисса, тест на расщепление белков, коммерческие тест-системы для изучения биохимических свойств микроорганизмов, определители Берджи

2.5.3 Описание (ход) работы:

Выделение чистых культур микроорганизмов

При изучении физиолого-биохимических особенностей бактерий, а также для установления их видовой принадлежности необходимо выделить чистую культуру бактерий (культура, полученная из одной клетки и содержит микроорганизмы одного вида).

Метод механического разобщения колоний (Дригальского). Берут 4 чашки Петри со стерильным МПА, в одну из них на поверхность агара наносят каплю исследуемого материала, которую шпателем растирают по поверхности агара. Этим же шпателем, не прокаливая его, растирают поверхность другой чашки, затем третьей и т.д. Чашки помещают в термостат, перевернув вверх дном, чтобы образующийся конденсат не смывал культуру. Самый густой рост будет в первой чашке, в последней обычно получают изолированные друг от друга колонии. Отобрав колонию с характерными признаками и соответствующими морфологическими, тинкториальными свойствами для искомого вида микроорганизма, пересевают ее в пробирки для получения чистой культуры.

Вместо шпателя можно использовать бактериологическую петлю (метод истощающего штриха). В этом случае исследуемый материал наносят петлей в верхнюю часть твердой среды в чашке Петри и аккуратно зигзагообразно проводят петлей по поверхности первой чашки, затем второй, третьей и четвертой чашек.

Метод Пастера (метод разведений) основан на последовательном разведении в 10 пробирках с жидкой питательной средой капли исследуемого материала для того, чтобы получить в последней пробирке чистую культуру. Кох, впервые использовавший в лабораторной практике плотные питательные среды, предложил содержимое каждой пробирки с разным количеством исследуемого материала выливать в отдельную чашку Петри. После инкубации в термостате в последних чашках с наибольшим разведением обнаруживают изолированные колонии. При исследовании воды, молока и других материалов используют методы, предложенные Пастером и Кохом. **Метод Коха** является также наиболее распространенным способом количественного учета микроорганизмов. Каждая колония на чашке с питательной средой вырастает из одной клетки, которая является колониеобразующей единицей (КОЕ).

При выделении спорообразующих микроорганизмов, учитывая стойкость спор при нагревании, исследуемый материал прогревают в водяной бане при 80⁰С в течение 30 мин, при этом все вегетативные формы погибают, а споры сохраняются.

Для выделения чистой культуры подвижных видов бактерий используют метод Мечникова и Шукевича. Каплю исследуемого материала помещают на дно пробирки со склоненным агаром (в конденсационную воду). Подвижный микроорганизмов будет расти вверх по всей поверхности агара.

Накопительной называют культуру в которой преобладают представители одной физиологической группы или одного вида микроорганизмов. Сущность метода накопительных культур связана с созданием элективных условий, которые обеспечивают преимущественное развитие желаемого микроорганизма или группы микроорганизмов из смешанной популяции. Для получения накопительной культуры следует четко представлять физиологические особенности выделяемого микроорганизма.

Работа.

Задание. Выделить чистую культуру микроорганизмов из биологического материала.

На чистую чашку Петри с плотной питательной средой высеивают исследуемый материал по методу Дригальского, чашку с посевом убирают в термостат. Далее студенты получают чашки с ростом изолированных колоний микроорганизмов. Каждую подозрительную колонию отсевают на скошенный агар и микроскопируют (изучают морфологию). По результатам исследований заполняют таблицу.

Таблица

Выделение чистой культуры							
1-й день				2-й день		3-й день	
Исследуемый материал	Микроскопия исследуемого материала (рисунок)	Метод выделения чистой культуры	Преда для посева	Характеристика колоний	Микроскопия колоний (рисунок)	Микроскопия чистой культуры (рисунок)	

Контрольные вопросы: 1. Методы выделения чистых культур, основанные на механическом разобщении. 2. Методы выделения чистых культур подвижных микроорганизмов. 3. Методы выделения чистых культур спорообразующих микроорганизмов. 4. Методы выделения чистых культур, основанные на биологических свойствах микроорганизмов.

Изучение ферментативной активности микроорганизмов.

В пределах семейства у представителей разных родов можно обнаружить как общие для семейства, так и специфические для родов наборы ферментов. У микроорганизмов разных видов в пределах одного рода есть общие (родовые) и специфические для отдельных видов ферменты. Таким образом, каждый вид микроорганизмов характеризуется специфическим набором ферментов, поэтому определение ферментного спектра - важнейший этап идентификации микроорганизмов.

О наличии того или иного ферmenta судят по способности микроорганизмов воздействовать на известный субстрат. Присутствие фермента регистрируют по изменению физического состояния субстрата (разжижение желатины), закислению питательной среды (среды Гисса с углеводами), образованию определенных продуктов метаболизма (индол, сероводород, аммиак) и т.д.

Наиболее распространены следующие методы регистрации ферментативной активности микроорганизмов.

Выявление сахаролитической активности микроорганизмов. В состав дифференциально-диагностических углеводных сред входят различные соединения, которые можно условно назвать сахарами: моносахариды, полисахариды, многоатомные спирты. При утилизации углеводов в качестве конечных продуктов образуются кислоты и газообразные продукты. Соответственно расщепление углевода регистрируют по изменению pH среды и выделению газообразных продуктов. Закисление питательной среды улавливают при помощи различных индикаторов.

Индикатор ВР, входящий в состав сухих сред Гисса, меняет цвет от розового в щелочной среде через серый при нейтральном pH до голубого или ярко-синего в кислой среде.

Индикатор Андрэдэ (кислый фуксин — 0,5 г, 1%-й раствор гидроксида натрия — 16 мл, дистиллированная вода — 84 мл) при закислении дает покраснение среды. В жидких средах Гисса образование газов при утилизации субстрата улавливают при помощи

поплавков («газовок») — стеклянных трубочек, запаянных в верхнем конце и помещенных в пробирки. В «газовках» скапливаются газы, вытесняющие жидкую питательную среду; в полужидких средах Гисса газообразные продукты остаются в толще среды в виде пузырьков.

Ферментация углеводов иногда происходит медленно, поэтому предварительный учет результатов проводят через 24...48 ч, а окончательный - через 10...14 сут инкубирования посевов. Тест с метиловым красным показывает степень закисления среды при расщеплении глюкозы. Метилрот как индикатор срабатывает в диапазоне pH 4,4...6,0. Исследуемую культуру выращивают 2...5 сут в жидкой среде Кларка с глюкозой. Затем на 5 мл среды добавляют пять-шесть капель раствора метилрота. Положительный результат - покраснение среды после внесения индикатора (pH 4,0...5,0).

Протеолитическая активность. Протеолитические ферменты расщепляют белки питательной среды до промежуточных (пептоны, полипептиды, аминокислоты) или конечных (сероводород, индол, аммиак) продуктов.

Протеазы выделяются различными видами бацилл, актиномицетов, мицелиальных грибов и других групп микроорганизмов. Активность внеклеточных протеаз определяют, используя в качестве субстрата желатину, казеин и другие белки. Для определения такого протеолитического фермента, как коллагеназа, проводят посев культуры уколом на мясопептонную желатину (МПЖ). Разжижение МПЖ отмечают визуально. По характеру роста и форме области разжижения можно судить об отношении данного микроорганизма к кислороду (рис.11). В случае строгого аэробиоза разжижение пойдет послойно, начинаясь с поверхности. Менее строгие аэробы вызывают разжижение воронкообразное, факультативные анаэробы - мешковидное разжижение, строгие анаэробы вызывают пузыревидный рост в глубине питательной среды.

Для выявления такого протеолитического фермента, как казеиназа используют молочный агар Эйкмана. Гидролиз казеина обнаруживают по зоне просветления среды вокруг колоний или выросших по штриху микроорганизмов.

Липолитическая активность. Для выявления липолитической активности исследуемые микроорганизмы обычно высевают на среды, содержащие твины - эфиры жирных кислот и сорбита и 0,01% $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Твин-40 содержит пальмитиновую, твин-60- стеариновую, а твин-80 - олеиновую кислоты.

Обнаружение фермента каталазы. Некоторые микроорганизмы - аэробы 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 разлагается на воду и молекулярный кислород при участии фермента каталазы.

Принципы идентификации микроорганизмов. Основная задача бактериологического диагностического исследования — это определение таксономического положения выделенного микроорганизма путем сравнения его свойств со свойствами известных видов.

В рутинной бактериологической практике микроорганизм идентифицируют, изучая его фенотипические признаки (морфологические, тинкториальные, культуральные, биохимические, патогенные). Стало получать распространение некоторые методы идентификации по генотипическим признакам, которые ранее в основном применяли в научной работе для классификации микроорганизмов с неясным таксономическим положением.

В бактериологии для идентификации используют определители микроорганизмов. Наиболее популярный — определитель бактерий Берджи — включает в себя описание свойств известных видов микроорганизмов. Бактерии в этом руководстве по ограниченному числу морфологических и физиологических признаков объединены в большие группы, например группа № 20 «Грамположительные неспорообразующие палочки неправильной формы» или группа № 5 «Факультативно-анаэробные грам-отрицательные

палочки». В пределах этих групп при помощи нескольких дифференцирующих признаков бактерии подразделены на семейства, роды и виды. Распределение микроорганизмов в этом определителе не отражает иерархической классификации, а преследует сугубо практическую цель — как можно быстрее и экономичнее установить таксономическое положение изучаемого микроорганизма.

Идентификация неизвестного микроорганизма представляет собой процесс последовательного его отождествления с той или иной большой группой микробов, характеризующихся общими свойствами, затем с семейством в пределах группы, далее с тем или иным родом в пределах установленного семейства, и на конечном этапе исследуемый микроорганизм отождествляют (идентифицируют) по совокупности морфологических, тинкто либо видом в пределах рода. В случае необходимости внутри вида устанавливают принадлежность культуры к био-, серо-, фаговару. Работа с определителем Берджи предполагает использование достаточно большого количества тестов, характеризующих различные свойства микроорганизма. В практических диагностических лабораториях, исходя из эпизоотологических, клинических и патологоанатомических данных, обычно проводят бактериологические исследования, заранее ориентированные на обнаружение возбудителя определенной инфекционной болезни, по схеме, предусмотренной официальной инструкцией.

Работа 1.

Задание. Ознакомится с тестами, характеризующими ферментативные свойства бактерий.

Работа 2.

Задание. Идентифицировать микроорганизмы с помощью коммерческой тест-системы STAPHYtest16.

STAPHYtest16 предназначен для рутинной идентификации стафилококков и дифференциации их от других родственных граммположительных кокков.

Для идентификации каталазоотрицательных грамположительных кокков в настоящее время фирма Lachema выпускает отдельные тест-системы: STREPTOtest16 для идентификации стрептококков и EN-COCCUStest для идентификации энтерококков.

Для идентификации грамотрицательных ферментирующих бактерий наряду с ENTEROtest 16 в настоящее время предложены модифицированная тест-система ENTEROtest 24 и 2 новые тест-системы для ускоренной идентификации энтеробактерий (4 часа) ENTERO-Rapid 24 и, в основном для уропатогенных культур, ENTERO-Screen.

Для идентификации неферментирующих грамотрицательных бактерий новая тест-система NEFERMtest 24.

Анаэробные микроорганизмы идентифицируют с помощью ANAEROTest 23.

Студенты получают планшеты для идентификации микроорганизмов, результаты идентификации заносят в таблицу.

Таблица

STAPH Ytest16 биохимическая активность, вид	STREPT Otest16 биохимическая активность, вид	ENTER Otest 16 биохимическая активность, вид	NEFER Mtest 24. биохимическая активность, вид	ANAER Otest 23 биохимическая активность, вид

Контрольные вопросы: 1. Какое таксономическое значение имеет определение набора ферментов у микроорганизмов? 2. Как определяются сахаролитические свойства с помощью сред Гисса? 3. Способ определения индола? 4. Способ определения

сероводорода? 5. Способ определения протеолитической активности микроорганизмов. 6. Способ определения каталазной активности микроорганизмов

2.6 Лабораторное занятие №6 (2 часа)

Тема: «Серологические реакции. Оборудование для постановки серологических реакций»

2.6.1 Цель работы: 1. Дать определение серологическим реакциям. 2. Определить цели постановки серологических реакций. 3. Изучить классификацию антигенов и антител, участвующих в серологических реакциях. 4. Познакомить с методикой получения сыворотки крови. 5. Изучить сущность реакции агглютинации и её модификаций. 6. Рассмотреть область применения РА в лабораторной практике. 7. Освоить методы постановки РА пробирочным и капельным методами. 8. Ознакомиться с сущностью РП и ее модификаций. 9. Освоить технику постановки реакции кольцепреципитации (РКП), диффузионной преципитации (РДП).

2.6.2 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Таблицы, антигены, сыворотки, пробирки Флоринского, эмалированная пластина с лунками, пробирки Флоринского, эмалированная пластина с лунками, бруцеллезный антиген, сыворотка бруцеллезная, пастеровские пипетки, пробирки Уленгута, штативы, агар Дифко, трафареты, пробойники

2.6.3 Описание (ход) работы:

Серология как раздел иммунологии занимается постановкой и учетом с серологических реакций. Серологические реакции – это реакции между антигенами и антителами, воспроизведенные вне организма.

Цели постановки серологических реакций:

- по известному антигену обнаружить антитела в сыворотке крови;
- по известной сыворотке обнаружить антигены (чаще всего в патматериале или провести идентификацию выделенной культуры);
- провести исследования напряженности иммунитета;
- для проведения ретроспективной диагностики.

Серологические реакции по конечному взаимодействию АГ и АТ подразделяются на типы:

- осадочные;
- лизирующие;
- нейтрализующие.

Фазы протекания осадочных реакций: 1) специфическая невидимая (происходит образование иммунных комплексов АГ-АТ); 2) неспецифическая видимая (иммунные комплексы выпадают в осадок).

Антигены, участвующие в серологических реакциях подразделяются на корпускулярные или клеточные (в их роли выступают целые микробные клетки или эритроциты) и молекулярно-дисперсные или растворимые (в их роли выступают токсины или отдельные части микробных клеток).

Антитела, участвующие в серологических реакциях, подразделяются на следующие виды:

- агглютинины;
- преципитины;
- бактериолизины;
- гемолизины;
- нейтрализующие.

Одним из компонентов реакций является сыворотка крови. Этапы получения сыворотки:

1) взятие крови из вены в стерильные пробирки (кровь должна стекать в пробирку по стенке); 2) пробирки с кровью помещают в термостат при температуре 37° С на 30-40 мин (для свертывания); 3) обводка (сгусток отделяется от стенок металлической спицей или тонко оттянутой пастеровской пипеткой); 4) пробирки помещаются в холодильник (на 8-12 часов для ретракции сгустка); 5) переливание сыворотки в серологические пробирки стерильные (сыворотка должна быть светло-желтого цвета, прозрачная).

Работа.

Задание. Приготовить сыворотку из крови козы.

Контрольные вопросы: 1. Цели постановки серологических реакций? 2. Как классифицируются антитела, участвующих в серологических реакциях? 3. Как классифицируются антигены, участвующих в серологических реакциях? 4. Каковы этапы приготовления сыворотки из крови?

Агглютинацией называется склеивание микробных или других клеток при воздействии на них специфических антител в присутствии электролитов. Двухфазный характер этого взаимодействия ничем не отличается от механизма других двухкомпонентных реакций иммунитета: первая фаза – соединение бактерий с антителом; вторая – соединение бактерий под влиянием солевого раствора. Антиген, вступающий в реакцию, носит название агглютиногена, антитела сыворотки – агглютинины, а комплекс антигена + антитело, выпадающий при положительной реакции – агглютинат.

Реакция агглютинации используется для серологической диагностики многих инфекционных болезней, в том числе бруцеллеза, сальмонеллеза, колибактериоза, сапа, листериоза, кампилобактериоза и др.

Она проводится для:

- а) обнаружения специфических антител в исследуемых сыворотках;
- б) установления вида (серогруппы, сероварианта) выделенного микроорганизма (антигена) из патологического материала с использованием известных сывороток, содержащих специфические антитела.

Агглютинация происходит при температуре 37°С в слабощелочной солевой среде.

Существует много вариантов постановки реакции агглютинации. Наиболее распространенными методами являются: развернутая реакция агглютинации, которая проводится в пробирках с различными разведениями сыворотки; на предметных стеклах (капельная, пластинчатая: кровяно-капельная гемагглютинация; кольцевая проба (реакция) с молоком, Роз-бенгалевая проба (РБП) и др.).

Компонентами для постановки реакции агглютинации для определения вида микробы с использованием известных специфических сывороток являются:

1. Диагностические агглютинирующие сыворотки.

2. Исследуемый антиген, в качестве последнего используют взвесь микробов. Для этого суточную или 20-часовую изучаемую культуру на скошенном МПА смывают 5 мл 0,85%-ного раствора хлористого натрия и переносят в чистую пробирку.

При постановке капельным методом антигеном служит микробная культура.

3. Физиологический раствор поваренной соли.

Постановка реакции агглютинации пробирочны) методом. В качестве примера выступает РА на бруцеллез с сывороткой крови крупного рогатого скота.

Реакция ставится в объеме 1 мл жидкости. Разлив компонентов реакции проводят индивидуальными мерными пипетками; автоматическими пипетками Флоринского, одиночными (или групповыми).

Для исследования каждой испытуемой сыворотки крови требуется 5 пробирок, поставленных в первый ряд. Количество таких рядов зависит от числа исследуемых

сывороток. В первой пробирке каждого ряда готовят основное разведение 1:25. Для этого к 2,4 мл физиологического раствора вносят 0,1 мл исследуемой сыворотки. После приготовления основного разведения сывороток в остальные 4 пробирки, кроме 2-й, каждого ряда разливают по 0,5 мл физиологического раствора. Затем из первой пробирки из разведения 1:25 вносят 0,5 мл во вторую пробирку, получая разведение 1:50. Из этого разведения готовят разведение 1:100, перенося из одной пробирки 0,5 мл жидкости. Методом последовательного разведения готовят разведение 1:200 и 1:400. Из последней пробирки (1:400) излишek жидкости 0,5 мл удаляют.

Во все пробирки, кроме первой, вносят по 0,5 мл антигена, разведенного 1:10. Таким образом получают ряд из четырех исследуемых пробирок с разведениями сыворотки 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 в объеме 0,5 мл. Первая пробирка с сывороткой в разведении 1:25 без антигена служит контролем качества сыворотки. При наличии хлопьев, фибрина, эритроцитов и посторонних примесей результаты агглютинации не учитываются.

При постановке РА одновременно с исследуемыми сыворотками ставят контроля:

- с негативной (отрицательной) сывороткой в тех разведениях, как с исследуемыми;
- с позитивной (положительной) сывороткой в разведениях до ее предельного титра;
- контроль антигена (0,5 мл физиологического раствора с 0,5 мл разведенного антигена) для исключения спонтанной агглютинации.

После разлива всех компонентов штативы с пробирками осторожно стряхивают и помещают в термостат при 37-38°C на 16-20 ч, затем выдерживают при комнатной температуре в течение 1 ч и проводят учет реакции.

Результаты реакции учитывают визуально и определяют ее степень в плюсах:

(++) – полное просветление жидкости, на дне осадок в виде «зонтика», при легком встряхивании осадок разбивается на мелкие зерна, а жидкость остается прозрачной (100%-ная агглютинация);

(++) – неполное просветление жидкости, «зонтик» хорошо выражен, при встряхивании – мелкие зерна (75%-ная агглютинация);

(++) – незначительное просветление жидкости, «зонтик» умеренно выражен, при встряхивании мелкие зерна (50%-ная агглютинация);

(+) – едва заметное просветление жидкости, «зонтик» выражен слабо, при встряхивании заметно небольшое количество зерен (25%-ная агглютинация);

(-) – просветление жидкости, образования «зонтика» не наступило, на дне пробирки видна «пуговка» осевших микробов, при легком встряхивании образуется равномерная взвесь.

За титр антител принимают последнее разведение сыворотки, в котором произошла агглютинация не менее чем на два плюса (++) .

Реакцию считают положительной при наличии агглютинации с сывороткой крупного рогатого скота с оценкой не менее чем два плюса (++) в разведении 1:100 и выше.

Реакцию считают сомнительной при наличии агглютинации только в разведении 1:50 с сыворотками крупного рогатого скота с оценкой не менее чем на два (++) .

Для определения природы антител в исследуемом материале предложено несколько модификаций проведения реакции агглютинации.

Применяется КР с целью проверки благополучия стад на бруцеллез крупного рогатого скота и для проверки молока при продаже его на рынках.

Компонентами реакции являются:

- исследуемое молоко;
- антиген цветной бруцеллезный для кольцевой реакции с молоком, который представляет собой стандартизованную взвесь убитых бруцелл, окрашенных гематоксилином в синий цвет;
- сыворотка позитивная бруцеллезная.

В агглютинационные пробирки берут по два мл молока и добавляют по 0,1 мл антигена, затем пробирки тщательно встряхивают для перемешивания молока с

антителом. При каждой постановке реакции одновременно с испытуемыми пробами молока ставят контроли: с молоком от заведомо здоровой коровы; со смесью молока здоровой коровы и позитивной бруцеллезной сыворотки (0,05 мл сыворотки на 1 мл молока). Штативы с испытуемыми и контрольными пробами молока помещают в водяную баню или термостат при 37-38°C на 1 час. Если в молоке имеются бруцеллезные антигены, то они образуют с антигеном комплекс, который адсорбируется на капельках жира и при отстаивании всплывают вверх, образуя синее кольцо (остальная часть молока остается белой) – реакция положительная. При отрицательной реакции столбик молока остается равномерно окрашенным в первоначальный синий цвет, который был получен сразу после добавления к нему антигена, а слой сливок – белого или слегка желтоватого цвета.

Капельный метод РА применяют в основном для идентификации культур бактерий, а также для установления их принадлежности к определенным серогруппам и серовариантам. Так поступают при диагностике колибактериоза и сальмонеллезов. Техника постановки РА сводится к следующему. На предметное стекло наносят каплю сыворотки и каплю физиологического раствора (контроль). Петлю с бактериальной культурой увлажняют в капле сыворотки, затем культуру тщательно растирают рядом с каплей, смешивают с сывороткой и энергично 6-10 раз покачивают стекло круговыми движениями. Агглютинация наступает сразу или не позднее 1-2 мин. Реакцию агглютинации учитывают при хорошем освещении. Пользование лупой облегчает учет реакции.

Агглютинация проявляется в виде склеивания бактериальной массы и полного или частичного просветления жидкости.

При отрицательной реакции культура после тщательного смешивания с каплей сыворотки образует гомогенную взвесь. То же самое должно быть при проведении контроля (антиген + физиологический раствор).

Роз-бенгал проба (РБП)

Пластинчатую реакцию агглютинации с бруцеллезным роз-бенгал антигеном применяют для исследования сывороток крови при диагностике бруцеллеза у многих видов животных.

Компонентами РБП являются:

- испытуемые сыворотки крови;
- бруцеллезный антиген для РБП, изготовленный на биопредприятиях, представляет собой стандартизированную суспензию в буферном растворе инактивированных нагреванием и фенолом бруцелл, окрашенных бенгальским розовым в розовый цвет;
- позитивная бруцеллезная и негативная сыворотки;
- 0,5%-ный карболизированный физиологический раствор.

Реакцию проводят на чистых сухих эмалированных пластинках с лунками при температуре 18-30°C. Исследуемые сыворотки крови в дозе 0,03 мл вносят на дно лунки. При исследовании сывороток крупного рогатого скота, лошадей, верблюдов, свиней в каждую лунку рядом с сывороткой вносят 0,03 мл антигена, а при исследовании сывороток других животных – 0,015 мл, тщательно смешивают покачиванием и легким вращением в течение 4 мин. Одновременно проводят контроли антигена с позитивной и негативной сыворотками, с физраствором.

Реакцию считают положительной при выраженной агглютинации окрашенных бруцелл в виде мелких или крупных хлопьев розового цвета, выделяющихся на белом фоне лунки. Реакцию считают отрицательной при отсутствии агглютинации (смесь гомогенна, равномерно окрашена).

Работа.

Задание. Провести постановку и учет результатов пробирочной РА, РБП, кольцевой РА с молоком. Заполнить таблицу.

Таблица

Вид серологической реакции	Результат реакции

Контрольные вопросы: 1. Опишите сущность феномена агглютинации? 2. Каким образом неизвестный микроорганизм идентифицируется в РА? 3. Как определить титр сыворотки в пробирочной РА?

Реакция преципитации (РП), как и реакция агглютинации, принадлежит к разряду серологических реакций осадочного типа, но в отличие от РА в ней используют не корпускулярные, а растворимые антигены микроорганизмов. Образование комплексов антиген - антитело сопровождается изменением оптической плотности среды (помутнением) - преципитацией (от лат. *praecipitatio* - падение вниз), что расценивают как положительный результат реакции.

Антиген для РП готовят из чистых культур микроорганизмов, если антиген предназначен для серодиагностики, или из тканевого материала, содержащего микроорганизмы, если РП ставят, чтобы при помощи известной иммунной сыворотки обнаружить возбудитель в патологическом материале.

Физические методы экстрагирования антигенов основаны на механическом разрушении микробных клеток посредством растирания с кварцевым песком, встряхивания на шюттель-аппарате в колбе со стеклянными шариками, многократного замораживания и оттаивания или воздействия ультразвуком. Полисахаридные термостойкие антигены выделяют термической обработкой (кипячением, автоклавированием).

Из химических методов получения антигенов достаточно широко используют экстрагирование трихлоруксусной кислотой (полный антиген Буавена); кислотный или щелочной термогидролиз — прогревание материала, например, в 1%-м растворе уксусной кислоты или 0,1 н. растворе гидроксида натрия; экстрагирование при помощи ацетона, мочевины, этилового спирта, эфира и других растворителей; часто применяют различные детергенты — дезоксихолат натрия, лаурилсульфат натрия и т.д.; используют методы ферментативного разрушения микробных клеток, например, посредством воздействия трипсином.

На основе феномена преципитации разработаны реакция кольцепреципитации (РКП), реакция диффузионной преципитации (РДП), радиальной иммунодиффузии; принцип реакции преципитации использован в иммуноэлектрофорезе и встречном иммunoэлектрофорезе.

Реакция кольцепреципитации (РКП)

Известна по имени автора как реакция Асколи (1911); разработана для диагностики сибирской язвы. РКП используют в ветеринарной диагностической практике преимущественно для выявления микробных антигенов в тканевом материале. Обязательное условие постановки РКП — прозрачность раствора антигена и иммунной сыворотки, поэтому при необходимости компоненты реакции освобождают от взвешенных частиц фильтрованием, например, через асбестовую вату.

Техника постановки РКП включает в себя три варианта.

Метод «наслаждания» антигена. В уленгутовские пробирки (диаметр 2...3 мм) вносят пастеровской пипеткой с тонким капилляром, не смачивая стенок пробирки, 0,3...0,4 мл иммунной преципитирующей сыворотки. Затем по стенке пробирки осторожно насыпают на поверхность сыворотки 0,1...0,2 мл растворимого исследуемого антигена (преципитиногена). Смешивания компонентов не происходит благодаря различию плотности сыворотки и экстракта.

Учет результатов проводят на фоне темной бумаги. Через 1...2мин в зоне взаимной диффузии антигена и антител, на границе контакта компонентов, происходит помутнение среды, видимое сбоку как серо-белый диск (преципитат).

Метод «подслайвания» антител. В пробирку вначале вносят антиген, а затем осторожно при помощи пастеровской пипетки на дно пробирки, под антиген, «подслаивают» иммунную сыворотку.

При постановке кольцевой РП в ходе исследования тканевого материала необходимы следующие контроли: 1) иммунная сыворотка + стандартный антиген; 2) иммунная сыворотка + физиологический раствор; 3) иммунная сыворотка + экстракт из тканей здоровых животных.

Показания РП считают достоверными, если в первом контроле получают положительный, а в остальных - отрицательный результат.

Микровариант РКП. Разработан для экономии компонентов. В этом случае используют стеклянные капилляры или тонко оттянутые кончики пастеровских пипеток диаметром 0,5-1 мм. Капилляр опускают одним концом во флакон с преципитирующей сывороткой, набирают ее на высоту 1...1,5 см, закрывают верхнее отверстие капилляра указательным пальцем. Затем ватой удаляют излишек сыворотки с наружной стороны капилляра, погружают его в раствор антигена и набирают равное количество антигена. Капилляр переворачивают с таким расчетом, чтобы смесь сыворотки и антигена оказалась в середине капилляра, после чего закрепляют вертикально в пластилиновой пластинке. Результаты учитывают, как и при обычной РКП.

Реакция диффузионной преципитации (РДП)

Основана на встречной диффузии антител (иммунной сыворотки) и растворимых антигенов в агаровом геле (двойная диффузия). Если антиген состоит из смеси моноантител, то каждый из них диффундирует с различной скоростью и точки эквивалентных соотношений каждого антигена и гомологичных антител будут находиться в различных участках агарового геля, где и формируется преципитат в виде линий. Таким образом, каждая пара антиген — антитело образует свою линию преципитации. При помощи РДП можно анализировать сложные антигенные смеси, поскольку каждый антиген дает свою линию преципитации. В ряде случаев РДП используют как метод серологической диагностики инфекционных болезней.

Из очищенного агара фирмы «Дифко» готовят 1,5%-й раствор агара в физиологическом растворе (рН 7,2-7,4) с добавлением мертиолата (конечное разведение 1:10 000) как консерванта.

На хорошо обезжиренное стекло, лежащее строго горизонтально, наливают расплавленный агар в количестве, достаточном для формирования слоя геля толщиной 3...4 мм. Затем штампами вырезают лунки в агаровом геле; агар из лунки удаляют с помощью трубочек. На дно лунки вносят каплю горячего агара с последующим его удалением, что создает «дно» лунки и предотвращает подтекание компонентов под гель.

В зависимости от конкретной задачи применяют штампы с различным количеством пробойников, обеспечивающие получение лунок разного диаметра и на разном расстоянии. При изучении неизвестных реагентов оптимальное расстояние между лунками необходимо установить в предварительных опытах. В зависимости от конкретной задачи в центральную лунку вносят иммунную сыворотку, в периферические — анализируемые антигены или наоборот. Сыворотка и антиген не должны выходить за пределы лунки на поверхность агара. Затем пластины помещают в эксикатор. На дно эксикатора наливают небольшое количество воды с антисептиком. Пластины с компонентами выдерживают при комнатной температуре 10-72 ч.

Учет результатов: полосы преципитации образуются только в зоне эквивалентности, т. е. там, где все антитела связаны с антигеном. (Если в жидкой среде соединить эквивалентные количества реагентов, то в надсадочной жидкости после формирования преципитата не будет свободных антигена и антител.)

При изучении в РДП различных антигенов возможны три варианта результата реакции:

1. Реакция идентичности: слияние линий преципитации, относящихся к двум соседним антигенам (у сравниваемых антигенов гомологичные детерминанты - антигены оценивают как идентичные).

2. Реакция неидентичности: пересечение линий преципитации (у сравниваемых антигенов нет гомологичных антигенных детерминант).

3. Реакция неполной идентичности: неполное пересечение линий преципитации с формированием так называемой «шпоры». Такая картина возникает, когда у одного из антигенов помимо гомологичных есть и специфические детерминанты, которые второй антиген в составе своей молекулы не несет.

Работа.

Задание. Поставить РКП и РДП, произвести учет, заполнить таблицу.

Таблица

Модификация РП	Учет результатов

Контрольные вопросы: 1. В чем сущность феномена преципитации? 2. Техника постановки кольцевой РП. 3. Техника постановки РДП.

2.7 Лабораторное занятие №7 (2 часа)

Тема: «Методы лабораторной диагностики. Изучение морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических свойств возбудителей сибирской язвы, колибактериозов»

2.7.1 Цель работы: 1. Изучить этапы лабораторной диагностики колибактериоза. 2. Рассмотреть биологические свойства возбудителей колибактериоза. 3. Изучить биопрепараты. 4. Изучить лабораторную диагностику сибирской язвы.

2.7.2 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Микроскопы, горелки спиртовые, штативы, набор красок для окрашивания по Граму, пробирки и чашки Петри с культурами *E. coli*, бактериологические петли, стекла с лунками, термостат, набор сывороток для серотипизации, готовые пропараты с возбудителем сибирской язвы, штативы, пробирки и чашки Петри с культурами *B. subtilis*, биопрепараты.

2.7.3 Описание (ход) работы:

Эшерихиоз (колибактериоз) – это острая инфекционная болезнь. Проявляется профузным поносом, признаками тяжелой интоксикации и обезвоживанием организма. Болеет молодняк сельскохозяйственных животных многих видов, включая птиц. Эшерихиоз может протекать в энтеритной, септической и энтеротоксемической формах.

Возбудители колибактериоза (эшерихиоза) 0 патогенные варианты бактерии. *E. coli*, род *Escherichia*, семейство *Enterobacteriaceae*.

При энтеритной форме болезни возбудитель локализуется, в кишечнике и регионарных брыжеечных лимфоузлах; при септической форме 0 в крови, внутренних органах и тканях; при энтеротоксемической 0 в тонком отделе кишечника и брыжеечных лимфоузлах. Считают, что ведущая роль в развитии эшерихиоза принадлежит кишечным палочкам, адгезивные антигены которых (K 88, K 99, F 41, 987 P, A 20 и др.) обеспечивают прикрепление бактерий к эпителиальным клеткам тонкого отдела кишечника с последующим их размножением в клетках, производствием энтеротоксинов и проникновением сначала в регионарные лимфоузлы, а затем в кровь.

Эшерихии в своем составе содержат 164 варианта О-антитела, 55 вариантов Н-антитела и 90 вариантов К-антитела.

О-Антитело (соматический) термостабильный, состоит из полисахаридно-липидного-протеинового комплекса, который определяет серогрупповую принадлежность бактерий (известно свыше 160 серологических групп эшерихий).

У поросят-отъемышей энтеротоксемическая форма колибактериоза называется отечной болезнью.

Лабораторная диагностика эшерихиоза основана на результатах бактериологического исследования. Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии, выделение чистой культуры, идентификацию возбудителя на уровне вида и определение его принадлежности к группе патогенных вариантов.

Материал для исследования. Для приживленной диагностики колибактериоза в лабораторию направляют фекалии больных животных (не менее чем от 5 животных с одной фермы), не подвергавшихся лечению антибактериальными препаратами. Пробы фекалий массой 1-2 г от каждого животного берут из прямой кишки в стерильные пробирки с помощью прокипяченного резинового катетера.

Микроскопия мазков из исходного материала. Мазки-отпечатки окрашивают по Граму.

E. coli - палочковидная грамотрицательная бактерия размером (0,3-1) x (1...6) мкм со жгутиками (за редким исключением), спор и капсул не образует. Микробные клетки располагаются одиночно, парно или в виде коротких цепочек.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. *E. coli* - факультативный анаэроб, температурный оптимум 37-38 °С, pH 7,2-7,4, к питательным средам нетребователен. Посевы из паренхиматозных органов делают на среду Эндо или Левина методом отпечатков или наносят материал на поверхность среды пастеровской пипеткой и равномерно растирают шпателем.

Пробы фекалий (не более 0,5 г) или соскобы со слизистой оболочки кишечника от каждого животного помещают в отдельную стерильную пробирку, затем разводят в 10 мл стерильного физиологического раствора, тщательно перемешивают и выдерживают 10-15 мин при комнатной температуре для осаждения крупных частиц. Надосадочную жидкость засевают бактериологической петлей в чашки со средой Эндо или Левина для получения изолированных колоний. Для колоний эшерихий характерно следующее: круглые, с ровными краями, с гладкой выпуклой поверхностью, размером 2-4 мм, малинового цвета - на среде Эндо и темно-фиолетового - на среде Левина. Иногда у колоний отмечают металлический блеск.

Колонии пересевают на МПА и среду Минка. При поддержании на обычных средах эшерихий быстро утрачивают адгезивные факторы, при культивировании на среде Минка - сохраняют. В состав указанной среды входят буфер (pH 7,5), соли магния, марганца, хлорид железа, хлорид кальция, гидролизат лактальбумина, глюкоза, агар. При подозрении на отечную болезнь поросят дополнительно делают высев на кровяной МПА, поскольку штаммы, вызывающие эту патологию, обычно синтезируют бета-гемолизин.

При обнаружении бактерий, типичных по морфологическим, тинкториальным и культуральным свойствам для *E. coli* биохимические свойства не изучают, а сразу исследуют в РА на стекле с агглютинирующими антиадгезивными сыворотками, вначале с комплексной, а затем при получении положительного результата с моновалентными сыворотками. Культуры, выросшие на МПА, проверяют с сыворотками K 88, 987 Р и A 20, культуры со среды Минка - с сыворотками K 99 и F41. При положительной РА культуры относят к возбудителям эшерихиоза и на этом заканчивают их дальнейшее изучение.

При отсутствии эшерихий с адгезивными антигенами культуру идентифицируют на основании изучения ферментативных признаков. Для *E. coli* характерно расщепление глюкозы и лактозы с образованием кислоты и газа, выделение индола, отсутствие уреазы

и неспособность утилизировать цитраты. У культур, идентифицированных как *E. coli*, устанавливают О-серогрупповую принадлежность как косвенный показатель патогенности или изучают патогенность в биопробе на белых мышах, цыплятах.

О-Серогруппу эшерихий устанавливают следующим образом. Культуры, выращенные на скошенном МПА при 37°C в течение 18-20 ч, смывают физиологическим раствором, переносят в сухие стерильные пробирки, прогревают в водяной бане при 100 °C 1 ч для разрушения поверхностных термолабильных L- и В-антител или автоклавируют при 120°C 2 ч для разрушения термостабильного А-антитела. Прогретую взвесь бактерий центрифугируют при 2000-3000 мин-1 10-15 мин и осадок используют в качестве антигена для постановки РА на стекле. Оставшуюся часть антигена разводят стерильным физиологическим раствором до концентрации клеток $5 \times 10^3/\text{мл}$ и ставят пробирочную РА.

Определение серогрупповой принадлежности культур начинают с постановки РА на стекле с групповыми поливалентными сыворотками: на чистое обезжиренное стекло наносят по капле поливалентные сыворотки. В каждую каплю петлей вносят осажденную центрифугированием культуру, и хорошо смешивают, результат учитывают в течение 3 мин. Положительная реакция характеризуется образованием мелкозернистого агглютината и просветлением жидкости. При отрицательном результате вся капля остается мутной.

Антител, агглютинирующийся одной из поливалентных групповых сывороток, исследуют в РА на стекле с моновалентными сыворотками, разведенными в соотношении 1:10 и входящими в состав данной поливалентной сыворотки. Затем с моновалентной сывороткой, давшей положительную реакцию, ставят РА в пробирках в объеме 1 мл. Сыворотку разводят физиологическим раствором 1 : 25 до титра, указанного на этикетке: сначала готовят исходное разведение - к 2,4 мл физиологического раствора добавляют 0,1 мл сыворотки, в остальные пробирки разливают по 0,5 мл физиологического раствора, из исходного разведения переносят 0,5 мл смеси во вторую, перемешивают, из второй - в третью и т.д., из последней пробирки удаляют 0,5 мл смеси, из первой - 1,5 мл. Во все пробирки добавляют по 0,5 мл антигена. Одновременно ставят контроли.

Биопроба. Готовят суспензию культуры в физиологическом растворе с концентрацией клеток $1 \cdot 10^9/\text{мл}$ по бактериальному стандарту мутности и вводят по 0,5 мл внутрибрюшинно трем белым мышам массой 14-16 г и трем цыплятам трех-четырехнедельного возраста (при исследовании материала от птиц). В случае гибели двух зараженных мышей и более или цыплят выделенную культуру считают патогенной.

Биопрепараты. Вакцина поливалентная гидроокисьальюминиевая формолтиомерсаловая против колибактериоза (эшерихиоза) поросят, телят и ягнят, вакцина поливалентная против сальмонеллеза и колибактериоза пушных зверей, коли-протектан ВИЭВ.

Сыворотка поливалентная против колибактериоза (эшерихиоза) сельскохозяйственных животных.

Работа.

Задание. Изучить морфологические, тинкториальные, культуральные и ферментативные свойства *E. coli*. По результатам работы заполнить таблицу.

Таблица

Морфологические свойства <i>E. coli</i> .	Культуральные свойства <i>E. coli</i> .	Биохимические свойства <i>E. coli</i> .

Контрольные вопросы: 1. Какие дифференциально-диагностические среды применяют для выделения *E. coli*? 2. Каковы основные биохимические свойства *E. coli*? 3. Как определяют патогенность *E. coli*?

Сибирская язва (Anthrax) - зооантропоноз. К ней восприимчивы животные многих видов, особенно травоядные, и человек. Болезнь протекает преимущественно остро с явлениями септицемии или с образованием различной величины карбункулов. Регистрируют в виде спорадических случаев, возможны энзоотии и эпизоотии.

Возбудитель сибирской язвы - *Bacillus anthracis* - относится к семейству *Bacillaceae*.

Морфология. *Bacillus anthracis* - неподвижная, грамположительная (в молодых и старых культурах встречаются и грамотрицательные клетки), образующая капсулу (в организме или при культивировании на искусственных питательных средах с большим содержанием нативного белка и CO₂) и спору палочки, размером 1-1,3 x 3,0-10,0 мкм. При температуре ниже 12 и выше 42°C, а также в живом организме или невскрытом трупе, в крови и сыворотке животных споры не образуются. В окрашенных препаратах из крови и тканей больных или погибших от сибирской язвы животных бактерии располагаются одиночно, попарно и в виде коротких цепочек по 3-4 клетки; концы палочек, обращенных друг к другу, прямые, резко обрубленные, свободные - слегка, закругленные. Иногда цепочки имеют форму бамбуковой трости. В мазках из культур на плотных и жидких питательных средах палочки располагаются длинными цепочками.

Культивирование. *Bacillus anthracis* по способу дыхания относят к факультативным анаэробам, хорошо растет на универсальных средах (МПБ, МПА, МПЖ, картофеле, молоке). Оптимальная температура роста на МПА 35-37°C, в бульоне 32-33°C. При температуре ниже 12 и выше 45°C не растет. Оптимум pH сред 7,2-7,6. На поверхности МПА в аэробных условиях при температуре 37°C 17-24-часовые культуры состоят из серовато-беловатых тонкозернистых с серебристым оттенком, похожих на снежинки колоний, имеющих шероховатый рельеф и характерных для типичных вирулентных штаммов (R-форма). Диаметр колоний не превышает 3-5 мм. На сывороточном агаре и свернутой лошадиной сыворотке в присутствии 10-50% углекислоты колонии гладкие полупрозрачные (S-форма), а также слизистые (мукоидные), тянувшиеся за петлей (M-форма), состоящие из капсульных палочек. В МПБ *Bacillus anthracis* через 16-24 ч на дне пробирки образует рыхлый белый осадок, надосадочная жидкость остается прозрачной, при встряхивании бульон не мутнеет, осадок разбивается на мелкие хлопья (R-форма).

При посеве в столбик желатина на 2-5-е сут появляется желтовато-белый стержень. Культура напоминает елочку, перевернутую верхушкой вниз. Постепенно верхний слой желатина начинает разжижаться, принимая сначала форму воронки, затем мешочка. *Bacillus anthracis* при росте в молоке вырабатывает кислоту и через 2-4 дня свертывает его и пептонизирует сгусток.

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

Для лабораторного исследования на сибирскую язву направляют ухо павшего животного.

Бактериоскопия. Из патологического материала для микроскопии готовят мазки, часть красят по Граму и обязательно на капсулы по Михину и Ольту. Обнаружение типичных по морфологии капсульных палочек является важным диагностическим

признаком. Посев на питательные среды. Исходный материал засевают в МПБ и на МПА (рН 7,2-7,6), инкубируют посевы при температуре 37°C в течение 18-24 ч, при отсутствии роста их выдерживают в термостате еще 2 суток.

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

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

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

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

Работа.

Задание. Промикроскопировать готовые мазки с *Bacillus anthracis*, зарисовать. Приготовить мазки из культур *B. subtilis*, окрасить их по Граму, промикроскопировать. Описать колонии *B. subtilis*, заполнить протокол.

Таблица

Форма	Диаметр, мм	Цвет	Поверхность	Профиль	Край	Структура	Консистенция	Запах
-------	-------------	------	-------------	---------	------	-----------	--------------	-------

Контрольные вопросы: 1. Описать правила взятия патологического материала при подозрении на сибирскую язву? 2. Какие методы применяют для бактериологической диагностики сибирской язвы? 3. Охарактеризовать морфологические, тинкториальные и культуральные свойства *B. anthracis*. 4. На чем основана дифференциация *B. anthracis* от сапрофитных спорообразующих аэробов? 5. Как идентифицируют возбудитель сибирской язвы при помощи сибиреязвенного бактериофага? 6. Что такое феномен «жемчужного ожерелья»? 7. Какие серологические методы применяют для обнаружения сибиреязвенного антигена в исследуемом материале?

3. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ

3.1 Практическое занятие №1 (2 часа).

Тема: «Изучение морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических свойств возбудителя туберкулеза, бруцеллеза»

3.1.1 Задание для работы:

1. Изучить этапы лабораторной диагностики туберкулёза.
2. Рассмотреть биологические свойства возбудителей туберкулёза.
3. Изучить биопрепараты.
4. Изучить этапы лабораторной диагностики бруцеллёза.
5. Рассмотреть биологические свойства возбудителей бруцеллёза.
6. Изучить биопрепараты.

3.1.2 Краткое описание проводимого занятия:

Туберкулез - инфекционная, хронически протекающая болезнь человека, животных, в том числе птиц. Патологоанатомически характеризуется образованием туберкул и творожисто-перерожденных туберкулезных очагов.

Микроорганизмы относятся к роду *Mycobacterium* (лат. mycos - гриб, bacterium - палочка) включает в себя 49 видов как патогенных, так и непатогенных. К патогенным относят микобактерии, вызывающие туберкулез у людей (*Myc. tuberculosis*), животных (*Myc. bovis*), птиц (*Myc. avium*).

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

Микроскопия. Метод окраски - по Цилю-Нильсену (микобактерии окрашиваются в красный цвет, фон и все остальные микроорганизмы – в синий).

Микрокартина: прямые или слегка изогнутые палочки с закругленными краями длиной от 1,5 до 4, шириной от 0,2 до 0,5 мкм; грамположительны; спор не образуют; капсул не образуют; неподвижны; кислото-спирто-щелочеустойчивые.

Культивирование. Посев на питательные среды: МПГБ, глицериновый картофель, Петраньянни, Гельберга, Сотона, Моделя.

Особенности выделения возбудителя: аэробы; оптимальная температура культивирования: 37-38°C для *M. tuberculosis*; 38-39°C для *M. bovis*; 39-41°C для *M. avium*; срок культивирования 7-30 дней и более.

Культуральные свойства: на жидких питательных средах характеризуется наличием рыхлой, матовой, крошкоподобной или сплошной, морщинистой, блестящей пленки соответствующего цвета; на плотных средах микобактерии растут в виде S- или R-форм крошкоподобных мелких либо крупных, блестящих или матовых единичных обособленных колоний или же сплошных скоплений, а также в виде морщинистого налета белого или белого с желтоватым оттенком, или же другого цвета, вирулентные культуры *Mycobacterium bovis* на питательных средах растут очень медленно в виде сферических, гладких и шероховатых колоний, чаще в виде сухих крошек. *Mycobacterium tuberculosis* также растут в виде сферических колоний, которые встречаются как в R-, так и в S-форме. *Mycobacterium avium* растут гладкими, мелкими, круглыми, белыми, блестящими, с ровными краями колониями, располагающимися как единично, так и скоплениями или в виде сплошного слизистого налета.

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

Биопроба. Заключается в определении патогенности культуры для морских свинок, кроликов, птиц и других лабораторных животных, которые по-разному чувствительны к различным микобактериям туберкулеза. Для этого используют двух кроликов массой не менее 1,5-2 кг которым в краевую вену уха вводят суспензию культуры микобактерий на

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

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

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

Биопрепараты. В ветеринарной практике от вакцины БЦЖ отказались.

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

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

Лабораторная диагностика бруцеллеза основана на результатах бактериологических и серологических исследований.

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

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

Мазки из материала окрашивают по Граму и одним из специальных методов (по Козловскому, Стампу и др.). Бруцеллы - грамотрицательные короткие палочковидные или кокковидные бактерии размером 0,5... 1,5 мкм, без жгутиков, спор не образуют, формируют микрокапсулу. В окрашенном препарате располагаются одиночно, реже парами, короткими цепочками.

Окраска по методу Козловского: препарат окрашивают 2%-м водным раствором сафранина 2 мин, промывают водой, докрашивают 1%-м водным раствором малахитовой зелени 1 мин, промывают водой. Микроскопическая картина: бруцеллы красные, остальные бактерии зеленые.

Окраска по методу Стампа: фиксированный на пламени мазок окрашивают фуксином Пфейффера 10 мин, промывают водой, обрабатывают 0,5%-м водным раствором уксусной кислоты 30 с, затем препарат промывают водой и докрашивают 1%-м

водным раствором метиленового синего 20-30 с. Микроскопическая картина: бруцеллы красные, другие бактерии синие.

Выделение возбудителя. Бруцеллы - аэробы, микроаэрофилы, температурный оптимум 37-38°C, pH 6,8-7,2. Материал засевают на специальные питательные среды: мясо-пептонный агар и бульон, печеночно-глюкозо-глицериновый агар и бульон, картофельный агар, эритрит-агар, сывороточно-декстрозный агар и др. Печеночные среды включают в себя отвар печени. Картофельный агар готовят на отваре картофеля, глюкозу и глицерин добавляют в среды соответственно в количестве 1% и 2-3 %. Эритрит-агар содержит вещество (эрбитрит), стимулирующее рост бруцелл. В состав сывороточно-декстрозного агара помимо обычной питательной основы входит 10 % сыворотки крови и 1 % декстрозы.

Некоторые виды бруцелл растут при повышенном содержании в атмосфере оксида углерода (IV) (*B. abortus*, *B. ovis*). Так как неизвестно, каким видом бруцелл заражен исследуемый материал, половину посевов инкубируют в обычной атмосфере, другую - в атмосфере, содержащей 10-15% оксида углерода (IV).

Посевы культивируют в течение 30 сут, периодически просматривая. Рост бруцелл чаще появляется на 7-10-е сутки, иногда позже.

На плотных средах возбудитель формирует мелкие, прозрачные, круглые, с ровными краями, гладкой поверхностью, с голубоватым оттенком колонии (S-форма), возможно появление шероховатых колоний (R-форма). По мере старения колонии мутнеют и за счет пигментообразования могут темнеть. На жидких питательных средах рост бруцелл проявляется равномерным помутнением среды, образованием голубоватого пристеночного кольца, позднее формируется небольшой осадок.

У выросших культур изучают морфологию и тинкториальные свойства клеток в мазках, окрашенных по методам Грама, Козловского.

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

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

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

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

Биопрепараты. Живая сухая вакцина против бруцеллеза из слабоагглютиногенного штамма № 82, живая вакцина против бруцеллеза овец из штамма Рев-1.

3.1.3 Результаты и выводы:

Изучены биологические свойства возбудителей туберкулеза и бруцеллеза, освоены методы лабораторной диагностики указанных инфекций, изучены средства специфической профилактике.